

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR EN VACAS DE LECHE CON DIFERENTES
ESTRATEGIAS DE ALIMENTACIÓN**

Aspirante: Ana Laura ASTESSIANO DICKSON

Director: Mariana Carriquiry Fossemale

CoDirector: Ana Meikle Solari

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2012**

INTRODUCCION

- Fundamentación general

La producción de leche resulta en importantes aportes a la economía nacional y ha tenido, en los últimos años, un fuerte incremento (INALE 2012, DIEA 2012). Este crecimiento se ha dado en el marco de un aumento muy importante de la forestación y de la agricultura que ha provocado un aumento en la competencia y en el precio de la tierra (DIEA, 2012). Es así que un incremento en la producción por unidad de superficie con reducción o mantenimiento de los costos unitarios de producción constituye una estrategia central para mantener la competitividad de la producción animal. En el Uruguay, la producción de leche se ha basado tradicionalmente en ecosistemas pastoriles (pasturas sembradas), lo que determina un desbalance entre la oferta y demanda de nutrientes en varios momentos del ciclo productivo (Chilibroste et al. 2002). La productividad por vaca es el factor que en forma individual explica una mayor proporción del crecimiento (> 60 %) mientras que el aumento de carga explica un 25-30 % del incremento en productividad del sector. Esta estrategia de intensificación de la producción de leche en Uruguay se ha basado en un incremento significativo en el uso de concentrados y reservas de forraje (DIEA, 2009) mientras que la cosecha directa de forraje por parte de los animales ha disminuido (Chilibroste et al., 2011). Estudios nacionales que incluyan el uso estratégico de dietas totalmente mezcladas (DTM) son recientes (Acosta et al., 2010, Chilibroste et al., 2011, Cajarville et al., 2012) y los trabajos son concluyentes respecto al impacto de la inclusión de DTM sobre la producción de leche, grasa y proteína al inicio de la lactancia.

Este aumento en la producción de leche implica mayores requerimientos energéticos, que acompañando por el menor consumo durante el posparto temprano se refleja en el balance energético negativo (BEN) característico. Durante este período se evidencian cambios importantes en las concentraciones de hormonas metabólicas y de metabolitos en sangre que acompañan una partición de los nutrientes hacia la glándula mamaria y un redireccionamiento del tipo de combustible utilizado por los tejidos periféricos. El éxito para que los animales se adapten al BEN, requiere un incremento del metabolismo hepático y un adecuado funcionamiento, ya que el hígado es la central metabólica del animal y el principal regulador e integrador del estatus metabólico (McCarthy et al., 2010). Este mismo proceso de adaptación metabólica impacta el eje reproductivo; está internacionalmente aceptado que prolongados de BEN alargan el anestro posparto y disminuyen eficiencia reproductiva (Lucy 2003). Sin embargo, estudios que investiguen el efecto del BEN sobre la habilidad materna para promover la gestación (expresión génica uterina) son escasos.

La mayoría de la información científica relacionada con la fisiología de la regulación de la partición de nutrientes en vacas lecheras ha sido generada en sistemas de confinamiento en los cuales los animales reciben DTM con alta proporción de concentrados. Sin embargo, no hemos encontrados trabajos que integren aspectos endocrino/metabólicos, funcionalidad hepática y del eje reproductivo en sistemas que comparen y combinen el uso de DTM y pastoreo. La información generada en la comprensión de estos mecanismos, permitirá proveer de herramientas para la manipulación de procesos complejos que puedan tener un impacto económico en el mediano y largo plazo, incluyendo la persistencia de la lactancia, fertilidad y eficiencia. La hipótesis que nos planteamos es que diferentes estrategias de alimentación durante la lactancia temprana (pastoreos vs TMR) podrían modificar el consumo y los requerimientos (producción de leche), reflejándose en cambios en los perfiles metabólicos/endocrinos y en la expresión génica del hígado. Además, este manejo diferencial podría afectar el reinicio de la ciclicidad ovárica y la expresión génica uterina.

Objetivo general: Contribuir al conocimiento sobre el uso de diferentes estrategias de alimentación durante lactación temprana sobre la regulación del metabolismo de nutrientes y su impacto en respuestas productivas y reproductivas.

Objetivos específicos:

- Estudiar el efecto de diferentes estrategias nutricionales (pastoreo vs. DTM) durante la gestación y lactación temprana sobre, los perfiles metabólicos y endocrinos, la expresión hepática de genes relacionados con el eje somatotrófico, la regulación del metabolismo energético, la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos, la función mitocondrial, oxidación de ácidos grasos en la mitocondria y el peroxisoma. Relacionar los mismos con las respuestas productivas y reproductivas.
- Estudiar el efecto de DTM y cantidades crecientes de forraje durante lactación temprana de vacas lecheras primíparas en condiciones pastoriles sobre, la expresión endometrial de genes relacionados con la familia IGF, la regulación del metabolismo energético, los receptores de progesterona (*PR*) y *estrógeno* (*ER α*) y asociarlos al día 7 del ciclo estral.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Bases metabólicas de la adaptación a cambios en el balance energético durante gestación y lactación en vacas de leche.

En el último tercio de gestación y/o durante las primeras semanas posparto, de manera similar a lo que ocurre en muchas especies de mamíferos, se establece en las vacas un balance energético negativo (BEN) porque el aumento de los requerimientos nutricionales no está acompañado de un aumento inmediato o suficiente en el consumo de alimentos. El incremento en el consumo de MS posterior al parto ocurre a una tasa menor que el aumento en la producción de leche (Bell y Bauman, 1997; Bell, 1995) y la capacidad del animal para adaptarse y sobrellevar este BEN no solo afecta la capacidad productiva de la vaca, sino también compromete la respuesta reproductiva durante el siguiente ciclo productivo y depende de la capacidad de los mecanismos endócrinos y metabólicos para mantener la homeostasis (equilibrio de las condiciones internas; Chilliard et al., 1998). En este escenario, el hígado es la central metabólica del animal y el principal regulador e integrador del estatus metabólico, ya que sufre grandes cambios bioquímicos y fisiológicos (McCarthy et al., 2010) dirigiendo la regulación de vías metabólicas y la expresión de genes clave en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Loor, 2010)

Las adaptaciones a períodos de BEN implican importantes cambios internos para la vaca con el fin de promover la disponibilidad de glucosa y aminoácidos para el metabolismo y una creciente utilización de ácidos grasos no esterificados (AGNE) por los tejidos maternos (Bell, 1995) durante la gestación. Así mismo, el inicio de la lactación se caracteriza por una utilización prioritaria de la glucosa por parte de la glándula mamaria, de manera que el déficit energético en el resto de los tejidos, también provoca la movilización de los depósitos de grasa. En las primeras semanas posparto existe además proteólisis, con el fin de movilizar aminoácidos que contribuyan a la gluconeogénesis hepática y a la síntesis de proteína láctea en la glándula mamaria (Bauman 2000, Lucy 2008).

El hígado tiene una gran influencia en el perfil y aporte de nutrientes absorbidos en el tracto gastrointestinal que podrán ser usados en los procesos productivos ya que los nutrientes deben pasar primero a través del hígado antes de llegar a los tejidos donde serán usados. Debido a que la mayoría de los carbohidratos ingeridos en la dieta son fermentados en el rumen, muy poca glucosa es absorbida directamente del tracto digestivo, y la mayor parte de la misma debe ser sintetizada en el hígado. Las principales fuentes que proveen de moléculas de carbono para la síntesis nueva de glucosa (neoglucogénesis), son el ácido propiónico de la fermentación ruminal, el glicerol proveniente de la degradación del tejido adiposo y los aminoácidos del catabolismo del músculo esquelético (Seal y Reynolds, 1993). Piruvato carboxilasa (PC) y fosfoenolpiruvato carboxkinasa (PCK) son dos enzimas claves regulatorias de la gluconeogenesis, responsables de los dos primeros pasos de esta vía. Adicionalmente, la actividad de PC esta estimulada por el incremento de acetil-CoA en la mitocondria que señala la necesidad de oxalacetato (Stipanuk, 2001; Hanson y Reshef, 1997). Estudios en vacas lecheras muestran que la abundancia de ARNm y actividad de PC se incrementa rápidamente luego del parto mientras que la abundancia de ARNm de la PCK citoplasmática se incrementa más lentamente (Hartwell et al., 2001; Greenfield et al., 2000). La diferencia en tiempo en estos incrementos responde a las necesidades metabólicas de la vaca lechera durante el período del parto. Como se mencionaba anteriormente, en el postparto inmediato hay una gran demanda de energía que deriva en gran parte de la movilización de tejido adiposo. El incremento en la abundancia de ARNm y actividad de PC sin modificaciones en la expresión de ARNm de PCK, permite que la vaca durante la transición desvíe más oxalacetato al ciclo de Krebs a través del metabolismo del piruvato, lo cual permite que la oxidación de los ácidos grasos se mantenga a una tasa alta (Greenfield et al., 2000). A medida de que la lactación progresa, el consumo de alimento aumenta, la movilización de los ácidos grasos se reduce y el incremento en la producción de leche, aumenta las necesidades de glucosa. El aumento simultáneo de ARNm de PC y PCK, refleja este incremento en el requerimiento de glucosa (Greenfield et al., 2000).

Asimismo, en momentos de BEN, el hígado debe procesar los AGNE que llegan al hígado donde pueden ser oxidados total o parcialmente para la obtención energía y/o de cuerpos cetónicos, o volcados a la circulación nuevamente en forma de lipoproteínas o almacenados como triglicéridos (Grummer et al., 2004). La β -oxidación mitocondrial está regulada por la actividad de la enzima carnitina palmitoiltransferasa (CPT-1) que cataliza la condensación del acil-CoA y carnitina libre en acil-carnitina que será transportada a través de la membrana mitocondrial. El gen CPT-1 en el hígado está sujeto a regulación hormonal y tejido-específica (Park et al., 1998). La insulina inhibe la síntesis de ARNm de CPT-1 mientras que la adición de glucagón o su segundo mensajero, AMP cíclico, induce la transcripción del gen CPT-1 en el hígado (Park et al., 1995; Louet et al., 2001b). Se ha reportado que la actividad de CPT-1 en la vaca lechera incrementa del pre al postparto pero no difiere durante la lactación (0-220 días) (Mizutani et al., 1999), o que decrece a medida que la lactación progresa de los 30 a los 180 días postparto (Aiello et al., 1984). Las razones de estos resultados contrastantes, no están claras, mostrando la necesidad de información adicional. Por otra parte, la acil-CoA dehidrogenasa de cadena larga, ACADVL participa en la oxidación mitocondrial de ésteres de cadena larga y ácidos grasos de cadena muy larga. La β -oxidación en los peroxisomas es una vía alternativa de oxidación de ácidos grasos de cadena larga que son sustratos pobres para la oxidación en la mitocondria. La Acil-CoA oxidasa (ACOX) cataliza la primera reacción y es uno de los principales pasos regulatorios. Esta β -oxidación representa aproximadamente 50% de la capacidad total para el ciclo inicial de la β -oxidación hepática en vacas lecheras (Piot et al., 1998; Grum et al., 1994). Se ha propuesto que la β -oxidación en los peroxisomas juega un importante rol en el metabolismo de los ácidos grasos durante

períodos de alto y sostenido influjo de ácidos grasos como los que ocurren durante períodos BEN (De Craemer et al., 1994). Grum y colegas (Grum et al., 1996a; Grum et al., 1996b) han sugerido que la dieta y el estado fisiológico interactúan, induciendo esta β -oxidación. Se ha reportado que la expresión hepática de CPT-1 y ACADVL aumentó (Loor et al., 2005) o no cambió (van Dorland et al., 2009) durante la lactancia temprana en vacas lecheras alimentadas con DTM. Es más se ha reportado un único caso de aumento de la expresión de ARNm hepático de ACOX durante cetosis clínica inducida por restricción alimenticia en el ganado lechero (Loor et al., 2007).

Eje somatotrófico y partición de nutrientes.

La principal hormona responsable de la partición de nutrientes es la hormona del crecimiento (GH; Etherton y Bauman, 1998). El eje somatotrófico que consiste en GH, el factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I), sus proteínas de unión (IGFBP) y sus receptores, juega un rol crítico en la regulación del metabolismo y de varios procesos fisiológicos (Renaville et al., 2002). El hígado, puede considerarse como el principal regulador e integrador del estatus metabólico de los animales y es el sitio primario de síntesis de IGF-I, en respuesta a la unión de la GH, con su receptor (GHR). En contraste con la típica asociación directa y positiva entre GH e IGF-I, mientras GH en sangre comienza a aumentar previo al parto, IGF-I disminuye, disociación que coincide con el establecimiento del BEN de inicio de lactación y con la disminución de la insulina en sangre (Rhoads et al., 2004; Lucy 2008). El incremento de GH postparto estimulan la gluconeogénesis en el hígado y antagonizan con la acción de la insulina en los tejidos periféricos. En particular, en el tejido adiposo, las concentraciones altas de GH y bajas de insulina estimulan la lipólisis y disminuyen la utilización de la glucosa, reservando así la misma para la síntesis de leche (Lucy et al., 2009). Existe evidencia de que las vacas de menor producción tienen menores concentraciones de GH y mayores de insulina e IGF-I (Gong et al., 2002). En estas vacas, la capacidad de movilizar AGNE es menor y una mayor cantidad de glucosa es destinada a tejidos extramamarios. Estas características son las que llevan a una menor producción láctea (Bauman, 2000).

A pesar de los considerables esfuerzos de la investigación internacional, el mecanismo molecular responsable del desacople del eje GH-IGF-I no está completamente claro. La disminución de los receptores de GH hepáticos son la principal causa de resistencia a GH en el posparto temprano (Lucy et al., 2009). La expresión hepática del transcrito de GHR, especialmente de la isoforma 1A (GHR-1A), juega un papel importante en la regulación del desacople del eje, dado que disminuye dramáticamente en el posparto temprano conjuntamente con la disminución del ARNm y las concentraciones sanguíneas de IGF-I (Kobayashi et al., 1999). Las bajas concentraciones de insulina, características del posparto temprano, jugarían un rol clave en la disminución de la abundancia de GHR y por lo tanto en el desacople hormonal (Mashek et al., 2001; Rhoads et al., 2004; Butler et al., 2003). Asimismo, Loor et al. (2005) y Carriquiry et al. (2009) trabajando con vacas de leche, sugirieron que la expresión hepática de ARNm de *IGFBP3* también sería clave en este mecanismo. Sin embargo, la expresión de ARNm de *GHR1A* y/o *IGF1* no se modificó en vacas lecheras en lactación tardía sometidas a una restricción alimenticia (Rhoads et al., 2007), durante el parto de vacas de carne alimentadas *ad libitum* o en pastoreo (Jiang et al., 2005; Schneider et al., 2010; Astessiano, 2010; Laporta, 2011), o en vacas de leche de baja producción (Lucy et al., 2009).

Investigaciones nacionales en vacas de leche en pastoreo han demostrado que los perfiles metabólicos cambian con la paridad (Meikle et al., 2004; Cavestany et al.

2005) y condición corporal (CC) al parto (Meikle et al., 2004), con la suplementación grasa posparto (Mendoza et al., 2008), con suplementaciones energéticas en el preparto (Cavestany et al., 2009a; Cavestany et al., 2009b) y con la CC al comienzo del período de transición regulada nutricionalmente (Adrien et al., 2011). Asimismo, resultados recientes muestran que la expresión de genes que codifican para enzimas de la oxidación de ácidos grasos, cambian durante el periodo de transición y lactación temprana y están moduladas por las reservas corporales en vacas de leche en pastoreo (Carrquiry et al., 2010). Por otro parte, a pesar que las concentraciones de insulina e IGF-I disminuyen luego del parto (Meikle et al., 2004; Pereira et al., 2010; Adrien et al., 2011), los cambios en la expresión hepática de ARNm de *GHR*, *GHR1A* e *IGF1* durante el pre y posparto inmediato en vacas lecheras de alta producción, no son tan marcados como en sistemas de confinamiento con alimentación en DTM (Carrquiry et al., 2010). Grala et al. (2011), demostraron que la suplementación de vacas lecheras a pastoreo aumentó las concentraciones de GH y disminuyó las de IGF-I sin efectos del nivel de suplementación, sugiriendo que las vacas suplementadas presentaban un menor desacople del eje somatotrófico a pesar de no encontrar efecto de la suplementación sobre la expresión génica en hígado. No hemos encontrado reportes que evalúen el efecto de estrategia de alimentación, pastoreo con suplementación vs. DTM, sobre los aspectos endocrinos y moleculares del eje GH-IGF-I en vacas de leche de similar potencial genético.

Cabe destacar la importancia del rol que tiene el eje GH-IGF-I-insulina en la eficiencia reproductiva ya que afecta la función del eje hipotálamo-hipofisiario (Bach, 2001; Lucy, 2000), la foliculogénesis (Lucy et al., 2003) y la función uterina (Thatcher et al., 2003). El éxito reproductivo en el posparto dependerá del correcto funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal, el cual tiene un rol dominante en la regulación de la reproducción. Las señales propuestas incluyen: concentraciones circulantes de metabolitos (glucosa y AGNE) y hormonas (GH; insulina; IGF-I y sus proteínas de unión, IGFBP1-6; y leptina). El largo de anestro ha sido asociado con menores concentraciones de IGF-I en vacas lecheras en condiciones pastoriles, vacas que ovulan en lactación temprana tiene mayores concentraciones de insulina y/o IGF-I que aquellas que fallan en ovular (Meikle et al., 2004; Adrien et al., 2011). Este correcto funcionamiento requiere de la integración de señales periféricas que indican el estatus fisiológico y nutricional de la vaca e identifica a la misma como “pronta para concebir” y llevar adelante una gestación.

Adipokinas y regulación del metabolismo energético.

El tejido adiposo cumple un rol no solo como reserva de energía sino también que ha ganado interés como una glándula activa involucrada en la regulación del metabolismo y secretando importante proteínas. La detección por primera vez en rumiantes de la leptina, hormona proteica secretada principalmente por el tejido adiposo (Delavaud et al., 2000), puso de manifiesto el importante papel endocrino de este tejido y en los últimos años se han descubierto varias proteínas secretadas por este tejido llamadas adipokinas (ej. leptina, adiponectina, resistina, visfastina) (Lemor et al., 2009). Estas adipokinas, así como otras proteínas como la proteína 4 similar a la angiopoietina (ANGPTL4), se han asociado a la homeostasis metabólica, regulando el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Yang et al., 2001; Kubota et al., 2007; Lemor et al., 2009; Mamedova et al., 2011). La investigación sobre los mecanismos de regulación del metabolismo energético y en particular el rol de las adipokinas en el metabolismo energético es escasa en el modelo rumiante. En este sentido, se ha demostrado que durante el BEN en la transición de la vaca lechera, las concentraciones de leptina en sangre disminuyen mientras que la expresión de ARNm del receptor de leptina aumenta tanto a nivel hepático (Thorn et al., 2008) como en

tejido adiposo (Thorn et al., 2008; Lemor et al., 2009) y que este aumento estaba parcialmente regulado por las concentraciones disminuidas de insulina (Thorn et al., 2008). Estos autores sugieren que el incremento en el receptor de leptina durante períodos de BEN podría atenuar la acción de la leptina.

La adiponectina es producida exclusivamente por los adipocitos y circula en sangre en altas concentraciones. Esta hormona ha sido correlacionada negativamente con la disminución de la adiposidad, se incrementa luego de la reducción de peso y promueve la secreción y sensibilidad a la insulina, incrementando el consumo de alimento y reduciendo el gasto de energía (Yang et al., 2001; Kubota et al., 2007). Resultados preliminares en vacas lecheras indicarían que las concentraciones de adiponectina se incrementan en el posparto de la vaca lechera (Raddatz et al., 2008). Sin embargo, Lemor et al. (2009) no encontraron un aumento de la expresión de ARNm de adiponectina en tejido adiposo en el posparto de vacas lecheras. Con respecto a los receptores de adiponectina, la expresión de ARNm de *ADIPOR2* se incrementó en el hígado durante el posparto en vacas lecheras con alimentación restringida en el preparto pero no en vacas alimentadas *ad libitum* (Loor et al., 2006; Loor et al., 2010). Estos resultados sugieren una regulación diferencial del tejido adiposo e hígado como reguladores de la homeostasis energética.

La ANGPTL4, también conocida como factor adiposo inducido por el ayuno, se expresa en varios tejidos bovinos, incluyendo el tracto gastrointestinal; Mamedova et al. (2011) demostraron que consistentemente con lo reportado en ratones, humanos y cerdos, los tejidos de mayor abundancia en el bovino son el hígado y tejido adiposo. Esta proteína circula en sangre y juega un rol en el mantenimiento de la homeostasis metabólica, regulando el metabolismo de lípidos y carbohidratos a nivel periférico (estimula la oxidación de los ácidos grasos, inhibe la acumulación de grasa y mejora la tolerancia a la glucosa) (Kim et al., 2010; Mamedova et al., 2011). Loor et al. (2007) demostraron que la expresión hepática de ARNm de *ANGPTL4* aumenta en el hígado de vacas en BEN durante el periparto, consistentemente con lo reportado por Ge et al. (2005) en ratones. Es interesante destacar que cambios en la fermentación ruminal pueden afectar la expresión de esta proteína (Mamedova et al., 2011), sin embargo los autores sugieren que se requiere trabajo sustancial para identificar/determinar los efectos de las dieta sobre esta adipokina.

Efecto de la nutrición sobre la reproducción

Las principales limitantes para el éxito reproductivo son el reinicio de la ciclicidad ovárica luego del parto y la mortalidad embrionaria temprana. Un estudio realizado a nivel nacional (n=899 vacas lecheras de uno, dos o tres lactancias realizados en 7 tambos comerciales), indica que con un buen manejo nutricional las vacas lecheras reinician su ciclicidad ovárica dentro de los primeros 30 a 40 días posparto (Carriquiry et al., 2012). No hemos encontrado reportes sobre mortalidad embrionaria a nivel nacional, sin embargo, a nivel internacional, Santos et al. (2004), reportan que cerca del 40% de las preñeces fallan alrededor del momento del reconocimiento materno de la gestación en vacas en lactancia, siendo menor esta perdida en vacas secas.

Como se mencionó anteriormente, el inicio de la lactación representa un ejemplo claro de homeorhesis y es la hormona del crecimiento, la responsable de la partición de nutrientes. Alteraciones en esta hormona, en la insulina e IGF-I en sangre, así como en metabolitos (glucosa, AGNE, BHB) son indicativos de la disponibilidad de energía y podrán disponer a corto o largo plazo las señales que median los efectos de la nutrición sobre la reproducción (Lucy, 2003). Existe considerable evidencia (Lucy, 2003) que sugiere que el estado metabólico de las vacas durante el posparto

temprano contribuye a la eficiencia reproductiva de estos animales. Resultados del equipo de investigación han descrito el efecto del número de lactancias (primíparas vs. múltiparas) y el estado corporal al parto (natural o provocado) sobre el reinicio de la ciclicidad ovárica en vacas Holando (Meikle et al., 2004; Adrien et al., 2012) encontrando que estas diferencias de comportamiento se reflejan en algunas variables endocrinas y metabólicas. Es así que, se ha reportado un BEN más severo en vacas lecheras primíparas vs. múltiparas en condiciones pastoriles o de baja vs. alta CC, asociado a menores concentraciones de insulina y de IGF-I y anestros mas largos (Meikle et al. , 2004; Adrien et al., 2012). Meikle et al. (2004) trabajando en condiciones pastoriles, reportaron que las vacas lecheras que ovulan en lactación temprana presentaron mayores concentraciones de IGF-I que aquellas en las cuales la ovulación falla.

Por otra parte, se ha reportado que la mayor causa de mortalidad embrionaria en la etapa de pre implantación se debe a problemas en la señalización entre el embrión y la madre, lo que conduce a un desarrollo asincrónico, con retraso en el crecimiento del embrión (Goff, 2002; Thatcher et al., 2003). Hasta la implantación, el embrión se desarrolla libremente en el oviducto y en el útero y depende de sus secreciones (Ashworth, 1995; Fleming et al., 2004; Spencer et al., 2004). Una sincronía estricta entre el ambiente materno y el embrión es esencial para asegurar la supervivencia embrionaria: tanto el endometrio como el embrión, sintetizan y secretan a la interfase embrio-maternal una multitud de factores de crecimiento, proteínas, citoquinas, hormonas y otras sustancias que afectan a ambas partes, ya sea en forma autocrina o paracrina, y que determinan dicha sincronía (Martal et al., 1997).

Entre los factores de crecimientos promotores del desarrollo embrionario, la familia IGF tiene un rol primordial. El IGF-I actúa como factor mitogénico endócrino y es el mediador de los efectos de la hormona del crecimiento (Schoenle et al., 1982). Se ha comprobado la producción local de IGF-I en diferentes tejidos, por lo tanto el IGF-I tendría además acciones independientes de la hormona del crecimiento (Han et al., 1987). Meikle et al., (2001) demostraron que la expresión endometrial de ARNm *IGF1* fue más alta al estro y fase luteal muy temprana (día 0 y 5, respectivamente), que durante la fase luteal media o tardía (día 12 y 19, respectivamente). Estos cambios temporales estuvieron asociados con la expresión del transcrito de los receptores de estrógenos y progesterona y con las concentraciones circulantes de progesterona y estrógenos (P4 y 17B estradiol). Estos hallazgos en la expresión endometrial de ARNm *IGF1* fueron confirmados por otras metodologías más recientemente (Sosa et al., 2010), sugiriendo la relevancia de IGF1 durante la fase luteal temprana. Sin embargo la expresión de ARNm *IGF2* e *IGFR* presentaron sus máximos niveles durante la fase luteal media, sugiriendo un rol diferencial de IGF1 e IGF2 en el crecimiento del embrión y/o regulación de la función uterina. Asimismo, Sosa et al. (2009) observaron un aumento la expresión endometrial de ARNm *IGF1* e *IGF2* al día 14 en ovejas preñadas compradas con ovejas ciclando y que la subnutrición provocó una alteración en la expresión endometrial de *IGF2* en ovejas cíclicas, duplicando la expresión de *IGF2* comparado con el grupo control.

Si bien son escasos los estudios de expresión génica endometrial en vacas lecheras durante la lactancia, Rohads et al., (2008) encontraron que la expresión endometrial de ARNm *GHR*, *IGF1*, *IGFBP2* no fueron modificadas durante los primeros 160 días de lactancia. Por otro lado, Wathes et al., (2011) estudiando la expresión endometrial de la familia IGF en la segunda semana luego del parto en vacas con BEN moderado y severo, encontraron mayor expresión de ARNm *IGFBP1* e *IGFBP4* y menor expresión de ARNm *IGFBP6* en animales con BEN severo, sugiriendo efectos directos del BEN sobre la funcionalidad uterina.

Respecto al rol de las a las adipokinas, sustancias secretadas por el tejido adiposo (ej. leptina, adiponectina), en la fertilidad bovina no hemos encontrado información endometrial disponible respecto a los receptores de las mismas. Se ha descrito la expresión de ARNm LepR durante el ciclo estral, reportándose niveles más bajos al día 5 (Sosa et al., 2010). Sin embargo hay evidencia en humanos del rol que tienen las adipokinas en la fertilidad (Mitchel et al., 2005). En este sentido, Takemura et al. (2006) describen un aumento de los receptores de adiponectina (ADIPOR1 y ADIPOR2) en el endometrio durante fase luteal media, sugiriendo un rol en la implantación del embrión. A su vez, Dos Santos et al. (2012) reportaron en mujeres con fallas recurrentes en la implantación del embrión vs. mujeres fértiles que la expresión endometrial de ARNm y proteína de leptina fue menor, del receptor de leptina (Ob-R) fue mayor, de ADIPOR1 y ADIPOR2 fue menor, y no hubo diferencias en la expresión de adiponectina, sugiriendo un claro rol de las adipokinas y/o sus receptores en la receptividad del útero humano a la implantación

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos propuestos se plantea realizar un experimento, el mismo será realizados de acuerdo al protocolo de experimentación con animales presentado a la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Universidad de la República) en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC; Paysandú, Uruguay, Exp 1). El segundo experimento utilizará muestras colectadas en un experimento que se llevó a adelante en la misma estación experimental en el año 2005; Exp 2)

En el *experimento 1* se utilizarán en un diseño de bloques al azar vacas Holando multiparas (n = 30) de 3 a 5 partos, con parición en otoño agrupadas en bloques según fecha probable de parto, CC preparto y PV. A los dos meses preparto se realizará un manejo alimenticio (en base al pastoreo de praderas mixtas y suplementación) para lograr que los animales lleguen al parto con CC entre 3 y 3,5 unidades. En el último mes preparto se realizará el manejo de rutina de la EEMAC que utiliza ensilaje de maíz como fuente de fibra, concentrado comercial preparto y sales anionicas si fueran necesarias, minimizando las pérdidas de CC. Al momento del parto (día 0) los animales serán asignados a 3 tratamientos nutricionales durante los primeros 90 días de lactancia:

- i) Pastoreo1 (n = 10): durante los primeros 90 días de lactancia, el 50% de la dieta será ofrecida mediante el pastoreo de una pradera de 2 años en una única sesión de pastoreo de 7 horas diarias luego del ordeño de la mañana (asignación de 17.5 kg MS/vaca/día) y el restante 50% de la dieta será ofrecido en una dieta totalmente mezclada con una relación 45% forraje: 55% concentrados (similar a la dieta ofrecida en el tratamiento DTM) luego del ordeño de la tarde.
- ii) Pastoreo2 (n = 10): durante los primeros 90 días de lactancia, el 50% de la dieta será ofrecida en dos sesiones de pastoreo de 11 horas diarias luego del ordeño de la mañana (7h am y 4h pm, asignación de 17.5 kg MS/vaca/día) y el restante 50% de la dieta será ofrecido en una dieta totalmente mezclada con una relación 45% forraje: 55% concentrados (similar a la dieta ofrecida en el tratamiento DTM) luego del ordeño de la tarde.
- iii) DTM (n = 10): durante los primeros 60 días de lactancia, el 100% de la dieta (30-35 kgMS/vaca/día) será ofrecido en base a una dieta totalmente

mezclada (DTM, encierro) con una relación 45% forraje: 55% concentrados entre los días 60 y 90 de lactancia, las vacas tendrán la misma rutina de alimentación que el tratamiento de pastoreo.

Durante los primeros 90 días de lactancia las vacas serán ordeñadas dos veces al día (5 am y 3 pm), la producción de leche será determinada diariamente y las muestras serán obtenidas semanalmente para el análisis de grasa proteína y lactosa. Se registrará la CC [escala 1 (flaca) a 5 (gorda), Edmonson et al., 1989] y el PV de las vacas cada quince días. Se colectarán muestras de sangre semanalmente desde el día -30 al 70 días de lactancia por venipunción de la vena coccígea a primera hora de la mañana utilizando tubos Vacutest® (Vacutest Kima, Arzergrande, Italia) de 10 ml con heparina. Las muestras refrigeradas se centrifugaran a 3000 X g durante 15 minutos y el plasma fue almacenado a -20 °C hasta su posterior análisis. A los -30, -15, +15, +45 y +67 días de lactancia se colectaran muestras de hígado (500mg) utilizando una aguja de biopsia (Tru-Core®-II Automatic Biopsy Instrument; Angiotech, Lausanne, Suizterland) de acuerdo al procedimiento descrito por Carriquiry et al. (2009). Las muestras obtenidas serán inmediatamente almacenadas en N líquido y posteriormente en un freezer a -80 °C hasta su análisis.

Las concentraciones de AGNE, glucosa, y urea se determinaran mediante espectrofotometría utilizando kits comerciales (Wako AGNE-HR(2) de Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan y Oxidase/Peroxidase, UREA/BUN – UV, Ureasa/Glutamato Deshidrogenasa de BioSystems S.A., Barcelona, Spain, respectivamente) de acuerdo a Astessiano et al. (2011). Las concentraciones de insulina e IGF-I serán determinadas en un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) (INS-IRMA; Diasource, Brussels, Belgium, IGF1-RIACT; Cis Bio, Gif sur Yvette, France, respectivamente) previamente utilizados en bovinos (Adrien et al., 2011; Laporta, 2011). Las concentraciones de adiponectina serán determinadas con un radioinmunoensayo (RIA) usando un kit comercial (HADP-61 HK, Linco, Millipore) de acuerdo a Raddatz (2009). 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).

En las muestras de hígado se extraerá el ARN total seguido por tratamiento con DNase y se sintetizará ADNc mediante transcripción reversa de acuerdo a Astessiano et al. (2011). Se cuantificará la expresión de ARNm de los genes de interés relacionados con, el eje GH-IGF (*GHR*, *GHR1A*, *IGF1*, *IGF2*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *IGFBP6*), la regulación del metabolismo energético (*OBRb*, *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *ANGPTL4* e *INSR*), la gluconeogenesis (*PC*, *PCK1*), la oxidación de ácidos grasos (*ACOX*, *CPT1*, *ACADVL*) y 3 controles endógenos [hipoxantina fosforibosil transferasa (*HPRT*), B-actina y proteína ribosomal S9 (*RPS9*)] mediante PCR en tiempo real usando una mezcla universal 2X KAPA qPCR Master Mix SYBR® FAST Universal (Kapa Biosystems, inc. Woburn, MA, USA) usando Rotor-Gene TM6000 (Corbett Life Sciences, Sidney, Australia) (Astessiano et al., 2011). Regresiones lineales a partir de las curvas de dilución serán utilizadas para estimar el número de moléculas de los genes de interés y controles endógenos en cada muestra. La expresión de los genes de interés serán normalizadas a la expresión de los controles endógenos (media geométrica).

Evaluación de la oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos en el hígado.

Se realizarán medidas de consumo de oxígeno dependiente de ácidos grasos en mitocondrias aisladas, utilizando como sustratos acil-CoA de cadena corta (butiril-CoA), mediana (octanoil-CoA) y larga (palmitoil-CoA), en presencia de carnitina, de acuerdo con Shabalina et al., (2010). A fin de evaluar si existen alteraciones en las enzimas involucradas en la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, se evaluará la expresión de CPT1 y acil-CoA deshidrogenasas de cadena muy larga (VLCAD), mediana (MCAD) y corta (SCAD) por medio de Western blot y la actividad de las distintas acil-CoA deshidrogenasas de acuerdo con Bertrand et al., (1992); Freraman y Ggdman (1985). El aislamiento de peroxisomas se hará por medio de centrifugación en gradiente de densidad y se medirá el consumo de oxígeno y la reducción de NAD⁺ dependiente de palmitoil-CoA de acuerdo con (Neat et al., 1980). La expresión de la Acil-CoA oxidasa peroxisomal se evaluará por western blot y la actividad por medio de un ensayo fluorimétrico (Walusimbi et al., 1983).

En el experimento 2 se utilizaron en un diseño de bloques al azar vacas Holando primíparas (n = 44), agrupadas en bloques según edad, CC y PV. En el último mes preparto se realizó el manejo de rutina de la EEMAC y a partir de los 10 días previos al parto comenzó el acostumbramiento de los animales a los comederos individuales en los cuales se le suministraron 2 de los 4 kg de concentrado. Al momento del parto (día 0) los animales fueron asignados a 4 tratamientos nutricionales:

- i)** T1 (n = 11): 100% DTM en comederos individuales compuesta por ensilaje de maíz, concentrado y heno de moha teniendo acceso al alimento 4 veces al día con sesiones de 2 hs cada una (6:30-8:30, 10:30-12:30, 14:30-16:30 y 18:30-20:30 hs). Los comederos fueron recargados una vez al día realizándose esto luego de la sesión de 16:30 hs. La alimentación de este tratamiento pretendió ser *ad libitum* por lo tanto las cantidades ofrecidas inicialmente se ajustaban en forma individual en la medida que se observaban rechazos menores al 15% de lo ofrecido.
- ii)** T2 (n = 11): Condición de pastura alta: área de pastoreo 1 ha con una altura del remanente esperada de 15 cm
- iii)** T3 (n = 11): Condición de pastura alta: área de pastoreo 0.5 ha con una altura del remanente esperada de 10 cm
- iv)** T4 (n = 11): Condición de pastura alta: área de pastoreo 0.25 ha con una altura del remanente esperada de 5 cm

Los animales de los tratamientos T2, T3 y T4 fueron suplementados con: 10 kg (Base Fresca, BF) de ensilaje de maíz, 4.8 kg (BF) de concentrado y 0.32 a 0.44 kg (BF) de heno de Moha. La suplementación se realizó todos los días en comederos individuales, a partir de las 18:00 hs para el T4, 19:00 hs para el T3 y 20:00 hs para el T2. Estos tres tratamientos se manejaron sobre la misma pastura, teniendo acceso a la misma en el horario de 8.00 a 15.00 hs durante una semana. Ingresaban a franjas nuevas los días martes. Los animales pastoreaban una pradera de segundo año (disponibilidad 2600 kgMS/ha), compuesta por *Festuca arundinace*, *Lotus corniculatus* y *Trifolium repens*. Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día (5 am y 4 pm), luego del ordeño de la tarde permanecieron en un piquete con libre acceso a agua hasta el suministro del suplemento, luego del cuál regresaron al mismo piquete permaneciendo allí toda la noche. Finalizado el ordeño de la mañana los animales pertenecientes a los tratamientos con pastoreo eran llevados a la pastura. Los animales caminaban 4 km. por día.

La sincronización de celos, se realizó en dos grupos de animales para homogenizar los días posparto (DPP) al momento del inicio de los tratamientos. El tratamiento de sincronización de celos se esquematiza en la figura 1. Pevio al inicio de los tratamientos se realizó ultrasonografía transrectal de los ovarios para identificar las estructuras presentes utilizando para ello un equipo Aloka 500 con un transductor de 5 MHz. Se registró la presencia de cuerpos lúteos y se midió el diámetro del folículo más grande. La ultrasonografía se realizó a partir del 54 DPP, es decir tres días antes del inicio de los tratamientos, los tratamientos comenzaron a los 57 DPP. El tratamiento hormonal consistió en la colocación el día -9 de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona natural (Terapress®), con la inyección intramuscular de 2.5 ml de Fertagyl® (0.25 mg de hormona sintética de descarga de gonadotropinas/vaca); el día -2 se retiró el implante y se inyectaron 2 ml de Enzaprost D-C® (0.15 mg de D-Cloprostenol/vaca) también por vía intramuscular. Ese mismo día se colocaron parches en la región sacro-coccígea como ayuda en la detección de celos, la cual se realizó durante 5 días a partir del retiro del implante, observándose los animales dos veces por día (luego de cada ordeño) durante 40 minutos. El signo principal que se tuvo en cuenta para determinar si un animal estaba en celo era la receptividad a la monta, teniendo en cuenta la ayuda del cambio de coloración del parche.

Durante la sincronización de celo se colectaron muestras de sangre dos veces por semana (martes y viernes) de la misma manera que se describió para el experimento 1. Al día 7 del ciclo estral inducido se colectaron muestras de endometrio utilizando un biopsiador uterino de acuerdo al procedimiento descrito por Meikle et al (2001) y se utilizarán las muestras de sangre colectadas dos semanas previas y posterior a la biopsia para determinar la concentración de hormonas (insulina, IGF-I, progesterona, estrógeno, adiponectina y leptina) como se describió anteriormente (Exp 1).

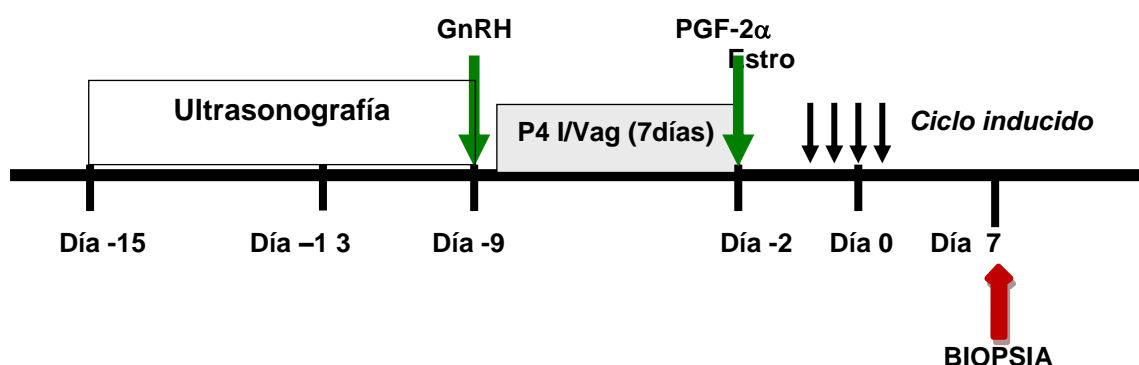


Figura 1. Esquema del tratamiento de sincronización de celos

En las muestras útero se cuantificará la expresión de ARNm de los genes de interés relacionados con el eje *GH-IGF*: *GHR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGF2*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *IGFBP6*, las adipocinas y sus receptores (*LEPR*, *LEPR-a* y *LEPR-b*, *adiponectina*, y *ADIPOR1* y *ADIPOR2*), *INSR*, *PR* y *ERα* con la misma metodología utilizada en el experimento 1.

El análisis estadístico se realizará utilizando el programa SAS (SAS Institute, Cary, NC). Los datos serán analizados en un modelo mixto con medidas repetidas mediante el procedimiento MIXED. En el Exp. 1 el modelo incluirá el efecto de la estrategia de alimentación (pastoreo vs. DTM), días de lactancia, y sus interacciones como efectos fijos, el bloque como efecto aleatorio y la fecha de parto como covariable. En el Exp. 2, el modelo incluyó los tratamientos, como efectos fijos y el bloque como efecto aleatorio. La separación de medias se realizara mediante el test

de Tukey con $P < 0.05$. Las relaciones entre las variables serán estudiadas mediante los procedimientos CORR y REG.

RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados de este trabajo permitirían mejorar el entendimiento de las relaciones entre el estatus metabólico y las respuestas fisiológicas, así como comprender los mecanismos moleculares que regulan la adaptación hepática al balance energético y los cambios endometriales durante el ciclo estral, constituyendo temas prioritarios de investigación en la vaca leche en lactación. La caracterización a nivel molecular de las alteraciones en estas vías, aportará al desarrollo de intervenciones nutricionales/farmacológicas destinadas a minimizar la pérdida de funcionalidad hepática de las vacas lecheras y a mejorar sus posibilidades de adaptación a las situaciones de balance energético negativo. Si bien, el proyecto apunta fundamentalmente al sector pecuario, los conocimientos generados y metodologías utilizadas podrán ser transferidos a otras áreas del sector agropecuario. Es importante destacar que este proyecto de Doctorado en Ciencias Agrarias permitirá la interacción con distintos investigadores y estudiantes de pregrado y posgrado durante la ejecución del mismo.

ESTRUCTURA PROBABLE DE LA TESIS

El objetivo es publicar como mínimo 3 artículos científicos en revistas arbitradas internacionales, uno de los cuales está en proceso de escritura.

1. Astessiano A.L, Chilibroste P, Fajardo M, Laporta J, Gil J, Mattiauda D.A, Meikle A, Carriquiry M. Metabolic and endocrine profiles and hepatic gene expression of Holstein cows with different nutritional managements during early lactation
2. Astessiano A.L, Chilibroste P, Mattiauda D.A, Adrien. L, Ambrossi V, Meikle A, Carriquiry M. Endometrial expression of genes related to the IGF and energy homeostasis in multiparus dairy cows.
3. Astessiano A.L, Chilibroste P, Mattiauda D.A, Quijano C , Cassina A, Meikle A, Carriquiry M. Impact of negative energy balance on mitochondrial function and oxidant-dependent formation of fatty acids in liver of dairy cows during early lactation.

BIBLIOGRAFÍA PERTINENTE

- Acosta et al., 2010, Serie Actividades de Difusión No. 610. San José. p 55-62.
- Adrien, M.L. et al. 2011. *Animal*. -10-30788.
- Adrien, M. L. et al. 2012. *Animal* 6 (2): 292-299.
- Aiello, C. et al. 1984. *J Dairy Sci.* 67 (8):1707-15.
- Ashworth C.J. 1995. *Livestock Production Science* 44 99-- 105
- Astessiano A.L et al., 2011. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2012.
- Astessiano A.L. 2011. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, UdelaR.
- Bach, A. 2001. XVII Curso de Especialización FEDNA. España.
- Bauman, D.E. 2000. p. 331. CABI Publishing, New York, NY.
- Bell, A.W. 1995. *J. Anim . Sci.* 73:2804-2819.
- Bell, A.W. and D.E. Bauman. 1997. *J Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 2:265-78.
- Butler, S.T, et al., 2003. *Journal of Endocrinology* 176, 205–217.
- Carriquiry, M et al. 2010. *J. Dairy Science*, v. 93 E-Suppl 1, p. 390-, 2010.
- Carriquiry, M. et al. 2009. *J. Dairy Sci.* 92:4889-4900.
- Carriquiry M. et al 2012. 17th International Congress on Animal Reproduction.
- Cavestany, D et al., 2005. *J. of Veterinary Medicine Series A*, 52: 1-7.

Cavestany, D et al., 2009. *Anim Reprod Sci.* 114(1-3):1-13.

Cavestany, D et al., 2009b. *Anim Reprod Sci.* 44(4):663-71.

Chilibroste et al. 2004. *Revista Argentina de Producción Animal.* Vol. 24. Supl.1.

Chilibroste et al., 2010. In: *An overview of research and pastoral-based system in the Southern part of South America.* Ed. Machado, C., Wade, M. Carneiro Da Silva, S.,

Chilliard et al. 1998. *Reprod Nutr Dev.* 38(2): 131-152.

De Craemer, D. et al. 1994. *J. Lip. Res.* 35: 1241-1250.

Delavaud, C et al. , 2000. *J Endocrinol.* 165(2): 519-526.

DIEA 2009. *Anuario Estadístico Agropecuario.*

Doepel, L. et al., 2002. *J Dairy Sci* 2002; 85:2315–34.

Edmonson, A.J et al., 1989. *J. Dairy Sci.* 72: 68- 78.

Etherton, T.D and D. E. Bauman. 1998. *Physiol. Rev.* 78:745–761.

Fleming, T.P et al. 2004. *Biol Reprod* 71,1046–1054.

Ge, F et al., 2005. *J. Lipid Res.* 46:1484–1490.

Geisert RD, et al 1991. *Biol Reprod* 1991,45:975.

Goff AK. 2002. *Reproduction in Domestic Animals.* V 37,p 133–139.

Gong, J.G. 2002. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:229–241.

Grala, T.M, et al., 2011. *J. Dairy Sci.* 94(1):303-15.

Greenfield, R.B. et al. 2000. *J. Dairy Sci.* 84:1228–1236.

Grum, D.E. et al., 1994. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B:281–92.5

Grummer, R.R., and R.R. Rastani, 2004. *J. Dairy Sci.* 87 :(E. Suppl.):E77–E85.

Han VKM, et al, 1987. *Science* 236: 193.

Hanson, R.W and L. Reshef. 1997. *6 Annu. Rev. Biochem.* 66:581–611.

Hartwell, J.R et al., 2001. *J. Dairy Sci.* 84:490-497.

Jiang, H. et al., 2005. *J Dairy Sci* 88:1370-7.

Karcher, E.L et al., 2007. *J Anim Sci* 85:690-699.

Kim, J.W et al., 2010. *Biochem. J.* 346:603–610.

Kirby CJ, et al. 1996. *Biol Reprod*, 55:996.

Kobayashi, Y. et al., 1999. *Endocrinology.* 1999 Sep; 140(9):3947-54.

Kubota, N. et al., 2007. *Cell Metab.* 2007; 6:55-68.

Laporta J. et al. 2011. *Joint Annual Meeting ADSA-AASAS.* NO, Louisiana. July 10-14

Lemor, A. et al., 2009. *Domestic Animal Endocrinology* 37: 37–44.

Loor J et al., 2007. *Physiol. Genomics* 32:105–116.

Loor J et al., 2010. *Animal* 4:1110-1139.

Loor, J et al., 2005. *Physiol Genomics.* (23): 217–226.

Loor, J et al., 2006. *Physiol Genomics* 2006; 27:29–41.

Louet, J.F. et al., 2001a. *Biochem. J.* 354:189– 197.

Lucy, M.C. 2000. *J. Dairy Sci.* 83:1635-1647.

Lucy, M.C., 2003. *Reprod. Suppl.* 61, 415–427.

Lucy, M.C. 2008. *Reproduction Domestic Animal.* (43):31-9.

Lucy, M.C. et al., 2009. *J Dairy Sci.* 92(2):526-39.

Mamedova, L.K. et al., 2011. *J. Anim. Sci.* 2010. 88:124–130.

Martal, J. 1997. *Reprod.Fertil.Dev.* 9:355.

Martin, G.B y Kadokawa,H. 2006. *J. Reprod. Dev.* 52: 145-152.

Mashek, D.G et al., 2001. *Domestic Animal Endocrinology* 2001; 21:169–185.

McCarthy et al., 2010. *Physiological Genomics* 2010; 42A3:188-99.

McCarthy S. et al 2012. *Genomics* 44:130-- 140.

Meikle, A. et al., 2004. *Reproduction* 127:727-737.

Mendoza, A. et al., 2008. *Livestock Science*, v.: 119, p.: 183 - 193, 2008.

Mitchell, M et al. 2005. *Reproduction* 130:583–597

Mizutani, H. et al., 1999. *Vet Res Commun* 23(8):475-80.

Orcasberro, 1994. *Serie Técnica N° 13:* 158-169.

Oyhantçal W et al. 2009. *Anuario OPYPA.*
<http://www.mgap.gub.uy/opypa/PUBLICACIONES/Publicaciones.htm>

Park, E.A. et al., 1998. *Biochem. J.* 329: 217– 224.

Pereira, I. et al., 2010. *Proceedings of the New Zealand Soc.of Ani. Prod.* V70: 306-10.

Piot, C. et al., 1998. *Comp. Biochem. Physiol.* 121B:185–194.

Prins y Van Langevelde, 2008. *Resource Ecology.* Springer, Dordrecht, The Netherlands, 304 p

Quintans et al., 2004. *Animal Reproduction Science.* (80):5-14.

Quintans et al., 2010. *Animal Production Science.* (50): 931–938.

Raddatz, J. et al., 2008. J Anim Sci. 86 (E-Suppl 2).
 Renaville, R, et al., 2002. Dom Anim Endocrinol 23:351-360.
 Rhoads, R.P et al., 2007. J. Endocrinology. (195):49–58.
 Rhoads, R.P. et al., 2004. J. Nutr. 134: 1020–1027.
 Roberts, A.J et al., 1997. J. Anim. Sci. 1997. 75:1909–1917.
 Santos, J.E.P. et al. 2004. Anim. Reprod. Sci. 82--- 83C:513--- 535.
 Schoenle E, et al 1982. Nature 1982,296:252.
 Sosa C, et al 2009. Reproduction Fertility and Development, v 29 7, p 869 – 881.
 Sosa C, et al 2010. Animal Reproduction Science, V 22 3-4 208, p:214
 Schneider, A.L et al., 2010. Pesq. agropec. bras. (online), vol.45, n.8, pp. 925-931.
 Seal, C. J. & Reynolds, C. K. 1993. Nutrition Research Reviews 6, 185-208.
 Spencer T.E., et al 2004. Anim Reprod Sci Vol. 82, pp. 535-550.
 Stipanuk, M.H. 2001. 11 Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
 Takemura Y et al 2006. Endocrinology ;147:3203--- 321,
 Thatcher, W.W. et al., 2003. Reprod. Suppl.61:253-256.
 Thorn, S.R. et al., 2008 Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008; 295:1455–62.
 van Dorland, H.A, et al., 2009. J. Dairy Sci. 92:1924–1940.
 Vidal M.E. 2009. Anuario OPYPA
[.http://www.mgap.gub.uy/opypa/PUBLICACIONES/Publicaciones.htm](http://www.mgap.gub.uy/opypa/PUBLICACIONES/Publicaciones.htm)
 Vizcarra et al., 1986. Investigaciones Agronómicas (7): 45–47.
 Yang, W.S. et al., 2001. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2001; 86: 3815-3819.

CRONOGRAMA TENTATIVO

	Año 1 (bimestres)						Año 2 (bimestres)						Año 3 (bimestres)					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Revision bibliografica	X	X																
Preparacion, presentacion y defensa del Proyecto de Doctorado	X	X	X															
Resumen de datos de campo de Exp 1	X	X																
Fase experimental Exp. 2	X	X																
Puesta a punto metodología, transcriptos - curvas standard			X															
Resumen de datos de campo de Exp 2			X	X														
Determinación de metabolitos y hormonas (Exp 1)			X	X														
Curso CHEA, acreditacion				X														
Extraccion de ARNm, ADNase (Exp 1)			X	X	X													
Curso de actualizacion			X	X														
Procesamiento de muestras por RT-PCR en tiempo real (Exp 1)			X	X														
Análisis estadísticos de los datos e interpretación de los resultados, transcriptos (Exp 1)			X	X			X											
Resumen de los datos (Exp 1)							X	X										
Presentacion de datos preliminares en Congreso Internacional (Exp 1)									X									
Escritura y Publicacion Articulos científicos (Exp 1)							X	X	X									
Presentacion resultados obtenidos en Seminario									X									
Determinación de metabolitos y hormonas (Exp 2)							X	X										
Extraccion de ARNm, ADNase (Exp 2)									X	X								
Procesamiento de muestras por RT-PCR en tiempo real (Exp 2)									X	X	X							
Pasantia (puesta a punto de metodologias)									X	X								
Curso de actualizacion									X	X								
Presentacion de datos preliminares en Congreso Internacional (Exp 2)									X									
Análisis estadísticos de los datos e interpretación de los resultados, transcriptos (Exp 2)									X	X	X							
Resumen de los datos													X	X				
Presentacion de datos finales en Congreso Internacional														X				
Escritura y Publicacion Articulo científicos (Exp 2)														X	X	X		
Presentacion resultados obtenidos en Seminario															X			
Preparacion de tesis															X	X		
Defensa Final de tesis																	X	

EXPLICITACIÓN DE LA ORIGINALIDAD DEL TRABAJO

- Contribución al avance del conocimiento científico (aporte original)

Este proyecto profundizará/complementará una línea de trabajo desarrollada por investigadores de las Facultades de Agronomía y Veterinaria en colaboración con investigadores de otras instituciones nacionales e internacionales en búsqueda de un abordaje comprensivo e interdisciplinario que viabilice propuestas innovadoras tácticas y estratégicas que permitan controlar el comportamiento productivo y reproductivo de vacas de leche en condiciones pastoriles y los desafíos de naturaleza variable a los que se enfrenta. En particular, a nivel nacional los antecedentes sobre la aplicación de las herramientas de biología molecular a la investigación en producción de leche son incipientes. En el mismo sentido, Lucy (2003) sugiere, que las soluciones para el manejo de la reproducción posparto surgirán de una variedad de abordajes que incluyan tanto la fisiología tradicional como la genómica moderna y las tecnologías proteómicas. Es así que este trabajo se enmarcará en el área de la comprensión de los mecanismos que regulan la partición de nutrientes y la homeostasis del metabolismo energético en vacas de leche en respuesta a diferentes estrategias de alimentación, relacionado estos mecanismos con las respuesta productivas y reproductivas. A su vez, permitiría la identificación de genes candidatos que podrían ser utilizados en una etapa posterior para la generación de herramientas biotecnológicas en la selección de los animales. Por último, la generación de información básica y aplicada permitirá trazar la dirección hacia una producción "limpia, verde y ética" (Martin y Kadokawa, 2006).

- Contribución a la formación de Recursos Humanos

En el marco del proyecto se prevén realizar tesis de grado de las Facultades de Agronomía y Veterinaria. Además forma parte de una beca de iniciación ANII 2012.

- Contribución a la respuesta / satisfacción de necesidades de nuestra sociedad:

La información generada permitirá mejorar

- Transferencia / difusión de los resultados

Se procederá a la redacción de tres artículos a ser publicados en revistas arbitradas de carácter internacional. La información ha sido y será presentada en seminarios internos, cursos de grado y postgrado, congresos nacionales e internacionales.

FACTIBILIDAD Y FACILIDADES

Los trabajos de campo se realizaron en la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía (EEMAC) y el procesamiento de las muestras y la determinación de metabolitos y hormonas se realizarán en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía y el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria. También se procesaran muestras en Laboratorio de Oncología Básica y Biología Molecular (LOBBM) de la facultad de Medicina, donde se realizará una pasantía con las Doctoras Celia Quijano y Adriana Cassina.