

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE AGRONOMIA

DOCTORADO EN CIENCIAS AGRICOLAS

**EFFECTO DEL MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL
TEMPERAMENTO DE VACAS F1 HOLSTEIN X BRAHMAN EN EL
TROPICO**

Karin Drescher de Rodríguez

Mayo, 2016

A continuación se presenta el trabajo de Grado titulado "**EFECTO DEL MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO DE VACAS F1 HOLSTEIN X BRAHMAN EN EL TROPICO**" para optar al Título de Doctor en Ciencias Agrícolas

Noris Roa
Tutora

Ana Zuley Ruiz
Asesora

Miguel Benezra
Asesor

AGRADECIMIENTO

A mi Dios... Omnipotente, Omnipresente... sin Ti, Tú Bendición, Tú Cobijo, Tu Fortaleza, Tu Motivación... imposible para mí...

A mi familia, incondicional apoyo, mi esposo, mi madre, mis tres maravillosos hijos, sólo ellos saben de las ausencias, en mente aún con cuerpo presente, por lo que el logro es colectivo... Unos por motivación, otros por soporte de roles, a veces compañero de trabajo de campo y gabinete. A mi padre[†] siempre organizado, perfeccionista y soñador...

A mi Tutora, quien siempre con mente clara y precisa no tuvo problema en confrontarme ante el romanticismo científico que me caracteriza. Gracias por la exigencia y el apoyo permanente.

A los Directivos de la empresa INVEGA por creer en el proyecto y su aporte a la ganadería tropical. A José Félix Avellaneda, Garvis, Yeili, Wisyolib, William, Esperanza, Yomaira, Sonia, trabajadores pertenecientes al Hato Barrera CA.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Institución pilar para el desarrollo de este trabajo gracias al financiamiento en el marco del Proyecto “Desarrollo de marcadores moleculares en la identificación de secuencias de ADN de genes de importancia agronómica para utilizar en la selección de plantas y animales” parte del Convenio Bilateral Venezuela-Belarus, sus instalaciones, equipos del Laboratorio de Reproducción y el personal que lo conforma: Sres. Pablo Martínez y Andrés Delgado, siempre dispuestos a compartir más allá del trabajo técnico, realizado con dedicación, respeto y disposición.

Al Comité Asesor, que incorporaron reflexiones y detalles importantes para un trabajo de calidad.

A D’Endel D’Enjoy, Médico Veterinario, investigador de gran profesionalismo y mayor calidad humana, un docente a campo, un amigo.

Al Profesor Nelson Martínez, dispuesto a la crítica constructiva, discusión de trabajo y apoyo logístico desde el Laboratorio de Estudios en Fisiología de los Animales Domésticos en el Trópico (LEFADOT, FAGRO-UCV), que entre otros, contribuyó con un personal Técnico de excelencia, Sr. Jesús Pineda y TSU. Delfín Perozo.

A la Profa. Maritza Romero, su apoyo a través de la Coordinación de Extensión y al chofer, técnico de campo y alumno Sr. Publio García, todo un torbellino de energía en colaboración.

A los estudiantes de la Facultad de Agronomía, Mención Zootecnia, S. Heneka, O. Malpica, L. Martínez y J. Ovalles y C. Naranjo becarios-ayudantes del LEFADOT

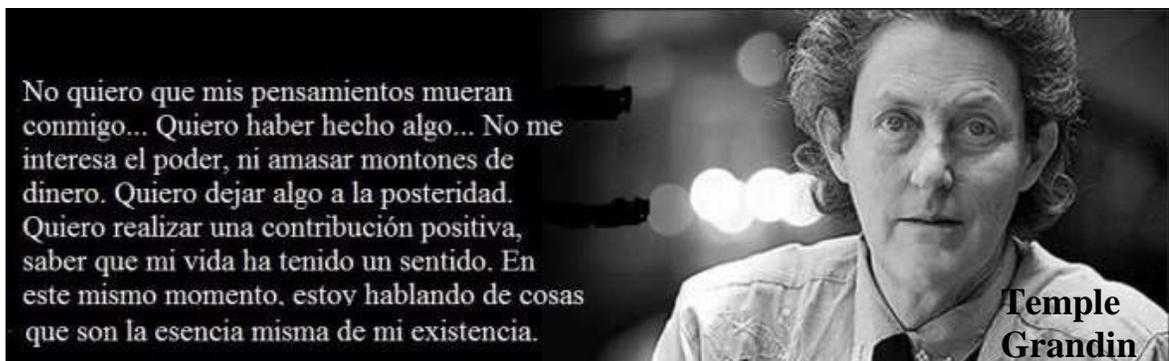
Agradecer a los ausentes localmente de hoy, pero muy presentes desde el ayer y por siempre: Lucia Pearson de Vaccaro:¿hacia quién? ¿Para qué?¿Por qué?, lo cual indudablemente sirvió de alguna base filosófica de la investigación para el desarrollo; Leopoldo Gabaldón, con su sarcasmo “no veas el ovario, vé la vaca!”, Jorge Ordoñez, duro formador, retador, pero a la vez amable y sincero colaborador e impulsor!, Jorge Combellas, un apasionado de la vaca y su cría en el trópico

A mi Casa Vencedora de Sombras que forja voluntades y promueve oportunidades!

DEDICATORIA

A mi tolerante, paciente, amorosísima y sacrificada familia...

A tod@s, cualquiera sea la posición que ocupen,
que el trabajo sea útil, pertinente, creativo, innovador, analítico, alternativo,
perseverante,
ético, responsable, humilde, dispuesto, diligente, holístico y profundo,
todo ello les hará crecer como seres humanos y les permitirá ir alcanzando sus
utópicos sueños.



INDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO

Página

RESUMEN	1
ABSTRAC	3
I. INTRODUCCION	5
II. OBJETIVOS	7
GENERAL	
ESPECIFICOS	
III. HIPOTESIS	8
IV. REVISION DE LITERATURA	9
ETOLOGIA, COMPORTAMIENTO Y APRENDIZAJE	9
Visión y distancia de fuga del vacuno al humano	14
Interacción Humano – Animal: Condicionamiento, Aprendizaje, Marcaje de Conductas	16
Etograma	20
FISIOLOGÍA DEL COMPORTAMIENTO ANIMAL	23
Docilidad, ansiedad, socialización	23
Miedo, estrés, comportamiento defensivo	25
FISIOLOGIA DE LA EYECCIÓN LÁCTEA	26
Neuroendocrinología y factores que afectan la eyección láctea en vacunos mestizos en el trópico	27
FISIOLOGIA DEL REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA	32
Neuroendocrinología y factores que afectan el reinicio de la actividad ovárica en vacunos mestizos en el trópico	32
V. MATERIALES Y MÉTODOS	40
V.1. EFECTO DE TRES DIFERENTES TIPOS DE MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN Y REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MANUAL Y CON CRIA AL PIÉ	40
Ubicación	40
Animales y manejo	40
Duración del estudio	42
Diseño experimental	42
Tratamientos	43
Variables evaluadas	44
Control	44
Temperamento	45
Eyección Láctea	49
Reinicio de Actividad Ovárica	51
Hormonas	52
V.2.EFECTO DE DOS DIFERENTES TIPOS DE MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN Y REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MECANIZADO Y SIN CRIA AL PIÉ.	57
Ubicación	58
Animales y manejo	58
Duración del estudio	60

Diseño experimental	61
Tratamientos	61
Variables evaluadas	62
Control	63
Temperamento	63
Eyección Láctea	63
Reinicio de Actividad Ovárica	66
Hormonas	67
Análisis Estadístico	67
VI. RESULTADOS	71
VI.1. EFECTO DE TRES DIFERENTES TIPOS DE MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN Y REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MANUAL Y CON CRIA AL PIE	71
Control	71
Temperamento	71
Eyección láctea	80
Reinicio de actividad ovárica	87
Hormonas	91
VI. 2. EFECTO DE DOS DIFERENTES TIPOS DE MANEJO DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN LÁCTEA Y REINICIO DE ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MECANIZADO Y SIN CRIA AL PIE	95
Control	95
Temperamento	96
Eyección láctea	100
Reinicio de actividad ovárica	106
Hormonas	109
VII. DISCUSION	114
VII.1. EFECTO DE TRES DIFERENTES TIPOS DE MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN LÁCTEA Y REINICIO DE ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MANUAL Y CON CRIA AL PIE	114
VII.2. EFECTO DE DOS DIFERENTES TIPOS DE MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN LÁCTEA Y REINICIO DE ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MECANIZADO Y SIN CRIA AL PIE	131
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	145
IX. CONCLUSIONES	152
X. RECOMENDACIONES	154
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
XII. ANEXOS	180
ANEXO 1. Calibración del equipo MilkoTester ®	180
ANEXO 2. Validación del kit ELISA para la determinación de cortisol en humanos y cerdos para el uso en vacunos	184

ANEXO 3. Validación de kit ELISA para la cuantificación de oxitocina en leche de vaca	192
ANEXO 4. Validación de kit ELISA de Progesterona en suero humano para uso en vacunos	200

INDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
1	Valores de la prueba de Reactividad en el Brete para hembras vacunas cruzadas según el periodo evaluado y tratamiento considerado	74
2	Frecuencia (%) de actividades realizadas por las vacas durante el ordeño y de acuerdo a los tratamientos de manejo gentil humano – animal durante el parto de las novillas	78
3	Frecuencia (%) de actividades realizadas por la cría inmovilizada a un lado de su madre y durante el ordeño según los tratamientos de manejo gentil humano - animal durante el parto aplicado a las novillas.	79
4	Correlación de actividades realizadas por la madre, la cría y en interacción durante el ordeño (posterior a la eyección láctea)	80
5	Tiempo promedio (MMC \pm EE) de actividades durante la labor del ordeño, matutino y vespertino, y según los tratamientos a que fueron sometidas las vacas primíparas en su parto.	81
6	Valores promedio (MMC \pm EE) para las fracciones de leche evaluadas hasta los 90 días de lactancia de acuerdo a los tratamientos implementados durante el parto de hembras vacunas F1	83
7	Valores relacionados a la composición de la leche (%) (MMC \pm EE) para las fracciones muestreadas y según los tratamientos aplicados a las hembras F1 de primera lactancia	85
8	Contenido de grasa (%) en la leche vendible de la mañana (MMC \pm EE) según los días postparto evaluados.	86
9	Cantidad promedio (MMC + EE) de folículos presentes a los 90 d postparto según su clase y de acuerdo a los tratamientos	

	evaluados	88
10	Cantidad promedio de folículos (MMC \pm EE) de acuerdo a los días postparto	89
11	Valores promedio (MMC \pm EE) de la concentración de Cortisol (pg/mL) para hembras vacunas sometidas a tratamiento gentil preparto según los periodos de muestreo pre y postparto.	91
12	Concentración promedio (MMC \pm EE) de oxitocina (pg/mL) basal o como área bajo la curva según los tratamientos preparto de las vacas.	92
13	Concentraciones de Progesterona (P ₄) sérica (ng/mL) en vacas primíparas sometidas o no a manejo gentil preparto y ordeño manual con presencia de la cría al pie.	94
14	Valores de la prueba de Reactividad (MMC \pm EE) en el Brete para hembras vacunas cruzadas según el periodo evaluado y tratamiento considerado	98
15	Frecuencia (%) de actividades realizadas por la cría inmovilizada a un lado de su madre y durante el ordeño según los tratamientos de manejo gentil preparto aplicado a las novillas gestantes.	100
16	Tiempo promedio (MMC \pm EE) de actividades durante la labor del ordeño, matutino y vespertino, y según los tratamientos a que fueron sometidas las vacas primíparas en su preparto.	101
17	Valores promedio (MMC \pm EE) para las fracciones de leche evaluadas hasta los 90 días de lactancia de acuerdo a los tratamientos implementados durante el preparto de hembras vacunas F1 bajo ordeño mecanizado sin cría al pie.	102
18	Valores relacionados a la composición de la leche (%) (MMC \pm EE) para las fracciones muestreadas y según los tratamientos aplicados a las hembras F1 de primera lactancia	

		105
19	Cantidad promedio (MMC + EE) de folículos presentes según su clase y de acuerdo a los tratamientos evaluados	107
20	Cantidad promedio de folículos (MMC ± EE) de acuerdo a los días postparto	108
21	Valores promedio (MMC ± EE) de la concentración de Cortisol (pg/mL) para hembras vacunas sometidas a tratamiento gentil preparto según los periodos de muestreo pre y postparto.	110
22	Concentración promedio (MMC ± EE) de oxitocina (pg/mL) basal o como área bajo la curva según los tratamientos preparto de las vacas	111
23	Concentraciones de Progesterona (P ₄) sérica (ng/mL) en vacas primíparas sometidas o no a manejo gentil preparto y ordeño mecanizado sin presencia de la cría	113

INDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1a	Capacidad visual, zona ciega	15
1b	Diagrama de la zona de fuga en el vacuno	15
2	Sujeción de la vaca y su cría en el corral de ordeño	47
3	Detalle de la entrada a la sala de ordeño mecanizada contigua a corral de alimentación pre-ordeño	60
4	Reactividad en el Brete (REAC) según el tratamiento aplicado a las novillas gestantes.	72
5	Frecuencia de la prueba de Reactividad en el Brete (REAC) según el tratamiento considerado.	73
6	Curva de Supervivencia para la Prueba de Reactividad en el Brete de hembras vacunas sometidas a tratamientos de manejo gentil humano – animal	75
7	Secuencia de actividades comportamentales en las primeras 48 horas postparto.	76
8	Producción promedio de leche total (Kg/día) (fracciones de leche vendible + leche consumida por la cría en cada ordeño) hasta 90 días de lactancia y según los tratamientos preparto de las vacas.	84
9	Producción total de leche corregida por grasa (4%) (LT4%) hasta 90 días de lactancia y según los tratamientos aplicados a las vacas en el preparto	87
10	Gráfica de la función de Hazard para la Prueba de Supervivencia de Kaplan-Meir de los folículos clase 2 ($FC2=6-9$ mm) y clase 3 ($FC3\geq 10$ mm) en función de los días postparto y según los tratamientos.	90

11	Concentración de oxitocina (pg/mL) en muestras de leche de vacas primíparas bajo ordeño manual con cría al pie y aplicación de tratamientos parto de manejo gentil humano – animal.	93
12	Promedio general \pm SE de los valores de Reactividad en el Brete (REAC) en hembras F1 según el tratamiento aplicado en el parto	96
13	Frecuencia de valores de la escala de medición de la prueba de Reactividad en el Brete (REAC) según el tratamiento considerado	97
14	Curva de Supervivencia para la Prueba de Reactividad en hembras vacunas sometidas a tratamientos de manejo gentil humano – animal	99
15	Producción promedio de leche vendible total (L/día) según los periodos de lactancia y los tratamientos parto aplicados a las vacas	103
16	Producción total de leche hasta 90 días de lactancia y según los tratamientos parto aplicados a las vacas	104
17	Gráfica de la función de Hazard para la Prueba de Supervivencia de Kaplan-Meier para los folículos clase 3 ($FC3 \geq 10$ mm) y cuerpos lúteos (CL) en función de los días postparto y según los tratamientos	109
18	Concentración de oxitocina (pg/mL) en muestras de leche de vacas primíparas bajo ordeño mecanizado sin cría al pie y previa aplicación de tratamientos de manejo gentil parto	112
19	Modelo para las interacciones humano animal relacionadas con el parto, parto y postparto reciente en la vaca y su cría y sus relaciones de temperamento, eyección láctea y restablecimiento de la actividad reproductiva.	150

RESUMEN

La producción de leche en el trópico afronta el desafío de utilizar animales cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*) de comportamiento reactivo. Con el propósito de evaluar el temperamento, eyección láctea y reinicio de la actividad reproductiva en vacas cruce y primíparas en condiciones tropicales sometidas a diferentes manejos de la relación humano - animal en el parto se diseñaron dos experimentos (E). Para E1 se utilizaron 28 novillas F1 (Holstein x Brahman) preñadas y se distribuyeron en 3 grupos para aplicar los tratamientos: SM= Sin contacto humano personalizado, PSO = Manejo gentil sin contacto humano personalizado y CE= Manejo gentil con contacto personalizado de cepillado corporal de 10 min/d desde \pm 47 d parto; al parto se aplicaron dos ordeños/d de forma manual, con cría al pie y amamantamiento restringido. En el E2 (n=38) se aplicó SM y CE desde el \pm 49 d parto; al parto, el ordeño fue mecánico, sin cría presente ni amamantamiento. Se cuantificaron variables de temperamento (conducta y reactividad; COND y REAC respectivamente), relacionadas a la eyección (tiempo de estimulación, tiempo de ordeño, leche vendible, leche consumida por la cría, leche residual, componentes lácteos, entre otros), reproductivas (reinicio actividad ovárica) (RAO) y endocrinas (cortisol, oxitocina y progesterona; CORT, OT y P₄ respectivamente). CE no evidenció ($p>0,05$) elevación de los niveles basales de OT más si afectó CORT ($p<0,05$) de forma diferencial según el avance de la lactación. CE afectó positivamente las relaciones epiteléticas y et-

epimeléticas (COND) y redujo la REAC ($p < 0,01$), gradualmente en el tiempo. En E1 el tiempo de ordeño (TO) matutino estuvo a favor de CE ($p < 0,01$) para la mayor remoción de leche vendible, en E2 se afectaron positivamente TO matutino y vespertino ($p < 0,05$). La cantidad de leche vendible/d y hasta 90 d de lactación fue afectada positivamente ($p < 0,05$) por CE, en ambos E, al igual que se disminuyó la cantidad de leche remanente en la ubre postordeño ($p < 0,05$). El área bajo la curva de OT fue afectada favorablemente por CE ($p < 0,05$) en ambos E. Se presentaron variaciones en componentes lácteos de interés debidos a CE, con distinto efecto según el tipo de ordeño.

En E1 el CE produjo +123 Kg leche corregida al 4% hasta 90 d lactación que SM y PSO ($p < 0,05$). En E2 +178 L de leche hasta 90 días de lactación fueron producidos a favor de CE ($p = 0,11$). RAO y P_4 no fueron afectados por tratamientos. Fue posible modificar positivamente la conducta de novillas gestantes cruzadas, *Bos taurus* x *Bos indicus*, a través del manejo gentil personalizado y con ello disminuir el estrés y temperamento reactivo causado por el cercano manejo humano durante el ordeño de la primera lactancia y condicionar favorablemente la mayor eyección láctea, independientemente del sistema de ordeño aplicado y la presencia o no de la cría al pie. Los beneficios de la práctica parto se extendieron hasta al menos los 90 d de lactación.

ABSTRACT

Milk production at tropic conditions confronts the challenge of use crossbreed cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*) with reactivity behaviour. With the aim to evaluate different human gentle handling effect in crossbred primiparous cow's two assays (E) were conducted. The effect of gentle handling on temperament, milk ejection and ovarian resumption process were considered. Twenty eight pregnant heifers were assigned at three treatments in E1: SM= non-human gentle handling, PSO= gentle handling without human personalized contact, CE= gentle handling and human personalized contact by corporal brushing (10 min/d); all treatments start at \pm 47 d prepartum. At calving, handling milking was applied twice and with calf presence, pre-milking and post-milking suckling. In E2, SM and CE were applied on 38 pregnant heifers; both treatments start at \pm 49 d pre-partum. At calving, mechanical milking was applied twice and without calf presence or suckling. Variables related with behaviour (conduct and reactivity; COND and REAC), milk ejection (stimulation time, milking time, saleable milk, calf consumed milk, residual milk, milk composition, etc.), reproduction (ovarian resumption; RAO) and endocrine process (cortisol, oxytocin and progesterone; CORT, OT and P₄) were measured. OT basal level was equal in all animals ($p>0,05$) independent of treatment or E. CE caused effect on CORT ($p<0,05$) depending of lactation d. CE favoured epimeletic and et-epimeletic behaviour ($p<0,05$), COND relationships ($p<0,05$) and reduce

REAC ($p < 0,05$). The morning milking time was longer by CE in E1; morning and afternoon milking time were longer by CE in E2. Consequently, more saleable milk per d ($p < 0,01$), and at 90 d ($p < 0,05$) were obtained. Milking efficiency was improved in both E due to CE effect ($p < 0,05$). The OT area under the curve was affected positively by CE ($p < 0,05$) in both E. Milk components were affected by CE ($p < 0,05$) but differentially between E. CE produce +123 milk (fat corrected at 4%) kg at 90 lactation d than SM and PSO ($p < 0,05$) in E1, while in E2 +178 L represented only a tendency ($p = 0,11$). RAO or P_4 were not affected by treatments. Concluding, it was possible to alter the behaviour of pregnant crossbred heifers through gentle handling and human – animal personalized contact and decrease the stress caused by the first lactation milking period and condition better milk ejection, independently of manual or mechanical milking system or presence or absence of the calf. The benefits of the prepartum practice extend until almost 90 d of lactation.

I. INTRODUCCION

El conocimiento del comportamiento de una especie de interés zootécnico es fundamental para el desarrollo de estrategias precisas de manejo productivo que permitan satisfacer las necesidades humanas de cantidad y calidad de alimentos protéicos, basados en principios del Bienestar Animal.

En Venezuela, a diferencia de otros países latinoamericanos tropicales y subtropicales (Colombia, Brasil, Uruguay, Argentina, entre otros), es muy poco lo que se ha investigado en términos de descifrar códigos de conducta animal, aprendizaje, entrenamiento y/o marcaje de conductas asociado a parámetros fisiológicos y productivos en grandes rumiantes. Estos códigos de comportamiento pueden ser indicadores sencillos y clave para el personal que labora a diario con los animales y para los profesionales que persiguen resultados óptimos según alternativas tecnológicas implementadas (p.e. confinamiento en corrales, áreas de pastoreo, sistemas de ordeño, sistemas de apareamiento – bioestimulación, monta natural o artificial-, transporte, entre otras). Los desajustes fisiológicos, disminución del consumo, inhibición de la eyección láctea, retraso en reinicio de actividad ovárica, aislamiento, agresividad, entre otros, pueden ser prevenidos con conocimiento preciso de las conductas del animal, según su especie y grupo racial (Bar Peled *et al.*, 1998; Kofman, 2002; Bruckmaier *et al.* 2005; Jensen, 2006; Aleman *et al.*, 2008;

Bertenshaw *et al.*, 2008; Bertenshaw y Rowlinson, 2009; Cooke *et al.* 2009; Churchland y Winkielman, 2012; Ceballos, 2014). Novillas de producción de carne con bajos índices de agresividad durante el manejo rutinario han demostrado ser más productivas, tanto por sus mejores índices en reproducción, como comportamiento materno-filial al parto, habilidad para el amamantamiento de la cría y producción de leche (Phocas *et al.*, 2006). Es así, como familiarizar al animal con rutinas y más aún el manejo gentil humano – animal (marcaje de relaciones positivas) puede, de forma económica, representar una alternativa tecnológica viable en los sistemas de producción, con beneficios a largo plazo (Aleman *et al.*, 2008).

Sin el conocimiento etológico y las causas y/o patrones fisiológicos específicos que condicionan las respuestas, el desarrollo y la aplicación de tecnologías puede ser errado y sus consecuencias nefastas para el negocio agrícola.

Así, el presente trabajo persiguió evaluar el efecto del manejo gentil humano - animal durante el pre-parto de hembras primíparas y cruzadas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) sobre el temperamento, comportamiento conductual, eyección láctea y reinicio de la actividad reproductiva en condiciones tropicales; bajo este enfoque, cruce animal y técnicas involucradas es inexistente literatura tropical. Sin embargo, más que pretender cerrar un círculo en la investigación, éste trabajo hace aportes inéditos en la fisiología del comportamiento y la producción que afianza una línea de investigación necesaria en la ganadería vacuna tropical.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Efecto del manejo gentil durante el parto sobre el temperamento de vacas F1 Holstein x Brahman en el trópico

ESPECIFICOS

Evaluar el efecto del manejo gentil humano – animal durante el parto de la novilla F1 Holstein x Brahman sobre:

1. La reactividad, conducta y fisiología del comportamiento de la novilla, la vaca de primer parto y su cría durante la primera fase de la lactancia.
2. La producción de leche, eyección láctea y composición de la leche de la vaca de primer parto durante la primera fase de la lactancia.
3. El reinicio de la actividad ovárica de la vaca de primer parto.
4. La concentración de cortisol, el nivel basal de oxitocina y su descarga durante el ordeño en la vaca de primer parto durante la primera fase de la lactancia.

III. HIPOTESIS

El manejo gentil humano – animal de la novilla preñada elevará los niveles basales de oxitocina y disminuirá la concentración del cortisol posterior a la implementación de la práctica, con ello, después del parto la sociabilidad de la vaca y su cría aumentará entre ellos y con el humano, y por la elevada y sostenida liberación de oxitocina durante el ordeño se optimizará la eyección láctea, removerán cantidades de leche de adecuada composición química y, a su vez, por vía del menor estrés asociado a los bajos niveles de cortisol, se disminuirá la supresión del reinicio de la actividad ovárica en la vaca primípara F1 *Bos taurus* x *Bos indicus* con o sin cría al pie durante el ordeño manual o mecanizado.

IV. REVISION DE LITERATURA

ETOLOGIA, COMPORTAMIENTO Y APRENDIZAJE

Desde finales del siglo XIX ha sido señalada la importancia del conocimiento de la etología como ciencia que estudia las relaciones entre los individuos y su entorno, así como el comportamiento que un individuo exhibe en determinadas condiciones; esto en función de explorar la forma en que los individuos identifican la realidad que les rodea y finalmente la forma en la que toman las decisiones ante determinadas situaciones (Peláez, 1986; Giménez, 1999).

Contrario al enfoque mecanicista que había dominado durante varios siglos, el interés de los etólogos fue el estudio del comportamiento instintivo o innato de los seres vivos (Eibl-Eibesfeldt y Kramer, 1958 citado por Grandin y Deesing, 1998). Hirsh (1963, citado por Grandin y Deesing, 1998) enfatizó en la importancia del estudio de las diferencias individuales de los organismos ya que éstas diferencias son respuestas particulares que implican el pensamiento y la resolución de problemas en forma flexible, similar a lo que ocurre en los seres humanos. La similitud anatómico-funcional entre el cerebro humano y el de otros mamíferos, específicamente la variación de tamaño y complejidad del tronco, sistema límbico, cerebelo y corteza cerebral permitieron esta reflexión.

Bajo la estricta visión naturalista, las descripciones de los etólogos se dirigen hacia las capacidades conductuales en un continuo evolutivo. Sin embargo, éste continuo evolutivo implica relaciones entre instinto, conducta innata y conducta aprendida (Klinghammer y Fox, 1971; Broom, 2007), por lo cual durante años existió la confrontación de ideas de dos escuelas. La escuela europea representada por Konrad Lorentz, Nikolaas Tinbergen e Irenäus Eibl-Eibesfeldt (Lorentz, Tinbergen y von Frisch ganadores premio Nobel de Medicina 1973 por el descubrimiento en los patrones de comportamiento individual y social en animales), fundamentada en la afirmación que el comportamiento innato ocurre sólo en animales salvajes bajo condiciones estrictamente naturales, y por otro lado, la escuela representada por Fox y Klinghammer, norteamericanos, cuyo planteamiento era que un animal domesticado puede o no manifestar comportamientos innatos en condiciones de confinamiento (Fox, 1966; Klinghammer y Fox, 1971). Esta diatriba fue puesta de lado para avanzar en los estudios dadas las evidencias de uno y otro lado de que no es posible separar las relaciones causa - efecto, ya que todo comportamiento es a la vez reactivo y espontáneo (Jensen, 2006). Las evidencias de reacción frente a una situación desconocida o conocida previamente se encuentran asociadas a una condición evolutiva dirigida o no y que se manifiesta por las diferencias en las reacciones entre individuos, lo cual es el fundamento de los estudios del comportamiento (Fox, 1966; Jensen, 2006).

Hoy día, existe consenso para considerar a la etología como la ciencia que estudia el comportamiento animal, sus causas (internas y externas) y la función biológica en

relación a una serie de comportamientos (variables) que son monitoreados en el individuo, y que permiten inferir si éste se encuentra bajo estrés o por el contrario en situaciones que conllevan al bienestar (Jensen, 2002; Broom, 2007), según la función adaptativa y la evolución generacional sean ventajosas (cumplan su: para qué?) (Tinbergen, 1964). La ciencia de la etología incluye, como ramas a la etología humana, veterinaria y aplicada, entre muchas otras (Giménez, 1999) y se apoya en disciplinas como la psicología, sociología, genética y **fisiología** (Klinghammer y Fox, 1971; Peláez, 1986; Nätt *et al.*, 2009). En los sistemas de producción, la etología aplicada está interrelacionada con la calidad de la relación humano – animal y tecnología - animal, que pudieran ser fuente de pérdida de bienestar (por uso de tecnologías inadecuadas) y traducirse en los consiguientes desórdenes conductuales que reducen los índices productivos (Tancin *et al.*, 2000b; Bruckmaier *et al.*, 2005; Bertenshaw *et al.*, 2008; Bertenshaw y Rowlinson, 2009; Cooke *et al.*, 2009; Van Reenen *et al.*, 2009; Churchland y Winkielman, 2012; Ceballos, 2014). La Etología aplicada es parte esencial del adecuado cuidado de los animales, con características de biología aplicada, zootecnia, ingeniería agronómica y ciencias veterinarias para la producción animal. Si bien, la etología guarda una estrecha relación con la ecología y genética de poblaciones, su relación con la fisiología es particularmente importante para explicar causalidad y ontogenia aplicada a la clínica veterinaria (Waiblinger *et al.*, 2004; Van Reenen *et al.*, 2009). Las bases del comportamiento animal han sido atribuidas históricamente a genes que codifican un conjunto de características, tales como, docilidad, habilidad para el trabajo, disposición o miedo ante situaciones determinadas del manejo humano, ente otras. Particularmente, el miedo y la

agresividad son características indeseables en las especies domésticas, debido a la posibilidad de causar accidentes que comprometan la integridad de los animales y del personal que labora con ellos.

Con el desarrollo de la biotecnología moderna se está en la búsqueda de genes candidatos para la selección asistida por marcadores moleculares que permitan, a través de la selección por temperamento, contribuir a seleccionar individuos para elevar los niveles de producción y características de los productos obtenidos por vacunos (Gutiérrez-Gil *et al.*, 2008). En la actualidad, se han identificado ciertas regiones del genoma bovino las cuales afectan algunas de las características de comportamiento animal; varios autores coinciden en que, similar a otras especies (ratón y cerdo): el temperamento de los vacunos parece estar controlado por muchos genes de pequeño efecto (Gutiérrez-Gil *et al.*, 2008). Cabe destacar que en el primer estudio realizado entre poblaciones divergentes de ganado vacuno (F1 entre razas de carne y leche, F2, retrocruza) se observó asociación entre la ubicación (*loci*) de las características cuantitativas (QTL) de temperamento, estrés, desordenes de ansiedad y de la personalidad, por analogías con los mapas genéticos de los modelos de humanos y ratones; esto incluye también la ubicación de genes relacionados con la regulación de niveles de hormonas del estrés, corticotropina (Sapolsky *et al.*, 2000; Curley *et al.*, 2006; Kadarmideen y Janss, 2007), oxitocina (OT) (Morán *et al.*, 2003), vías de acción de neurotransmisores o neuropéptidos (Hovatta y Barlow, 2008), receptor de prolactina (PRL-r) y comportamiento materno y social en ratones (Peninisi, 2005).

Se ha propuesto a la Oxitocina (OT) como un integrador fisiológico del comportamiento individual y social, ya que estimula la interacción materno filial, estimula la liberación de glucagón y movilización de glucosa e incrementa la actividad del nervio vago, disminuye el estrés y la ansiedad e incrementa la actividad sexual (Bale *et al.*, 2001; Uvnäs-Moberg *et al.*, 2001; Ross y Young, 2009). Durante la preñez, la OT a nivel central parece coordinar las adaptaciones necesarias durante el parto y lactación, esto incluye incremento en la expresión génica, cambios morfológicos alrededor de neuronas y alteración electrofisiológica de las neuronas magnocelulares; estas evidencias funcionales (Bealer *et al.*, 2010) podrían alterarse mediante el manejo de estrategias vinculadas a relaciones de contacto positivo entre animales y humanos mediante la estimulación periférica de los nervios aferentes a través de contacto táctil (cepillado corporal en ratones elevó +181% del nivel OT basal) (Stock y Uvnäs-Moberg, 1988).

Aleman *et al.* (2008) y Nätt *et al.* (2009) han señalado que los mecanismos de herencia no genética cada día tienden a explicar mejor las diferencias entre los individuos, especialmente si son cercanos genéticamente (hermanos), esto implica mecanismos de modificación de la expresión genómica dependiendo de las variaciones del ambiente: ambiente químico y endocrino embrional. Durante la fase embrional las células germinales sufren modificaciones debidas a la metilación del ADN o variaciones en la estructura de la cromatina según descargas de hormonas esteroideas en antro materno, durante la fase prenatal y postnatal, es decir, durante el crecimiento y desarrollo es posible la sensibilización diferencial de órganos blanco

mediante la exposición a descargas precoces vs. tardías (por ejemplo, primíparas vs. adultas) de secreciones hormonales (Bale *et al.*, 2001; Coulon *et al.*, 2013; Landaeta-Hernández *et al.*, 2013). Más recientemente, estudios de factores y mecanismos epigenéticos de potencial actuación en procesos y expresión genómica en animales domésticos tales como interacción con humanos, aprendizaje, estrés por confinamiento, aislamiento o densidad en grupo social, efecto macho, entre otros, que requieren ser precisados (Aleman *et al.*, 2008; Greene *et al.*, 2008; Cavagnari, 2012; De Oliveira, 2013).

Visión y distancia de fuga del vacuno al humano

El ganado vacuno presenta la capacidad visual y zona de fuga que se observa en la Figura 1.a, b. Ambas se relacionan con la ubicación de los ojos hacia cada lado de la cabeza que tiene forma triangular (Grandin, 2010). Se aprecia en la Figura 1.a un sector gris oscuro, frente a la cabeza del animal, el cual representa el campo de visión binocular, ello permite la percepción de profundidad en un ángulo de 25 a 50°. El área gris clara corresponde al campo de visión del animal donde no tiene percepción de la profundidad (340°) y en el área blanca no hay capacidad visual (15 - 30°). En relación a la distancia de fuga (Figura 1.b), esta representa aquella distancia que es interpretada por el animal como violación de su espacio de seguridad por el humano, siendo que en consecuencia y dependiendo del temperamento, ángulo visual, velocidad, experiencia previa de interacción con el humano y posibilidad de escape (área circundante), la toma de decisión del animal: permanecer inmóvil, retirarse, huir, atacar (Grandin, 2010).

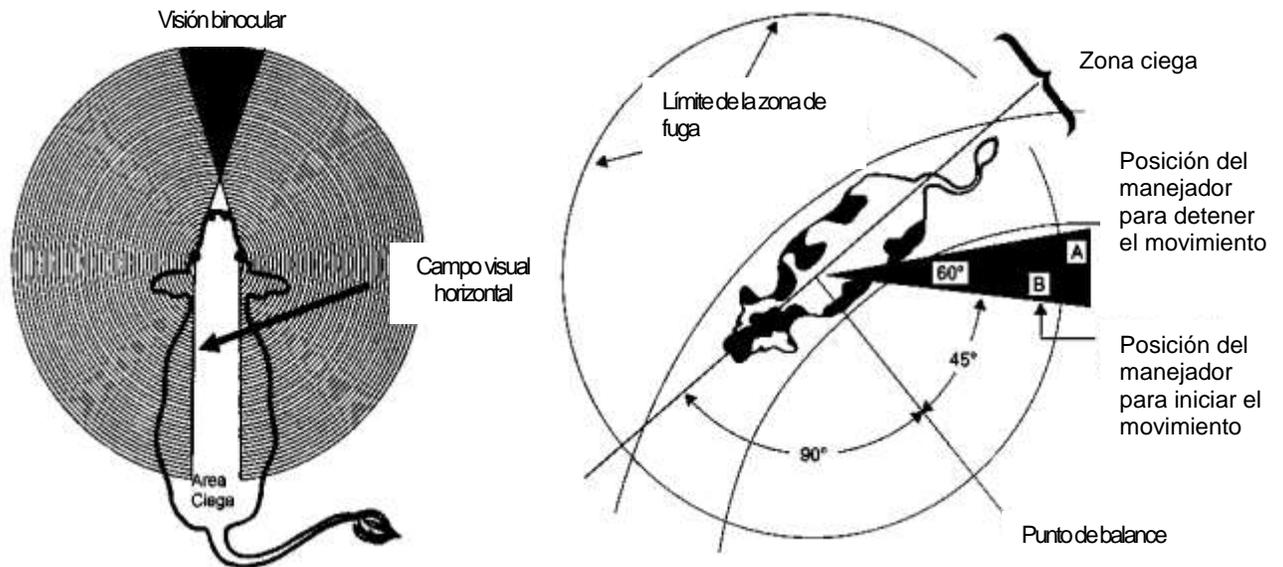


Figura 1. a. Capacidad visual, zona ciega. b. Diagrama de la zona de fuga en el vacuno.

El punto de balance se encuentra en la cruz del animal. Para detener al animal el manejador debe permanecer en el punto A (atrás y fuera del límite de la distancia de fuga), para que el animal inicie el movimiento debe colocarse en B (atrás y dentro del límite de la distancia de fuga) y para que retroceda en cualquier posición delante del punto de balance hacia el animal. En razas lecheras especializadas algunos autores han encontrado distancias de fuga menores a 5 m (Uetake *et al.*, 2002), ya que el animal, según su temperamento, selección y manejo humano desde temprana edad, permanecer inmutable a la presencia humana, ésto puede dificultar el manejo debido a la falta de cooperación en el desplazamiento del animal.

En el extremo opuesto se encuentran animales de genotipos “temperamentales” como los *Bos indicus* criados en condiciones de pastoreo, con ocasional manejo humano o que cuando ocurre es para actividades de alto estrés (p.e. numeración con hierro candente o corte en oreja, castración cruenta, aplicación de vacunas, colocación de implantes, curas, entre otras), en estos casos, la distancia de fuga puede ser superior a 50 m (Kabuga y Appiah, 1992; Grandin, 2010). El hallazgo de Uetake *et al.* (2002), en el cual no encontraron efecto de genotipo más si de la unidad de la producción ($1,17 \pm 0,86$ contra $4,47 \pm 2,01$ m) ($p < 0,01$) indica la posibilidad de alterar la distancia de fuga a través del manejo gentil y calmo.

Interacción Humano – Animal: Condicionamiento, Aprendizaje, Marcaje de Conductas

La actitud de las personas que manipulan a los animales domésticos, y particularmente a los vacunos, permiten marcar conductas que reducen las respuestas debidas al miedo, esto no implica una relación causa efecto, pero si implica su consideración en términos del impacto sobre la producción (Hemsworth *et al.*, 2000; 2002).

Para Bertenshaw *et al.* (2008) y Bertenshaw y Rowlinson (2009) el trato gentil por el personal a cargo del manejo de vacas, con alta habilidad para la producción de leche y en ordeño, mejora el comportamiento, bienestar y producción de leche. De Oliveira (2013) encontró diferencia en el efecto de la estimulación táctil temprana entre ovinos y porcinos, siendo que en los primeros el cepillado corporal promovió la

socialización y menor distancia de fuga, mientras que en los segundos se presentaron situaciones de habituación y sensibilización a la práctica.

Posterior a los clásicos trabajos de Pavlov a principios del siglo XX, relacionados con el reflejo condicional, se desarrollaron un conjunto de teorías en función de la posibilidad de respuesta esperada en animales (entrenamiento y adiestramiento), al igual que en estudios dirigidos hacia la capacidad real de aprendizaje de distintas especies domésticas desde el punto de vista evolutivo (Gómez y Colmenares, 1994; De Oliveira, 2013). Es conocido que, el cercano contacto humano para la manipulación individual de especies de animales no domésticos es utilizado por algunas culturas (pe. asiática e hindú) para convivir en condiciones particulares de interacción (pe. transporte por medio de elefantes). Así entonces, los mamíferos pudieran ser conducidos a la exhibición de conductas deseables mediante el condicionamiento y/o aprendizaje para la canalización de respuestas (Gómez y Colmenares, 1994; Bertenshaw *et al.*, 2008; De Oliveira, 2013, Ceballos, 2014). Es con ello que, la modulación de respuestas nociceptivas en el animal merece atención científico - técnica para la conducción de los sistemas de producción a los fines deseados (leche, carne, cuero y lana), aplicación de selección y mejoramiento genético en condiciones en las que verdaderamente se expresen las respuestas producto del individuo en su conjunto como ser bio – psico – social (Martini, 2008) y manejo animal bajo preceptos deontológicos, éticos y bioéticos de bienestar animal, en el contexto del mundo moderno (Kemelmajer, 2009). Ceballos (2014) encontró que la mayor frecuencia de manejo gentil, en potreros y corrales, de rebaños *Bos*

indicus para producción de carne criados en la Amazonía brasilera afectó positivamente el temperamento ($p < 0,01$), medido a través de la velocidad de salida y el score de reactividad.

Para realizar el entrenamiento, condicionamiento y estimular el aprendizaje, Grandin (2010) acota que, son importantes cuatro factores:

1. Tiempo entre el evento condicionante de la conducta y la respuesta, este debe ser muy próximo, solo así se logra la conexión mental entre ambos eventos y con ello se establece un punto en el cual la mente del animal asume que uno es consecuencia del otro.
2. Intensidad de la satisfacción posterior al evento condicionante, esto juega un rol importante en la fijación.
3. Experiencia previa, esta equivale a la espera confiada de una situación una vez que ha ocurrido un estímulo; con ello, se asegura una respuesta predecible.
4. Predisposición del animal, es el último factor aunque no asociado al aprendizaje del evento en sí mismo, depende de la forma en la que el animal asume las situaciones del entorno. En este caso es un factor inherente al temperamento - personalidad del animal, se refiere a lo interno, lo innato.

El aprendizaje asociativo (estímulo – consecuencia grata) es una herramienta poderosa para el logro positivo del comportamiento animal. La mayor dificultad radica en llegar de la teoría a la práctica del aprendizaje en cada especie, raza o cruce

de interés zootécnico (Grandin, 2010) por lo que la etología de cada especie determina su propio abordaje. El condicionamiento, aprendizaje y el marcaje, “imprinting” o “moldeado” de conductas son aspectos que permiten manipular, hasta ciertos niveles, el temperamento inherente a cada ser vivo.

Los reportes más recientes de prácticas de marcaje de conductas positivas mediante la interacción humano – animal indican efectos sobre la productividad, cantidad, composición y calidad la leche y carne (Hemsworth y Barnett, 2000; Hemsworth *et al.*, 2000; 2002; Waiblinger *et al.*, 2002; Bertenshaw *et al.*, 2008). Los efectos del estrés sobre las características de la carne de aves, cerdos y vacunos ha sido documentada ampliamente (Di Marco *et al.*, 2006).

La selección genética pudiera potenciarse al aplicar un índice que involucre la capacidad de aprendizaje. En animales de exhibición (perros y caballos) las técnicas de enseñanza se han desarrollado notablemente, a lo largo de los siglos, siendo distinto en especies domésticas utilizadas para la producción, probablemente por su producción a gran escala y menosprecio de la inteligencia (Harrison, 1964).

En vacunos mestizos, cruzados o de doble propósito es posible aplicar técnicas de marcaje o “imprinting” que permitan conducir con seguridad al animal a una reacción de alerta no estresante, es decir, que con rapidez pueda superar la dificultad o situación ambiental sin desmedro de la homeostasis y en consecuencia de los índices reproductivos y productivos deseables en el sistema de producción, todo ello en consonancia con la Declaración Universal de los Derechos de los Animales (LIDA,

1977) (“Artículo 9. Aquellos animales criados para la alimentación humana deben ser nutridos, instalados, transportados y sacrificados de manera tal que no se cause ansiedad o dolor”) y cinco libertades (no sufrir hambre o sed prolongada; comodidad, especialmente en zonas de descanso, temperatura ambiental adecuada , disponer de espacio para moverse con libertad, no sufrir lesiones físicas, enfermedades o dolor por manejo inadecuado; manifestar comportamientos naturales, no dañinos y sociales, que sean intuitivos y deseables (exploración y juego), ausencia de emociones negativas -miedo, angustia, frustración o apatía- y buenas relaciones entre humanos y animales) (FAWC, 2009).

Becker y Lobato (1997) evaluaron la importancia del acondicionamiento al manejo humano en crías vacunas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) para producción de carne, siendo que aquellos (hembras o machos) que recibieron 90 segundos de manejo gentil por tres semanas en un brete, escaparon menos (30%) o no mostraron comportamiento agresivo (atacar a humanos) ($p < 0,05$). En 2009, Bertenshaw y Rowlinson mostraron evidencias estadísticas ($p < 0,05$) de los efectos del buen trato sobre la reactividad (pateo en sala de ordeño) de vacas de primera lactancia. En la experiencia el acondicionamiento positivo preparto con cepillado de cuello, extremidades delanteras y traseras y lomo disminuyó el número de reacciones negativas durante el ordeño ($p < 0,05$), incrementó la producción de leche ($p < 0,01$) y su contenido graso ($p < 0,05$). Evaluar éstos hallazgos en animales cruzados o mestizos de temperamento altamente variable y generalmente nerviosos como los *Bos taurus* x *Bos indicus* es de gran importancia para la ganadería tropical.

Etograma

Para el estudio sistematizado del comportamiento, animal o humano (natural, aprendido o aún en enfermedades conductuales), los etólogos han diseñado los llamados etogramas. El etograma es una herramienta que surge de la Psicología humana y ha sido aplicado conjuntamente en la Educación humana (evaluación de cambios en la conducta debidos al aprendizaje), Antropología y Biología.

Los etogramas son inventarios de las conductas en estudio. El Etograma desglosa el continuo que aquella conducta representa (objetivo de la conducta) en piezas observables y con algún tipo de nexos. Así, el etograma permite realizar muestreos puntuales de las distintas conductas en las diferentes condiciones de observación. Esta es la base o punto de partida para la observación sistemática y análisis estadístico del comportamiento de los sujetos de trabajo (Lahitte *et al.*, 2002; 2003).

Los primeros escritos, que pudieran relacionarse con la elaboración descriptiva, de un etograma datan del siglo XVIII; estos fueron realizados por Leroy (1723 - 1789) quien cita en dichos escritos "...me gustaría tener la biografía completa de cada animal. Mi deseo es, que después de estudiar su carácter individual, apetitos naturales y modo de vida, el observador procurase verlo en todas las situaciones que puedan oponerse a la satisfacción inmediata de sus necesidades – situaciones cuya naturaleza variable rompe la regularidad de su proceder cotidiano y le fuerza a recurrir a nuevos ingenios..." (Thorpe, 1982). Técnicamente, Eibl-Eibesfeldt (1979; citado por Thorpe, 1982) indica que el etograma es el catálogo exacto de todas las formas de

comportamiento propias del animal, las cuales pertenecen a un repertorio conductual de un conjunto de actos. En sentido estricto, el investigador se limita a describir en forma completa, exacta y su contexto las actividades; aunque puede parecer imposible separar o aislar un acto particular de un flujo continuo de acciones que están enmarcadas en un objetivo (pe. vocalización de la madre previa al amamantamiento de la cría) esto es necesario para la digitalización del proceso y la búsqueda de las diferencias entre individuos debidas a múltiples factores de influencia (Lahitte *et al.*, 2002). Sin la sistematización científica en etología, mediante la definición del acto y su cuantificación, el análisis sería meramente descriptivo (Tinbergen, 1964), en tal sentido, el etograma resulta del constructo acto, tiempo, contexto de lo observable: cambio postural, movimiento, cantidad, duración, entre otras (Lahitte *et al.*, 2002). El conjunto de esquemas de acción con un propósito particular englobaría una conducta que manifiesta la calidad de relación organismo/entorno. El propósito es elucubrado por el observador, ya que la significación propia para el organismo es indeterminable.

La construcción de un lenguaje del etograma mediante la secuencia de acciones enmarcadas en la(s) conducta(s) del(os) individuo(s) constituye una entidad semiótica que otorga códigos explícitos a los fines de comprensión/interpretación/acción (Lahitte *et al.*, 2002; 2003). La descripción de un acto de la conducta se hace en términos de desplazamiento de las partes del cuerpo, es decir, cambio en las posiciones del sujeto, orientado hacia el entorno en el cual está incluido el objeto de la conducta. Para esto se requiere elaborar una descripción de ese sujeto tal que

permita reconocer en él partes que cambian su posición respecto de otras, y del entorno (Lahitte *et al.*, 2002). Una de las formas de especificar esta segmentación, es codificando los rasgos de cada uno de los actos involucrados en la descripción, así la sintaxis de este sistema es peculiar: no solo por el tipo de función que se espera del etograma entendido como lenguaje, sino también por los signos ya que no deben entrar en conexión por suponerse excluyentes (Lahitte *et al.*, 2002). Así, el texto del etograma pasa a ser el vehículo para transmitir el lenguaje, cuantificar descriptiva o experimentalmente y acoplar al marco conceptual del lector; para cada territorio existen múltiples mapas (Lahitte *et al.*, 2003).

Existen avances en la técnicas de descripción del comportamiento y en la comprensión de la organización en función de procesos evolutivos y fisiológicos (Broom, 2007; De Oliveira, 2013), por ejemplo, el control sensorial y motor, variaciones en los patrones hormonales, motivación para el mantenimiento corporal según las condiciones, comportamiento reproductivo, estructura social, lo cual implica la necesidad de actualizar la información preexistente y analizar de forma holística (Broom, 2007; Landaeta-Hernández *et al.*, 2013).

FISIOLOGÍA DEL COMPORTAMIENTO ANIMAL

Docilidad, ansiedad, socialización

Fisiológicamente, se ha observado que el grado de docilidad o ansiedad está relacionado con un nivel basal, mayor o menor respectivamente, de la hormona Oxitocina (OT) (Churchland y Winkielman, 2012) y expresión de su receptor (OT-r)

(Creswell *et al.*, 2014). La alta y normal concentración de cortisol (materno y fetal) durante el parto de la hembra mamífera provoca la expresión de receptores de OT en el hipotálamo y en el lóbulo del hipocampo (sistema límbico) (Liberzon y Young, 1997), en forma simultánea se presenta una caída de la progesterona, incremento del 17- β estradiol y elevada liberación de OT debido a la estimulación mecánica del feto a nivel vagino-cervical (Kendrick, *et al.*, 1991). A su vez, la frecuencia previa de descargas pulsátiles de OT a nivel del sistema límbico parece intervenir en la expresión de la memoria social y sexual, así como en la agresividad de la hembra y de la propia cría para su protección y sobrevivencia (Nissen *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009; Paranhos da Costa *et al.*, 2008). En ratas, se ha observado que la inyección de OT en las crías recién nacidas produce un efecto anti-estrés que permanece a lo largo de la vida del animal y, adicionalmente, estimula el crecimiento hasta aún después de la pubertad, pareciera que por mejor uso de la energía disponible; sin embargo, los circuitos neuroendocrinos implicados aún permanecen sin dilucidar (Uvnäs-Moberg *et al.*, 2001).

La asociación entre condiciones humanas con dificultades para la socialización (caso extremo en autismo), rechazo a contacto táctil y bajo nivel basal de OT (Campbell, 2010; Shkurko, 2012) han desencadenado la búsqueda de terapias y protocolos médicos de suministro de mínimas dosis de OT, vía aerosol nasal, (Palgi *et al.*, 2015). Feldman *et al.* (2013) encontraron asociación de relación humana madre – hijo debida a OT y su receptor (OT-r). En roedores se ha apreciado el efecto de la noradrenalina sobre la OT, debido a su intervención en el reconocimiento olfativo de

la madre (Kendrick, 2013). En vacunos no existe información del efecto neuromodulador de la OT sobre el comportamiento social y/o materno - filial. En la actualidad, se propone que el comportamiento conciente es un proceso integrado consistente de procesos psicofísicos, sensoriales, de percepción, cognición, aprendizaje, memoria y acción (Martini, 2008).

Miedo, estrés, comportamiento defensivo

El sistema neuroendocrino es el mayor responsable de las respuestas frente a las amenazas percibidas por el individuo. La respuesta implica al Sistema Nervioso Central y órganos periféricos. Los efectores centrales del sistema incluyen OT, vasopresina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y péptidos derivados de la proopiomelanocortina, locus ceroleus y centros de norepinefrina autonómica en el cerebro. El óptimo funcionamiento basal del sistema es necesario para las respuestas al estrés, reajustes, respuestas exitosas e interacciones sociales apropiadas (Chrousos, 2009).

El cortisol es un buen indicador de estrés en vacunos (Saco *et al.*, 2008). Animales *Bos taurus* cárnicos a pastoreo presentan menores concentraciones de corticosterona cuando reciben frecuente y gentil manejo humano, por su parte vacunos *Bos indicus* presentan valores más elevados que en los *Bos taurus* (Rushen *et al.*, 1999; Negrão y Marnet, 2006). Burdick *et al.* (2011) encontraron que en vacunos (Brahman), con temperamento más reactivo que otros, los niveles sanguíneos cortisol y epinefrina, así como de frecuencia cardíaca, siempre fueron superiores. En otro trabajo, Sánchez-

Rodríguez *et al.* (2013) observaron niveles superiores de cortisol y de temperatura en becerros Angus de temperamento reactivo.

Recientes, neuroimágenes halladas por Dedovic *et al.* (2009) muestran al cortisol involucrado en la percepción y modulación psicológica del estrés debido a su acción en las regiones prefrontal y límbica del cerebro. La red de estructuras neurales interconectadas del córtex prefrontal permiten ejercer una influencia inhibitoria flexible sobre las estructuras subcorticales asociadas al comportamiento defensivo pelea: huida según las demandas ambientales; es así como se presenta desinhibición o inhibición simpática (tónica) (adrenalina, noradrenalina y dopamina) para la sobrevivencia; sin embargo, al interrumpirse la red tónica surge el patrón de comportamiento asociado a la atención, emoción e inflexibilidad autonómica (Thayer y Lane, 2002; Brosschot *et al.*, 2006; Martini, 2008). Tratamientos farmacológicos experimentales (Van Reenen *et al.*, 2009) con ansiolíticos has mostrado beneficios sobre los resultados a los test de reactividad, dada, conjuntamente, la menor elevación de los valores plasmáticos de cortisol y nivelación más rápida a valores normales, sin embargo, a nivel de campo el alto riesgo por efecto diferencial a las respuestas entre los individuos, sensibilidad a las dosis y residuos en productos contravienen normas internacionales alimentarias (inocuidad) y de bienestar animal.

FISIOLOGIA DE LA EYECCIÓN LÁCTEA

Una vez desencadenado el parto y nacida la cría, deben sincronizarse dos procesos biológicos: síntesis y eyección láctea. Ambos están estrechamente interrelacionados,

ya que de no removerse la leche mediante el ordeño, se disparan mecanismos inhibitorios de la síntesis láctea para salvaguardar la integridad de la glándula mamaria. Desde el punto de vista del manejo, satisfechos los requerimientos nutricionales para la síntesis, es la remoción eficaz de la leche el factor más importante para alcanzar el pico y garantizar la persistencia acorde al potencial.

Neuroendocrinología de la eyección láctea y factores que afectan la eyección láctea en vacunos mestizos en el trópico

Wakerley *et al.* (1994) refieren los trabajos pioneros realizados por Cross y colaboradores, en la década de los cincuenta, basados en lo que previamente Ott y Scott en 1910 no habían logrado precisar cuándo inyectaron cabras, vía endovenosa, con un extracto de neurohipófisis y causaron drenaje de la leche. Así, la eyección láctea es un reflejo innato de todas las hembras mamíferas, éste no se encuentra sujeto al control conciente pero sí a estímulos condicionados de diversa índole. En contraposición a los mecanismos desencadenantes o facilitatorios de la eyección, existen factores que pueden impedir o interrumpir dicho proceso en forma temporal o aún permanente (Wakerley *et al.*, 1994; Vaccaro y Florio, 2002).

La OT específicamente es la hormona responsable de desencadenar la bajada de la leche (Smith, 1959). En forma natural, la cría estimula las abundantes terminaciones nerviosas del pezón previo y durante al amamantamiento. Estos estímulos viajan a través del cordón espinal y llegan al hipotálamo donde a través de los axones terminales la OT es liberada desde la neurohipófisis hacia el sistema circulatorio en elevadas concentraciones. Cuando dicha hormona llega a la ubre, distribuida por el

sistema de vasos sanguíneos, los receptores permiten su entrada a las células mioepiteliales que rodean a los alvéolos, así éstas se contraen y la leche es expulsada hacia los conductos galactóforos (Schmidt, 1971; Bar Peled *et al.*, 1998; Bruckmaier, 2005; Bruckmaier y Hilger, 2001; Bruckmaier *et al.*, 1994; Uvnäs-Moberg *et al.*, 2001).

Este reflejo es condicionado y muchas vacas solo son capaces de exhibirlo cuando su propia cría está presente, por el contrario otras vacas pueden iniciarlo simplemente con un ambiente favorable de rutina, que condiciona al ordeño de forma inminente. En cruces raciales, especialmente aquellos de alto componente *Bos indicus*, la presencia de la cría en el ordeño es esencial para iniciar la bajada de la leche (Negrão y Marnet, 2006), especialmente cuando los niveles de producción son bajos (Narváez *et al.*, 2006a), debido a la necesidad de una alta cantidad de OT circulante (Bruckmaier *et al.*, 1994; Bruckmaier y Hilger, 2001).

El único trabajo que se ha reportado, cuantificando OT y cortisol en vacas Gir (*Bos indicus*) (G), Holstein brasilero (*Bos taurus*) (H) y sus cruces, todas sometidas a ordeño mecánico sin presencia del becerro o amamantamiento restringido posterior al mismo, indica que todos los grupos presentaron similares niveles de OT, a pesar que la curva de liberación fue más pronunciada en las H y G x H; en el caso de cortisol los niveles fueron más altos en el grupo G (Negrão y Marnet, 2006). En consecuencia, no existen referencias en cuanto a éstos aspectos para el sistema de ganadería vacuna dominante en el trópico bajo.

Durante el amamantamiento, la cría vacuna usualmente se coloca en posición polar opuesta a la de su madre, con ello logra tener mejor acceso a la ubre debido a su toma frontal. El ternero es capaz de estimular la eyección láctea y seguidamente remover rápidamente la leche de la cisterna del pezón mediante la aplicación de presión positiva y negativa (Smith, 1959).

En el ganado vacuno especializado en producción de leche (*Bos taurus*), a través de la selección y estrategias de manejo de separación de la cría a las 72 horas después de su nacimiento y el ordeño sin su presencia, se ha buscado suprimir tal aprehensión, es decir, la fuerte unión o relación madre – cría. Sin embargo, en la ganadería tropical, la evolución de los *Bos taurus*, traídos al continente americano por los españoles o portugueses, fueron los formadores de las razas criollas que garantizaron su sobrevivencia por adaptación a recursos, clima, enfermedades, ente otros (Nowak *et al.*, 2000); el fuerte nexo materno-filial se conservó y, es por ello que, generalmente se ambos se continúan manejado como una unidad, a pesar de las implicaciones de ineficiencia de mano de obra, dificultades de manejo del ordeño, consecuencias reproductivas, entre otras.

Cuando la cría no está presente durante el ordeño, en los *Bos taurus* criollos o los mestizos *Bos indicus* x *Bos taurus* es prácticamente imposible desencadenar la eyección láctea. Debido a ello, en el corto plazo se presenta el cese de la producción de leche (lactancias cortas) con problemas sobre índices de producción de leche e índices de crecimiento temprano de las crías, bien sea para su destino a reemplazo o producción de carne (Vaccaro y Florio, 2002).

Trabajos publicados en el trópico (Bar Peled *et al.*, 1998; Combellas y Tesorero, 2003; Tesorero *et al.*, 2001; Narváez *et al.*, 2006b) han mostrado que aquellas vacas que han tenido presencia del becerro durante el ordeño y/o amamantamiento de sus crías además del ordeño mecánico, incrementan los niveles de producción de leche de vacas provenientes de cruces *Bos taurus* x *Bos indicus*. Aún más, en vacas especializadas en producción de leche también se ha observado éste efecto (Everitt y Phillips, 1971), siendo también atribuido al efecto del ternero mejoras en la persistencia de la lactancia (Das *et al.*, 1999), no solo por el mejor vaciado de la ubre y en consecuencia estimulación de la síntesis, sino que descartando éste efecto, porque se liberan mayor cantidad de hormonas estimuladoras de la síntesis láctea, entre ellas, insulina, hormona de crecimiento (GH), gastrina, somatostatina, colecistoquinina (CCK), entre otras (Johansson, 2000).

Sin embargo, en un trabajo realizado por Drescher (2003) el efecto estimulador de la presencia del becerro en el ordeño sobre la eyección láctea presentó ciertas contradicciones. Así, al aplicar cuatro tratamientos, cuando simultáneamente se inyectó OT y se le colocó el becerro a la vaca, la producción de leche no se incrementó ($p>0,05$) comparado con aquella cuando sólo se inyectó OT sin la presencia del becerro. Es decir, pareciera existir un efecto de relación estrés – antiestrés provocado por la cría el cual requiere ser precisado.

La vaca de primera lactancia presenta fallas en la eyección láctea debido al inexistente periodo de acostumbramiento del animal a nuevas rutinas con manejo humano muy cercano, instalaciones, sonidos, manipulación de la ubre y la cría, entre

otros (Wakerley *et al.*, 1994; Bruckmaier, 2005; Tancin *et al.*, 2000a, b; Kraetzl *et al.*, 1999; 2001). Por su parte, Negrão y Marnet (2006) y Paranhos da Costa *et al.* (2006; 2008) indican que tanto el temperamento como la fuerte aprehensión a la cría de la vaca de mayor grado de herencia *Bos indicus* induce efectos inhibitorios sobre la expresión de potencial genético de producción de leche.

Bertenshaw y Rowlinson (2009) mostraron evidencias estadísticas de los efectos del buen trato o manejo gentil y personalizado, mediante el condicionamiento positivo de novillas Holstein preñadas con cepillado de cuello, extremidades delanteras y traseras y dorso, sobre la producción de leche de su posterior primera lactancia. Estos investigadores demostraron que apenas cinco minutos diarios, para un total de 30 por semana, y durante las seis semanas previas al parto, fue suficiente para incrementar la producción de leche (L/d) en forma altamente significativa (+258 L leche/lactancia; $p < 0,001$) en vacas de primer parto, así mismo indican cambios importantes en el flujo de leche (L/s) ($p < 0,001$) a favor del trato “personalizado” y de la eyección láctea (menor tiempo para el inicio de bajada de la leche) (Bertenshaw *et al.*, 2008).

Evaluar éstos hallazgos en animales cruzados o mestizos de temperamento altamente variable y generalmente nerviosos como los *Bos indicus* x *Bos taurus* es de gran importancia para la ganadería tropical. Finalmente, y tal como indican Waiblinger *et al.* (2004), cualquier reducción del estrés durante procedimientos veterinarios o rutinarios en un rebaño se expresará en efectos positivos sobre el bienestar humano, animal y niveles de producción.

FISIOLOGIA DEL REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA

Neuroendocrinología y factores que afecta el reinicio de la actividad ovárica en vacunos mestizos en el trópico

Después del parto, las vacas en el trópico muestran una limitada capacidad para la concepción durante un tiempo variable, esta capacidad depende de la involución uterina, anestro postparto, dinámica del crecimiento de folículos y cuerpos lúteos de vida media corta (Martínez *et al.*, 1998b; Domínguez *et al.*, 2007). En vacunos lecheros, se presentan problemas de fertilidad aproximadamente hasta los 90 ó 120 d postparto, ya que a pesar que el animal haya llegado al parto con muy buen estado de reservas corporales, la movilización de nutrientes propias de los genotipos lecheros, vuelcan los nutrientes disponibles (de la dieta y de las reservas corporales) hacia dicho producto, así entran en el llamado balance energético negativo (-BE) y hasta tanto éste no cambie de signo (+BE), es decir, se produzca el viraje del punto mas bajo de la curva (NADIR) , no cesa anestro nutricional (Broster y Broster, 1998), debido al bloqueo neuroendocrino (Lucy *et al.*, 1991; 1992). En vacunos, cruzados o mestizos, para producción de leche y carne, esto es ligeramente distinto. Inicialmente, no se alcanzan los niveles de producción de leche de los vacunos especializados, por lo tanto esto supone una menor exigencia de movilización de nutrientes no aportados por la dieta y seguidamente porque su partición de nutrientes puede ser distinta (Cronjé, 2000; Pinto-Santini *et al.*, 2009; 2014; Ruiz *et al.*, 2010). En tal, sentido, una vaca que llegue al parto con buen estado de reservas corporales, es decir, una condición corporal, entre 3 y 3,5 (NIRD 1-5) (Fattet y Jaurena, 1988; Bewley y

Schutz, 2008) no debería tener mayores problemas para reiniciar su actividad reproductiva en el postparto temprano (Ruiz-Cortes y Olivera- Ángel, 1999; Domínguez *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2010), ya que aun disminuyendo a 2,5 la CC, éste valor es suficiente para no limitar la secreción de hormonas reproductivas (Martínez *et al.*, 1998b; Pinto-Santini *et al.*, 2009). La expresión de Factor de Crecimiento parecido a la Insulina Tipo 1 (IGF-1) a nivel hepático y ovárico está asociada de manera determinante sobre el temprano reinicio de actividad ovárica postparto (Ruiz *et al.*, 2010).

Seguido del factor nutricional, se encuentra el efecto de la presencia de la cría en el ordeño y amamantamiento, este factor afecta el reinicio de la actividad reproductiva postparto en vacas Cebú y *Bos taurus* x *Bos indicus* debido a su uso como productoras de leche y carne en los trópicos (Martínez *et al.*, 1998a; Das *et al.*, 1999; Galina *et al.*, 2001). En aquellas vacas donde se retira la cría finalizado el consumo de calostro, aproximadamente a los 5 d, los ciclos estrales se reinician entre la segunda y tercera semana postparto (Henaó *et al.*, 2000); comparado con aquellas que amamantan a su cría, en la cual se han reportado reinicios ente los 35 y 60 d postparto (Gazal *et al.*, 1999). Ruiz-Cortes y Olivera-Angel (1999), en Méjico, reportan valores de hasta 150 d para el reinicio de la actividad ovárica cuando la cría está presente en el ordeño y se realiza amamantamiento restringido, aunque este retardo puede ser debido a la combinación con otros múltiples factores y no debe ser atribuido exclusivamente al efecto de la cría (Martínez *et al.*, 1998a, b; Brook y Marshall, 1999; Yavas y Walton, 2000). Las vacas cuyos becerros se destetan o que

amamantan a un ternero ajeno, ovulan más pronto que aquellas con ternero propio (Silveira *et al.*, 1993). Así también, la sola presencia del becerro sin mamar, retrasa la primera ovulación postparto (Hoffman *et al.*, 1996), al igual que la presencia del becerro propio sin mamar, cuando otro becerro ajeno se alimenta de la misma vaca (Lamb *et al.*, 1997). Según Viker *et al.* (1993) un periodo de 24 horas de contacto entre vaca y cría después del parto es suficiente para que se establezca la unión vaca-becerro, y con ello exista el reconocimiento de la cría como propia o ajena para restringir, en este último caso, la posibilidad de amamantar voluntariamente.

Una característica particular de los sistemas que emplean animales cruzados *Bos taurus* x *Bos indicus*, para la producción de leche y carne simultáneamente, es que la cría amamanta a la vaca después del ordeño por lapsos de tiempo variables (de 1 a 8 h/d) y por una longitud de días de lactancia altamente variable según la modalidad (2 a 7 meses) (Drescher, 2000). En la mayoría de los mamíferos, después del parto, el estímulo del amamantamiento de la cría induce un periodo sin ciclos estrales, cuya finalidad es que la madre garantice la supervivencia de la cría existente (McNeilly, 1997). Durante este periodo, el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas-útero debe recuperarse en su total funcionamiento, para que se instale una nueva gestación. La extensión de este periodo resulta en pérdidas económicas para los productores y es responsable, en parte, de la baja eficiencia reproductiva y productiva de las vacas mestizas en el trópico (Williams *et al.*, 1996); en vacas de primer parto, con demandas fisiológicas superiores, el problema es mayor. Siendo que los niveles de producción de leche en los vacunos tropicales no pueden competir con aquellos

niveles producidos por las vacas con alta aptitud lechera, es en el aseguramiento de una lactancia y cría viva por año, sobre la base de pastos y forrajes de baja a mediana calidad, con suplementación estratégica, donde los vacunos cruzados tropicales expresan ventajas sustentables, comparativas y competitivas (Ordóñez, 1998).

El crecimiento de folículos hasta el tamaño de ovulatorio se inicia poco después del parto con la formación del primer folículo dominante, el cual ha sido observado por ultrasonografía, entre 7 y 10 d postparto en vacas productoras de leche (Savio *et al.*, 1990), entre 10 y 15 d en vacas productoras de carne (Kamimura *et al.*, 1994; Stagg *et al.*, 1998), entre 6 y 10 d en vacas cebú con becerro destetado al parto (Toribio *et al.*, 1995) y entre 26 y 78 d en vacas cebú manejadas de manera extensiva en la zona tropical (Ruiz-Cortes y Olivera-Angel, 1999) respectivamente. Un bajo porcentaje (11 a 50%) de estos primeros folículos dominantes ovulan en vacas productoras de carne, contrapuesto a que cerca de un 70 % lo hacen en aquellas de mayor habilidad lechera (Savio *et al.*, 1990). Kamimura *et al.* (1994) estiman que, antes de la primera ovulación postparto, se presentan en promedio de 2,7 a 3,4 folículos dominantes en vacas de carne y que se requieren entonces de 6,8 a 10,6 ondas de crecimiento folicular para cada ovulación (Stagg *et al.*, 1998). Estos resultados indican que el extenso periodo desde el parto hasta la primera ovulación pareciera deberse a fallos en la ovulación de los primeros folículos dominantes (Kamimura *et al.*, 1994; Ruiz-Cortes y Olivera-Angel, 1999; Henao *et al.*, 2000; Domínguez *et al.*, 2007). La ovulación del primer folículo dominante puede inducirse mediante la administración de un análogo de Hormona Liberadora de las

Gonadotropinas (GnRH) (Crowe *et al.*, 1993), el destete del becerro luego del período de consumo de calostro (Henaó *et al.*, 2000) o con destete temporal (Mukasa-Mugerwa *et al.*, 1991), debido a que se incrementa casi de inmediato la liberación de GnRH (Gazal *et al.*, 1999) y ocurre el restablecimiento de los pulsos (amplitud y frecuencia) de la hormona Luteinizante (LH) (Connor *et al.*, 1990; Williams y Griffith, 1995; Griffith y Williams, 1996; Stagg *et al.*, 1998; Yavas y Walton, 2000). Un menor flujo sanguíneo al ovario producto del estrés del ordeño sin becerro ha sido reportado como probable causa de anestro en vacas lactantes de alta producción (Lucy *et al.*, 1992); sin embargo, los resultados anteriormente señalados indican resultados a favor de la ausencia de relación vaca – cría sobre la foliculogénesis.

La administración de naloxone (antagonista de opioides) al principio del periodo postparto, incrementa la frecuencia de pulsos de LH (Ahmadzadeh *et al.*, 1998) y disminuye la duración del anestro postparto (Stevenson *et al.*, 1997). La respuesta a la administración de nalaxone, varía en vacas con o sin becerros; a su vez la remoción del becerro, por 48 h en el día 30 del postparto, disminuye la concentración de β -endorfinas en hipotálamo (Connor *et al.*, 1990). Las anteriores observaciones aunadas a que se ha reportado una correlación negativa entre la concentración de β -endorfinas con la concentración de LH del parto a la primera ovulación, y una correlación positiva con el intervalo postparto (Osawa *et al.*, 1998), sugieren que los opioides actúan de manera directa en las neuronas productoras de GnRH, afectando la liberación de GnRH y de esta manera en forma indirecta regulan la secreción LH. Naloxone no tiene efecto al principio del periodo postparto, y esto no se debe a la

falta de receptores para opioides (De Rensis *et al.*, 1999), lo cual sugiere que vías independientes a los opioides participan en la inhibición de la secreción de GnRH y LH. Algunas de estas vías potenciales pueden ser los sistemas de neurotransmisores, como GABA, catecolaminas, OT y vasopresina (Wakerley *et al.*, 1994), entre otras. La OT, que se libera durante el proceso del amamantamiento, se aumenta con el solo contacto animal (Stevenson *et al.*, 1997), y se libera en mayor cantidad cuando el becerro que mama es propio becerro con respecto a si el becerro es ajeno (Silveira *et al.*, 1993). Sin embargo, no se conoce el efecto de esta secreción diferencial de OT en vacas con becerro propio o ajeno sobre la reproducción.

Por otra parte, y debido a que el cortisol disminuye la secreción de LH, se ha sugerido que esta hormona participa en la inhibición de la secreción de LH durante el periodo postparto en vacas con becerro. Sin embargo, algunos autores han concluido que la modulación negativa de LH por el amamantamiento no es regulada por cortisol (Yavas y Walton, 2000).

Pérez *et al.* (2001) indican que para que fisiológicamente la vaca presente su primera ovulación postparto, es necesario que esta recupere la funcionalidad total de su eje reproductivo (hipotálamo-hipófisis-gónadas-útero), esto implica una importante secreción de LH en adenohipófisis, para que seguidamente se culmine la involución uterina y ocurra el reinicio del crecimiento folicular. Estos últimos requisitos se cumplen en las primeras 3-4 semanas postparto; sin embargo, el estímulo del amamantamiento del becerro incrementa la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa del estradiol, lo que causa una baja frecuencia en la

secreción de GnRH y LH. La mayoría de la evidencia indica que esto se realiza vía los opioides endógenos; sin embargo, puede involucrar la participación de neuronas dopaminérgicas en hipotálamo y la secreción de OT; éste último efecto aún poco precisado, pero se presume es debido a su acción antiestrés o ansiedad, socializante y estimuladora sexual (Bale *et al.*, 2001).

En vacas cruzadas y mestizas tropicales, durante el ordeño se presentan diversos manejos dependientes del cruzamiento genético, localidad, infraestructura y conocimiento técnico propio o por asistencia (Galina *et al.*, 2001). Sin embargo, desde finales de los 70' Ugarte y Preston iniciaron trabajos de investigación en vacas cruzadas *Bos taurus* x *Bos indicus*, debido al interés creciente en el momento de introducir genes de razas nobles lecheras en otras de mayor resistencia al trópico y potencial cárnico; en éstos sistemas se caracterizó, que de no estar presentes los becerros durante el ordeño, se dejaban de extraer cantidades importantes de leche durante el ordeño (hasta 30%), con el subsecuente secado de la vaca antes de lo previsto debido al potencial genético de producción (Preston, 1976). Esto ha hecho prácticamente obligante, hasta nuestros días, el uso del becerro para desencadenar la bajada de la leche (presencia y mamado antes y después del ordeño), interfiriendo como fue descrito anteriormente con el proceso reproductivo.

Una publicación de Cooke *et al.* (2009) revela los beneficios del acostumbamiento al manejo sobre la edad a la pubertad y la preñez de novillas cruzadas Brahman x Angus y Brahman x Hereford. En éste trabajo se reporta que aquellas novillas marcadas con un manejo de hacerlas pasar tres veces por semana a

instalaciones y corrales, en ciertos periodos del postdestete, (alcanzaron la pubertad ($p=0,02$) y se preñaron ($p=0,04$) antes que aquellas que sólo permanecieron a pastoreo hasta antes de la temporada de servicio. Así mismo, los valores de cortisol resultaron menores ($p<0,01$) y los de progesterona (P_4) mayores ($p<0,05$) en el grupo tratado, estando a su vez correlacionados ($p<0,01$) con la puntuación de conducta referida por los autores. No se han encontrado trabajos que refieran efectos del manejo personalizado sobre las variables de índole reproductiva, es de esperar que todo manejo conducente a la disminución del estrés y sus efectos neurohormonales permitan mejoras. En tal sentido, los resultados acá obtenidos serán de valor por el aporte al conocimiento.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V. 1. EFECTO DE TRES DIFERENTES TIPOS DE MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN Y REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MANUAL Y CON CRIA AL PIÉ.

Ubicación

El experimento se realizó en una unidad de producción comercial ubicada en la población de Barrera, municipio Libertador, centro oriente del estado Carabobo, Venezuela, a 10°07'N, 68°12'O y a 358 msnm. La temperatura media se ubicó en 25,3°C, con registro de precipitación media anual de 1190 mm, concentrada, en un 80%, entre los meses de mayo a noviembre, época del ensayo.

Animales y manejo

Un total de 28 novillas F₁ (Holstein x Brahman), producidas mediante el cruce de vacas Brahman puras inseminadas a 18 meses y 320 Kg de peso vivo con semen comercial de Holstein y de 27 ± 2 meses de edad, ingresaron con 8 ± 1 meses de preñez según fecha de servicio y revisión ginecológica, por vía transrectal, post inseminación. Todas las novillas preñadas fueron mantenidas a pastoreo continuo de *Brachiaria brizantha* cv. Toledo (8,4 % proteína cruda) hasta el parto; agua fresca y limpia y minerales a voluntad estuvieron siempre disponibles en los potreros.

Los partos se concentraron entre los meses de junio y agosto. Todas las vacas parieron en condición natural de potrero, sin asistencia o vigilancia humana,

generalmente los partos se presentaron al final del día o muy temprano en la mañana, verificado dos veces por día. El binomio madre-cría fue trasladado a corrales cercanos a la sala de ordeño. La cría se pesó, recibió cura del ombligo con tintura de yodo al 5% y, verificado el sexo, se identificó al animal (tatuaje en oreja izquierda con el año de nacimiento y número correlativo y tatuaje en oreja derecha con el número de la madre) para llevar a cabo el registro.

Madre y cría permanecieron juntos las primeras 24 h posteriores al traslado a corral y recibieron revisión frecuente de consumo de calostro. A las 48 h, la vaca se incorporó al rebaño de ordeño para realizar las rutinas diarias del rebaño en producción de leche, es decir, pastoreo rotacional de *Brachiaria brizantha* cv. Toledo (2 d de ocupación y 28 d de descanso) y traslado a corral de ordeño en horas de la mañana (02:00) y la tarde (14:00), para ordeño manual en corral colectivo con la cría al pie.

Entre los días 2 y 7 del postparto, las vacas fueron ordeñadas para disminuir la presión intramamaria debida a la alta secreción y producción del calostro, estimulación de la secreción láctea y acostumbramiento a la labor; seguidamente, la cría recibió amamantamiento restringido por aproximadamente una hora y la vaca se incorporó al rebaño de ordeño como rutina. Finalizada la producción de calostro, se inició el ordeño a fondo de todas las vacas, permitiendo a las crías 30 min para el amamantamiento postordeño (Drescher, 2003). Las primíparas fueron ordeñadas a final de cada ordeño (04:00 y 17:00), por rutina de la unidad de producción.

En la experiencia se aplicaron los principios contemplados en el Código de Bioética y Bioseguridad de Venezuela (MPPCyTII, 2008).

Duración del estudio

El estudio se inició durante el periodo preparto considerando el día de inicio aquel en el que se realizó la primera toma de muestra sanguínea y sin ningún manejo previo de aplicación de tratamientos (-43 ± 13 d). Al día siguiente del muestreo, se inició la aplicación de los tratamientos experimentales y luego de ocurrido el parto se realizó la evaluación hasta los 90 ± 4 d, con ello se totalizaron aproximadamente 135 d de evaluación por cada animal.

Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado para evaluar el efecto de tres tratamientos sobre distintas variables relacionadas con comportamiento, reproducción y eyección láctea. Sobre la base de investigaciones previas (Drescher, 2003; Narváez, 2006a, b; Bertenshaw *et al.*, 2008; Bertenshaw y Rowlinson, 2009), se fijaron períodos de muestreo postparto, estos fueron: -43 (preparto; promedio de todos los animales), 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 d.

El modelo estadístico aplicado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijkl} \quad \text{con } \varepsilon_{ijkl} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$$

Donde:

Y_{ijkl} = valor de la observación del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo período

μ = Media

α_i = Efecto del i-ésimo tratamiento ($i = 1, 2, 3$)

β_j = Efecto del k-ésimo periodo ($j = 1, 2 \dots 8$)

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo período

ε_{ijk} = Efecto aleatorio del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo período

Tratamientos

Se aplicaron tratamientos basados en el marcaje de conductas debidas a la implementación de manejo gentil o no, a saber:

- Sin manejo gentil humano (SM) (n=9). Las vacas de éste grupo iniciaron el ordeño sin marcaje de manejo humano gentil, es decir, permanecieron en potreros durante la gestación con mínimo contacto humano. Manejo habitual en la unidad de producción.
- Manejo gentil sin contacto humano (PSO) (n=8). Las novillas gestantes de este grupo pasaron por una manga de conducción contigua al área de la sala de ordeño, todas las mañanas, de lunes a sábado, para familiarizarse con el lugar (Bruckmaier, 2005; Bertenshaw y Rowlinson, 2009). Esto ocurrió desde los 47 ± 10 d preparto. El paso de los animales fue realizado en forma pausada, sin gritos, ruidos o golpes a las instalaciones o animales; se aplicaron los principios de distancia de fuga (Grandin, 2010).

- Manejo gentil con contacto humano positivo (CE) (n=11). El lote de animales fue colocado en una manga de conducción contigua al área de ordeño desde el 43 ± 13 d preparto con iguales criterio a PSO para el trato animal y lugar. Cada novilla fue cepillada en el dorso, extremidades (delanteras y traseras) y cuello durante un período total de 10 min, una vez por día y entre los días lunes a sábado (Bertenshaw *et al.*, 2008; Bertenshaw y Rowlinson, 2009). El cepillado corporal se realizó en sentido cráneo – caudal del cuerpo y de cada extremidad.

Variables evaluadas

1. Control

Se monitoreó a partir del 35 ± 12 ; 47 ± 10 y 49 ± 13 d del preparto para SM, PSO y CE respectivamente (valor inicial) y a los 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 ± 4 d del postparto la condición corporal (CC). Para cuantificar la CC se hizo uso de la Escala del National Institute Research of Dairy, la cual varía en números del 1 al 5 según el grado de reservas corporales, siendo el valor mínimo correspondiente al animal emaciado y el máximo al animal obeso (Fattet y Jaurena, 1998). El porcentaje de hematocritos (Hto) (%) como indicador de salud también fue monitoreado, para ello se realizó la toma de muestra de sangre de la vena coccígea, mediante el uso de una aguja vacutainer de 21” y en un tubo con heparina; esto se realizó a los 35 ± 12 ; 47 ± 10 y 49 ± 13 d del preparto para SM, PSO y CE respectivamente (valor inicial) y a los 21, 34, 47, 60, 73, 86 y 99 ± 4 d postparto. Tales muestras fueron colocadas en cava refrigerada para mantener la temperatura en 10°C hasta su análisis, en un lapso de tiempo inferior a 2 h posterior a la recolección de las muestras de sangre

heparinizada. En un cuarto limpio, fresco e iluminado dentro de la unidad de producción, fueron tomadas alícuotas en tubos capilares para la medición del Hto mediante su colocación en microcentrífuga durante 15 min (Camus, 1983).

2. Temperamento

a. Prueba de Reactividad en Brete (REAC). El 35 ± 12 ; 47 ± 10 y 49 ± 13 d preparto para SM, PSO y CE respectivamente, y a los 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 ± 4 d postparto se evaluó REAC a todos los animales (Grandin *et al.*, 1993; Halloway y Johnston, 2003; Hoppe *et al.*, 2010). El brete utilizado fue de contención y metálico. La REAC asigna un valor mínimo al animal más calmo y máximo al animal más nervioso (Grandin *et al.*, 1993; Voisinet *et al.*, 1997; Halloway y Johnston, 2003; Hoppe *et al.*, 2010). La calificación se otorga en función de la respuesta al aislamiento, separación del resto, y restricción de espacio en el brete de contención (Grandin *et al.*, 1993). La prueba ha demostrado ser una herramienta contundente en programas de selección y mejoramiento genético por temperamento (Grandin *et al.*, 1993; Voisinet *et al.*, 1997; Halloway y Johnston, 2003; Hoppe *et al.*, 2010; Magolski, 2012). Es una herramienta sencilla, rápida (4 segundos por animal) y segura para los involucrados en el proceso de la medición (animal, observador y personal de manejo de los animales). La escala utilizada definió los valores como: 1 = calmo: corresponde al animal que entra lentamente al brete desde la manga, se ubica en el interior del brete sin ofrecer resistencia. Pocos movimientos. 2 = atento: animal que entra al brete a velocidad media y explorando todo a su alrededor mediante olfato, vista, tacto con hocico. Movimientos moderados de las extremidades y tronco.

3 = nervioso/irritable/agresivo: animal que se resiste a entrar y/o cuando lo hace es forma violenta intentando continuar hacia la salida, una vez dentro del brete realiza movimientos fuertes, bruscos, intenta salir, empuja, pateo.

- Conducta en ordeño (COND): Cuantificación del acto, tiempo y contexto (Lahitte *et al.*, 2002; 2003). Se cuantificó y describió la cantidad de acciones (Grandin *et al.*, 1993; Lahitte *et al.*, 2002; 2003; Narváez *et al.*, 2006b; Fröberg *et al.*, 2008) de la vaca y su cría durante el ordeño (matutino y vespertino), en los periodos antes indicados y por un día (Narváez, 2005; Narváez *et al.*, 2006b). El procedimiento rutinario de los ordeñadores consistió en seleccionar una vaca, la cual fue conducida hacia un poste de la sala de ordeño mediante captura a través de una cuerda resistente a nivel del cuello. En paralelo, otro miembro del personal de ordeño liberó a la cría respectiva desde la becarrera contigua al corral de ordeño. Al encuentro de la vaca con su cría, el ordeñador procedió a sujetar con firmeza la vaca a la estructura (poste) (Figura 2) mediante la cuerda resistente, luego de aplicada una corta succión de la cría a la ubre de la madre, para estimular y desencadenar la eyección láctea, el ordeñador sujetó a la cría mediante otra cuerda a la misma estructura.



Figura 2. Sujeción de la vaca y su cría en el corral de ordeño

b. Se cuantificaron las siguientes acciones de comportamiento (si =1, no = 0):

• En la vaca.

Vocalización: bramidos manifiestos por la hembra lactante

Olfateo: hace contacto con su nariz sobre otros animales

Mira a la cría: la vaca mantiene la visión en su cría

Mira ordeñador: la vaca ubica su mirada hacia el ordeñador

Mira alrededor: la vaca gira la cabeza hacia distintas direcciones

Micción: Evacuación de orina

Defeca: Evacuación del material del tracto digestivo

Lame cría: Mediante la extensión de la lengua frota cualquier porción del cuerpo de la cría

Hociquea cría. Mediante el hocico se hace contacto con distintas partes del cuerpo de la cría.

Movimiento de los ojos. Cambio de la focalización de la visión de un lugar a otro sin movimiento de la cabeza.

Patea. El animal mueve alguna extremidad posterior hacia otro animal o hacia el ordeñador de manera violenta.

Brinca. El animal eleva de ambas extremidades posteriores.

Tumbada en el piso. Se mantiene postrada en el suelo de la sala de ordeño sin sufrir de patología asociada.

Orejas erectas. Ambas orejas permanecen erguidas.

Dorso arqueado. Vertebrae de la región dorsal ubicada en forma de arco

Cabeza erguida sobre la línea media horizontal del cuerpo

Huye. Avanza con fuerza y velocidad en dirección contraria a la ubicación del ordeñador

Bufar. Expulsa aire por las fosas nasales con fuerza y frecuencia rítmica dirigiendo cabeza al ordeñador

Embiste. Se dirige con fuerza y velocidad hacia el ordeñador

- En la cría (durante el ordeño de la madre mientras permanece amarrado al lado de ella).

Olfateo: mantiene la nariz en elevación y con evidentes inspiraciones

Vocaliza: bramidos manifiestos

Succión: Aplica succión sobre la piel de la madre.

Movimientos activos. Realiza movimientos de desplazamiento corporal

Brinca. Eleva ambas patas traseras

Mueve cola: durante el mamado agita la cola de lado a lado con energía

3. Eyección Láctea

Dos días por semana y en cada periodo preestablecido a partir de iniciada la producción de leche (5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 ± 4 d), se registraron:

a. Tiempos. Se registraron, mediante cronómetro, los siguientes tiempos:

- Estimulación (TE). Tiempo (s) durante el cual la cría estuvo en contacto con su madre aplicando estímulos visuales, olfativos y táctiles, adicionalmente realiza succión del pezón y extrae pequeñas cantidades de leche (Tesorero *et al.*, 2001). Este tiempo finaliza a criterio del ordeñador, según se haya iniciado la eyección láctea (“apoyo”) por lo que el ordeño es inminente.
- Ordeño (TO). Tiempo (min) durante el cual el ordeñador extrae la leche de la glándula mamaria de manera ininterrumpida.
- Intervalo estímulo-ordeño (tiempo muerto = TM). Por diferencia entre tiempo de inicio del ordeño y tiempo final de la estimulación (s). El TM corresponde a un tiempo sin ordeño ni estimulación debido a que el ordeñador retira la cría y la sujeta en la misma estructura del corral de ordeño donde se encuentra amarrada la vaca.

b. Fracciones de Leche

•Vendible total: cantidad de leche obtenida durante el ordeño (LVT) (Kg leche/vaca/d), registrada como peso en balanza electrónica. Se registró tanto para el ordeño matutino (LVA) (05:00) como para el vespertino (LVP) (16:30) por lo cual la LVT constituyó la sumatoria de ambas.

•Consumida por la cría (LCB) (Kg leche vaca/d). Las crías correspondientes a cada vaca del ensayo se pesaron antes y después del amamantamiento restringido (30 min). Este amamantamiento se realizó inmediatamente finalizado el ordeño de cada vaca. Por diferencia del doble pesaje se estimó la producción leche de la vaca capaz de ser extraída por la cría (LCBA, LCBP durante amamantamiento de la mañana o tarde respectivamente). LCB constituyó la sumatoria de LCBA y LCBP.

•Total (LT) (Kg leche/vaca/día). La sumatoria de las fracciones LVT y LCB representa el valor diario de producción de leche total por cada vaca.

•Total corregida al 4% de grasa (LT4%) (Kg leche/vaca/d) $(LT4\%) = (LVT \times 0,4) + (LVT \times \%GLV/100) \times 15 + (LCB \times 0,4) + (LCB \times \%GLCB/100) \times 15$

•Acumulada a 90 días (LAC90): $LAC90 = LT \text{ (Kg leche/vaca/d)} \times 90$

•Acumulada a 90 días corregida al 4% de grasa LAC904% (Kg leche/vaca/90 d): $LAC904\% = [(LVT \times 0,4) + (LVT \times \%G LV/100) \times 15 + (LCB \times 0,4) + (LCB \times \%G LCB/100) \times 15] \times 90.$

•Eficiencia del ordeño (EO). Mediante la ecuación $(LCB/LT) \times 100$ se obtuvo la eficiencia del ordeño en cuanto a la remoción de la leche

contenida en la glándula mamaria posterior a cada ordeño (mañana –EOA- o tarde -EOP-).

c. Composición de la leche (%). Del total de LV individualizada por animal y en cada ordeño, se recolectó una muestra homogeneizada (posterior a un minuto de agitación del fondo a la superficie y en forma circular); para la fracción LCB el procedimiento de la toma de muestra se realizó simultáneamente al amamantamiento restringido postordeño, así, el ordeñador extrajo leche de cada cuarto que la cría succionó durante los primeros cinco minutos del amamantamiento. Cada muestra se colocó en un recipiente plástico de 50 mL, previamente higienizado, e identificado con el número de la vaca. Las muestras se colocaron en cava con geles refrigerante para disminuir la temperatura a unos 25°C aproximadamente. La evaluación de la composición láctea (LVA, LVP, LCBA, LCBP) de las muestras de leche se realizó mediante el equipo MilkAnalyzer® y en un tiempo no mayor a 2 h después de recolectadas. Este equipo permitió estimar la composición proporcional (%) de grasa (G), sólidos no grasos (SNG), proteína (P), lactosa (L) y sales (S) mediante un sistema de ultrasonido (Baeten *et al.*, 2010), configurado para un amplio rango de valores en cada parámetro y con elevada precisión y repetibilidad; el equipo fue calibrado para las muestras previo al inicio del ensayo (Anexo 1). Como propiedad física de la leche, el equipo, cuantifica el valor de densidad de la misma (D) (g/L) y el punto crioscópico.

4. Reinicio de Actividad Ovárica (RAO)

Quincenalmente y a partir del día 21 postparto, se realizó una revisión ginecológica mediante palpación transrectal y aplicación de ultrasonografía (Sonoace Pico ®, con sonda lineal de 5 MHz) (21, 34, 47, 60, 73, 86 y 99 ± 4 d postparto). Con ello, se evaluó la salud del tracto genital femenino en regresión postparto. Para el caso de los folículos, estos se clasificaron según: Clase 1 (FC1) (≤ 5 mm), Clase 2 (FC2) (6-9 mm) o Clase 3 (FC3) (≥ 10 mm) (Díaz *et al.*, 1998; Rodgers e Irving-Rodgers, 2010) y en los cuerpos lúteos (CL) se registró largo, ancho (mm) y presencia de cavidad. Observaciones asociadas a la salud del tracto reproductivo o a los signos de la actividad reproductiva (presencia de limo, enrojecimiento de la vulva) también fueron consideradas.

5. Hormonas

Se recolectaron muestras de sangre o leche en los animales (novillas preñadas o vacas en ordeño) sujetas a tratamiento. Esto se realizó a los fines de determinar hormonas asociadas a la fisiología del comportamiento, reproducción y eyección láctea. A continuación se detallan las hormonas y procedimientos.

a. Cortisol (COR) (pg/mL). Se colectaron muestras de sangre a los 43 ± 13 d preparto del lote de novillas gestantes y a los 21, 34, 47, 60, 73, 86 y 99 ± 4 d posteriores al parto. Para ello, se introdujeron los animales en el brete y previa a la palpación y ultrasonido, se colectó un tubo de sangre en la vena coccígea de cada vaca mediante aguja vacutainer de 21"; el tubo no contenía aditivo anticoagulante ya que el propósito fue obtener suero. Todas las muestras fueron colectadas a la misma hora, con un intervalo mínimo de tiempo entre animales, esto para minimizar el

efecto de la conocida circadianidad del CORT y posterior a la evaluación reproductiva para, de igual forma, minimizar este efecto de manejo. Los tubos colectados fueron colocados de forma inclinada en un ángulo de 30° y a la sombra. Una vez formado el coágulo (± 10 min) fueron colocados en cava refrigerada para mantener las muestras entre 8 y 10°C. En un tiempo inferior a 2 h los tubos con muestras de sangre coagulada y refrigerada fueron centrifugadas por 20 min a 3000 rpm (IEC HN-SII®) (Vahdat *et al.*, 1979; Pulido *et al.*, 1991). Las alícuotas de suero sobrenadantes fueron retiradas, mediante el uso de puntas de pipeta descartables, en microviales eppendorf de 1,5 cc de capacidad y por duplicado. Inmediatamente, se procedió a su congelación a -20°C hasta su traslado al Laboratorio de Reproducción del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP) y donde permanecieron, igualmente, a -20°C hasta el procesamiento.

Para la determinación del COR contenido en las muestras de suero de cada vaca se aplicó el protocolo del kit comercial de ELISA (Cortisol EIA kit, Catalogo No. ADI-900-071; ENZO ®). Se utilizó una pipeta multicanal y equipo de lavado automático para 8 pozos en simultáneo (succionador y aplicador de solución de lavado). El protocolo incluye la preparación de la curva estándar para COR ($n=7$; 1=10.000, 2=5.000, 3=2.500, 4=1250, 5=625, 6=313 y 7=156 pg/mL) a partir del estándar de COR de 100.000 pg/mL, adicionalmente otros componentes del kit promueven o paralizan la unión del COR de la muestras con el anticuerpo, mediante una reacción colorimétrica el espectrofotómetro (Multiskan Plus 1.4, ajustado a 405 nm) determina la densidad óptica (DO); conocida la DO y concentración de COR en las muestras de

la curva estándar se obtiene la ecuación (regresión logística con R^2 de ajuste) correspondiente a cada corrida.

La validación del kit contempló la evaluación de los parámetros exigidos por la prueba (Anexo 2). Se verificó la calidad de la prueba según las especificaciones en términos de Actividad Total (AT) (%), Unión no específica (NSB) (%), Valor Cero (Bo) (%), calidad de la pendiente y valores de concentración (pg/mL) al 20, 50 y 80% del intercepto en la curva estándar. Posteriormente, se procedió a interpolar cada valor de DO correspondiente a las muestras de campo de las vacas, con ello se obtuvo su valor respectivo de concentración de COR (pg/mL). Adicionalmente, se colocaron muestras de presunto valor alto y bajo de COR al inicio y final de cada corrida (siempre las mismas muestras), estas sirvieron como controles de calidad intra e interensayo (Jacobson, 1998; FAO/AIEA, 1999). Con dichos valores de concentración se calculó la Precisión de la prueba a través del coeficiente de variación (CV=%) respectivo, siendo 9,6% el valor correspondiente a la variación intraensayo (< 10%) y 13,2% para el interensayo (< 15%) (Jacobson, 1998; FAO/AIEA, 1999); por otro lado, la prueba presentó una sensibilidad de 61,16 pg/mL. Valores de concentración por encima de 300 pg/mL pueden estar asociados a mayor nivel de estrés, sin embargo, el contexto (grupo racial, manejo, estado fisiológico, momento del día en la toma de la muestra debido al ritmo circadiano) de cada animal es determinante en el análisis y comparación e interpretación biológica de los resultados entre grupos de animales en estudio (Trevisi *et al.*, 2005; Negrão y Marnet, 2006).

b. Oxitocina (OT) (pg/mL). Se colectaron muestras de LV, de cada vaca, y cada ordeño (matutino y vespertino). Esto se realizó durante el segundo día de evaluación de la producción de leche, según los periodos de evaluación predefinidos (5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 ± 4 d postparto). Las alícuotas de LV se recolectaron de la glándula mamaria trasera derecha. Dentro de cada ordeño, se recolectó un número de muestras variable según el tiempo de ordeño de cada vaca. La primera muestra fue recolectada al amarrar la vaca al puesto de ordeño y eliminar por compresión manual un chorro de leche de la cisterna del pezón (despunte para eliminar suciedad y bacterias) esta muestra se denominó -t1 (-1 min). Inmediatamente después, se inició la estimulación preordeño mediante el traslado de la cría hacia la madre (estimulo materno natural - “apoyo”- para desencadenar eyección láctea), finalizada la estimulación se colectó una muestra de leche, la cual se consideró igual al tiempo cero de ordeño ($t_0 = 0$ min), a partir de allí, se colectaron muestras cada minuto ($t_1 = 1$ min, $t_2 = 2$ min...) hasta el tiempo final (t_f) del ordeño según cada animal (Bruckmaier *et al.*, 1994; Samuelsson, 1996; Johansson, 2000; Negrão y Marnet, 2006).

Para la toma de muestra se utilizaron viales estériles de 5 mL en los cuales se colocó la leche ordeñada directamente de la glándula mamaria en ordeño. Las muestras fueron refrigeradas en cava para disminuir la temperatura a 4°C de forma inmediata. Las muestras de leche fueron centrifugadas a 3000 rpm (IEC HN-SII) por 15 min, en un lapso no mayor a 2 h posterior a la recolección. Mediante una pipeta descartable se atravesó la capa de grasa sobrenadante de cada muestra y se procedió a aspirar y trasvasar la porción intermedia (fase líquida) hacia un nuevo vial

(eppendorf, 2 cc) destinado a almacenamiento a -20 °C, hasta su procesamiento en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción (INIA-CENIAP).

En el laboratorio, las muestras fueron descongeladas, a temperatura ambiente, y centrifugadas nuevamente a 10000 rcf (6600 rpm; rotor 20 cm) en centrífuga refrigerada (IEC CL31R Multispeed Thermo). Se retiró la porción intermedia para el trasvasado y procesamiento, según las especificaciones del kit EIA (ADI-900153; ENZO Life Science®) de inmunoensayo competitivo. Se verificaron los parámetros del kit comercial: Actividad Total (AT) (%), Unión No Específica (NSB) (%), Valor Cero (Bo) (%), calidad de la pendiente y valores de concentración (pg/mL) al 20, 50 y 80% del intercepto en la curva estándar y se realizó la regresión logística (DO vs. OT) en cada corrida con su valor R^2 de ajuste. Se determinaron los valores de OT (pg/mL) en las muestras.

Con el valor basal de OT, el pico y la persistencia (durante el tiempo que ocurre la extracción de leche mediante el ordeño) se calcula el área bajo la curva (AUC) (pg/mL³); el AUC es el resultado de la integral de los valores de OT en cada punto, es decir, desde $-t_1$ hasta t_f (Negrão y Marnet, 2003; Weis, 2004).

c. Progesterona (P_4) (ng/mL). El día de la evaluación ginecológica y evaluación de las estructuras ováricas por ultrasonografía (21, 34, 47, 60, 73, 86 y 99 ± 4 d), se recolectó una muestra de sangre por animal en tubo sin anticoagulante. Cada tubo fue colocado con inclinación de 30° y a la sombra, para la formación del coágulo; después de aproximadamente 10 min los tubos fueron colocados en cava refrigerada a 10°C (DSI, 2008). En un tiempo inferior a las 2 h de almacenamiento en frío las muestras fueron centrifugadas (IEC HN-SII®) por 20 min a 3000 rpm (Vahdat *et al.*,

1979; Pulido *et al.*, 1991), para trasvasar el suero sobrenadante. Mediante el uso de puntas de pipeta descartables, a microviales eppendorf de 1,5 mL de capacidad. Se procedió a la congelación de los viales a temperatura de -20°C hasta su traslado al Laboratorio de Reproducción (INIA-CENIAP). A igual temperatura permanecieron almacenadas hasta la determinación de P₄.

La concentración de P₄ se determinó mediante la técnica de ELISA del kit comercial DS-EIA-Steroid-Progesterone (DSI, SRL ®), para ello, se procedió, tal como indica las instrucciones del kit. Un pool de tres muestras de suero de novillas gestantes fue utilizado como valor alto de P₄, así mismo, una muestra tomada en una vaca de cinco d de parida sirvió de valor mínimo. Estos se incluyeron a inicio y final de todas las corridas para servir de controles de calidad intra e interensayo igual al caso de COR (FAO/AIEA, 1999). El lector de placas de ELISA (Multiskan Plus 1.4) fue ajustado a lectura en absorbancia de 450 nm.

Los valores de DO fueron tabulados y asociados a la concentración de P₄ de los estándares disponibles en el kit según el fabricante. Mediante la regresión logística se halló la ecuación que definió cada corrida, con su respectivo R², ellas permitieron, por interpolación hallar la concentración de P₄ (ng/mL) de cada muestra. Valores de P₄ por encima de 2,5 ng/mL se asocian a la presencia de cuerpos lúteos funcionales (DSI, SRL®; Roa *et al.*, 1997a, b; FAO/AIEA, 1999).

V. 2. EFECTO DE DOS DIFERENTES TIPOS DE MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN Y

REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MECANIZADO Y SIN CRIA AL PIÉ.

Ubicación

El experimento se realizó en la misma unidad comercial de producción descrita anteriormente. La experiencia se llevó a cabo durante los meses de febrero a julio. La temperatura media fue de 24,6°C, con un 33% del volumen total de precipitación de ese año (1057 mm).

Animales y manejo

Iguales criterios al experimentos anterior fueron aplicados a un total de 38 novillas F₁ (Holstein x Brahman), producidas mediante el cruce de vacas Brahman puras inseminadas a 18 meses y 380 Kg de peso vivo con semen comercial de Holstein); la edad aproximada fue de 27 ± 2 meses de edad. Todas las novillas ingresaron gestantes a la experiencia con $7,5 \pm 1$ mes de preñez, verificado la posible fecha de parto en función de fecha de servicio por control de inseminación artificial y posterior revisión ginecológica mediante palpación transrectal. Todas las novillas preñadas fueron mantenidas a potrero, durante el día y la noche, para el pastoreo de *Brachiaria brizantha* cv. Toledo (5,3% proteína cruda) en forma continua; agua fresca y limpia y minerales a voluntad estuvieron siempre disponibles en los potreros.

Una vez ocurridos los partos, concentrados entre los meses de abril y mayo, y en condición natural de potrero, sin asistencia o vigilancia humana, el binomio madre-cría fue trasladado, a un corral cercano a la sala de ordeño. La cría recibió cuidados

primarios; pesaje, cura del ombligo (yodo al 5%), identificación del sexo y registro para la identificación del animal (tatuaje en oreja izquierda con el año de nacimiento y número correlativo y tatuaje en oreja derecha con el número de la madre). El binomio permaneció en un corral individual las primeras 24 h post traslado del potrero y recibió revisión frecuente de consumo de calostro. A las 48 h la vaca fue incorporada al rebaño de vacas en ordeño, con ello inició las rutinas diarias de dicho rebaño en producción de leche: pastoreo rotacional de *Brachiaria brizantha* cv. Toledo (2 d de ocupación y 28 d de descanso) durante el día y la noche y traslado a corral de ordeño en horas de la mañana (06:00) y la tarde (17:00) para ordeño mecanizado en sala espina de pescado sin cría al pié.

Todas las vacas de primer parto recibieron 3 Kg de un concentrado comercial con 18% de proteína; agua y minerales estuvo disponible *ad libitum* en potreros y agua adicional en corral de recepción. Entre el día 2 y 7 postparto la vaca fue ordeñada como medida de disminución de la presión intramamaria debida a la secreción del calostro, estimulación para la secreción láctea y acostumbramiento a la labor. Finalizada, la producción de calostro se inició el ordeño a fondo de todas las vacas. Las primíparas fueron ordeñadas al principio de cada horario de ordeño. El lote total de vacas en ordeño se separó en grupos que ingresaron a corral de alimentación pre-ordeño (Figura 3). Este lote sería posteriormente introducido, total o parcialmente en cada pasillo lateral de ubicación de los animales para el ordeño según la capacidad de los mismos y la cantidad de animales.

Puestos de ordeño



Figura 3. Detalle de entrada a sala de ordeño mecanizada contigua a corral de alimentación pre-ordeño.

La sala de ordeño está conformada por 12 puestos de ordeño a cada lado de eje central (fosa), en un diseño de espina de pescado. El sistema de ordeño mecanizado comercial es de línea de leche alta y graduado, para el momento del ensayo, en ciclos de pulsación/descanso 55:45; mediante medidores digitales se registra la cantidad acumulada de la leche que fluye durante el ordeño de cada animal.

En la experiencia, se aplicaron los principios contemplados en el Código de Bioética y Bioseguridad de Venezuela (MPPCyTII, 2008).

Duración del estudio

El estudio se inició durante el periodo preparto (-49 ± 23 d) ya que ese día fueron seleccionadas las novillas gestantes y recolectadas muestras sanguíneas previa aplicación de los tratamientos. Inmediatamente, los animales fueron aleatorizados

para la distribución homogénea. A partir del siguiente día se inició con la aplicación de los tratamientos, así como el seguimiento, control y evaluación hasta los 90 ± 4 d postparto, para un total de 184 d (± 23 d) de evaluación.

Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado para evaluar el efecto de dos tratamientos sobre distintas variables relacionadas con comportamiento, reproducción y eyección láctea. Sobre la base de investigaciones previas (Drescher, 2003; Narváez, 2006 a, b; Bertenshaw *et al.*, 2008; Bertenshaw y Rowlinson, 2009) se fijaron períodos de muestreo postparto, los cuales fueron: -49 (preparto), 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 d.

El modelo estadístico aplicado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijkl} \quad \text{con } \varepsilon_{ijkl} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$$

Donde:

Y_{ijkl} = valor de la observación del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo período

μ = Media

α_i = Efecto del i-ésimo tratamiento ($i = 1, 2$)

β_j = Efecto del j-ésimo periodo ($j = 1, 2 \dots 8$)

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo período

ε_{ijk} = Efecto aleatorio del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo período

Tratamientos

Se aplicaron tratamientos basados en el marcaje de conductas debidas a la implementación de manejo gentil o no, a saber:

- Sin manejo gentil humano (SM) (n=19). Las vacas de éste grupo iniciaron el ordeño sin marcaje de manejo humano gentil preparto, es decir, permanecieron en potreros durante la gestación, el contacto humano diario y cercano inició acontecido el parto y durante la labor de ordeño.

- Manejo gentil con contacto humano positivo (CE) (n=19). El día 68 ± 22 el lote de novillas gestantes inició el paso por los puestos de ordeño de la sala. Esto se realizó de manera lenta, sin gritos, ruidos o golpes a animales e instalaciones y bajo principios de distancia de fuga (Grandin, 2010) y bienestar. En cada puesto de ordeño, las novillas gestantes fueron cepilladas (Bertenshaw *et al.*, 2008; Bertenshaw y Rowlinson, 2009), por 10 min de lunes a sábado, en ambas extremidades traseras, ingle, abdomen y glándula mamaria. El tratador estuvo ubicado dentro de la fosa de la sala de ordeño.

Variables evaluadas

1. Control

Se cuantificaron la condición corporal (CC) bajo iguales criterios y metodología que en el experimento anterior (NIRD 1 al 5, Fattet y Jaurena, 1998), así como el porcentaje de hematocritos (Hto) (%) (Camus, 1983); indicadores de grado de reservas corporales y salud respectivamente. Ambas mediciones se realizaron el día 42 ± 16 y 69 ± 22 preparto para las novillas de SM y CE respectivamente, siendo

éstos los valores iniciales y previos a la aplicación de los tratamientos, posteriormente se monitorearon a los 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 ± 4 del postparto.

2. Temperamento

a. Prueba de Reactividad en Brete (REAC). El 42 ± 16 y 69 ± 22 d preparto para SM y CE, respectivamente, y a los 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 ± 4 d postparto se evaluó REAC a todos los animales (Grandin *et al.*, 1993; Halloway y Johnston, 2003; Hoppe *et al.*, 2010).

b. Conducta en ordeño (COND): Cuantificación del acto, tiempo y contexto (Lahitte *et al.*, 2002; 2003). Se cuantificó y describió la cantidad de acciones (Grandin *et al.*, 1993; Lahitte *et al.*, 2002; 2003; Narváez *et al.*, 2006b; Fröberg *et al.*, 2008) de la vaca durante el ordeño (matutino y vespertino) en los periodos antes indicados y por un día (Narváez, 2005; Narváez *et al.*, 2006b). Se cuantificaron las siguientes acciones de comportamiento (si =1, no = 0):

- En la vaca.

Micción: Evacuación de orina

Defeca: Evacuación del material no digerido por el tracto digestivo

Patea. El animal mueve alguna extremidad posterior hacia otro animal o hacia el ordeñador de manera violenta.

Brinca. El animal eleva de ambas extremidades posteriores.

3. Eyección Láctea

Dos días por semana y en cada periodo preestablecido a partir de iniciada la producción de leche (5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 ± 4 d), se registraron:

a. Tiempos. Mediante el uso de cronómetro, se cuantificaron los siguientes tiempos:

- Intervalo llegada al puesto - estimulación (tiempo muerto = TM). Por diferencia entre tiempo de llegada del animal a su puesto y el inicio de la estimulación por el ordeñador (s).

- Estimulación (TE). Tiempo (s) durante el cual el ordeñador realizó el lavado y secado de los pezones conjuntamente con el despunte de los primeros chorros de leche (dos por cada cuarto). Este tiempo finaliza a criterio del ordeñador según se haya iniciado la eyección láctea (“apoyo”), por lo que el ordeño es inminente.

- Ordeño (TO). Tiempo (min) que se inicia al colocar cada pezonera en el respectivo pezón, (desde la primera) y culmina al retirarlas (todas), y durante el cual el equipo de ordeño mecanizado extrae la leche mediante presión de vacío sobre cada glándula mamaria y de forma ininterrumpida.

b. Fracciones de Leche

- Vendible a los 2 min (LV2) (L). Cantidad de leche registrada en el medidor automático digital (L) una vez transcurridos dos (2) min de iniciado el ordeño de la vaca.

- Vendible a los 5 min (LV5) (L). Cantidad de leche registrada en el medidor automático digital (L) una vez transcurridos cinco (5) min de iniciado el ordeño de la vaca.

- Vendible del ordeño de la mañana (LVA) (L leche/vaca/d) o la tarde (LVP) (L leche/vaca/d). Cantidad de leche registrada en el medidor automático digital (L) una vez transcurrido el ordeño de la mañana o la tarde para cada vaca.

- Vendible del ordeño de la mañana (LVA4%) (L) o la tarde (LVP4%) (L) corregida al 4% de grasa = $\{[(LV2 \times 0,4) + (LV2 \times \%GLV \text{ cisternal}/100)] \times 15\} \times 0,30 + [(LVT-LV2) \times 0,4 + (LVT-LV2) \times \%GLV \text{ alveolar}/100] \times 15\} \times 0,70$ ^{1/}

^{1/}considerando que la fracción de leche cisternal representa 30% y la alveolar el 70% del total de la leche contenida en la glándula mamaria (Ayadi *et al.*, 2004; Bruckmaier, 2005).

- Vendible total (L leche/vaca/d) LVT: cantidad de leche resultante de la sumatoria de las fracciones parciales LVA y LVP.

- Vendible total corregida al 4% de grasa (LVT4%) (L leche/vaca/d) = LVA4% + LVP4%

- Acumulada a 90 días (LAC90): $LAC90 = LVT \text{ (L leche/vaca/d)} \times 90$

- Acumulada a 90 días corregida al 4% de grasa LAC904% (L leche/vaca/90 d) = $LVT4\% \times 90$.

•Cantidad de Leche Residual (LR) (L). Finalizado el ordeño natural y mediante la administración intramuscular de oxitocina sintética comercial (1 mL = 10 UI) (Drescher, 2003) se forzó a la eyección de aquella cantidad de leche (L) no ordeñada. Fueron recolocadas las pezoneras para su extracción y medición automatizada.

•Eficiencia del ordeño (EO) (%). Mediante la ecuación $EO=(LR/LVT)*100$ se obtuvo un valor correspondiente a la fracción proporcional de leche no extraída.

c. Composición de la leche (%). De la fracción de leche al inicio del ordeño (fracción cisternal) y de aquella al final del ordeño (fracción alveolar) se tomaron 50 mL (Ayadi *et al.*, 2004) directamente en un recipiente plástico con tapa, previamente higienizado. Las muestras fueron colocadas en cava con geles refrigerantes para reducir la temperatura a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento, lo cual ocurrió en un lapso inferior a 2 h posteriores a la recolección. Las variables evaluadas fueron: composición proporcional (%) de grasa (G), sólidos no grasos (SNG), proteína (P), lactosa (L) y sales (S) mediante un sistema de ultrasonido (Baeten *et al.*, 2010) (MilkAnalyzer®) calibrado (Anexo 1). Como propiedad física el equipo arroja el valor de densidad de la leche (D) (g/L). El procedimiento se repitió para cada ordeño y en los periodos previamente fijados para cuantificación de fracciones de leche.

4. Reinicio de Actividad Ovárica (RAO)

Iguals consideraciones en cuanto al equipo, procedimientos y periodos que en Experimento 1 fueron aplicadas.

5. Hormonas

Se siguieron los mismos procedimientos para recolección de muestras y procesamiento en el caso del CORT y P₄ que en el experimento anterior.

En el caso de la Oxitocina (OT), las consideraciones de envasado, conservación y procedimiento a campo y laboratorio fueron las mismas que en el Experimento 1. Sin embargo, hubo consideraciones especiales para la recolección de las muestras, debido a las particularidades del Experimento 2: ausencia de la cría y uso de sistema mecanizado de ordeño. En este sentido, las alícuotas de LV para evaluar la concentración de OT correspondieron a los tiempos definidos según:

-t1 (-1 min) = muestra de leche preordeño. Una vez que la vaca estuvo ubicada en puesto de ordeño y fue realizada la eliminación manual del contenido de leche de la cisterna del pezón (despunte), e inmediatamente se llenó un vial de vidrio de 10 mL y tapa de rosca.

t0 (0 min) = inmediatamente después del lavado y secado de los pezones, masaje de la ubre y pezones.

t1 a tf (1, 2, ... n) = se recolectaron muestras directamente de la glándula mamaria, iniciado el ordeño, durante cada min sucesivo (Bruckmaier *et al.*, 1994; Samuelsson, 1996; Johansson, 2000; Negrão y Marnet, 2006).

Análisis Estadístico

Para las variables control (CC y Hto) se aplicó estadística descriptiva de media, valor máximo, mínimo y desviación estándar desde el inicio de ensayo y monitoreo durante el mismo, hasta el final.

La REAC de la novilla gestante y de la vaca primípara durante su postparto fue analizada por varias vías. Se analizan las diferencias estadísticas obtenidas por ji-cuadrada para las frecuencias de los rangos considerados en el estudio (REAC = 1, 2, 3), según los tratamientos (Ceballos, 2014), y finalmente, dada la necesidad de análisis en función de los períodos de tiempo evaluados y los tratamientos, se aplicó la Prueba de Supervivencia (supervivencia, mortalidad) de Kaplan-Meyer; para ello hubo que reducir las respuestas a (1, 0) en los animales sometidos al manejo de los tratamientos en función de los tiempos de evaluación (Marqués de Sá, 2007). Se asumió como “cero” (muere) al valor de REAC =1 y como el valor “uno” (vive) de la prueba a los valores de REAC 2 y 3 asumiendo distintos grados de nerviosismo del animal debido a la manipulación humana en instalaciones (Grandin *et al.*, 1993; Voisinet *et al.*, 1997; Halloway y Jhonston, 2003; Hoppe *et al.*, 2010).

En el caso del COND se aplicaron criterios de Lahitte *et al.* (2002; 2003), Narváez (2005) y Villariño (1997) y se aplicó un análisis estadístico de ji-cuadrada para las frecuencias dicotómicas (no = 0; si = 1) de los comportamientos. Se correlacionaron los comportamientos de la vaca, de la cría y entre ambos a través de Prueba de Correlación de Spearman.

Para aquellas variables relacionadas con el proceso fisiológico de la eyeción láctea (TE, TO, TM, LVA, LVP, LV2, LV5, LCB, LT, LT4%, LAC90, LAC904%,

EOA, EOP, G, SNG, P, L, S, D -en cada ordeño y fracción-), todas de carácter continuo y correlacionadas en los sucesivos periodos (5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 ± 4), verificados los supuestos del modelo estadístico, se realizó un análisis a través del modelo mixto para medidas repetidas en el tiempo, con criterios de máxima verosimilitud restringida (REML). En aquellas variables donde se encontró efecto del tratamiento y/o período de evaluación, se muestran las diferencias estadísticas ($p < 0,05$) y medias ajustadas (Media de mínimos cuadrados = MMC) (Gómez *et al.*, 2012).

Mediante MANOVA se analizaron las estructuras ováricas presentes: número de folículos (según su clases: FC1, FC2, FC3 y totales = NFT) y de CL, hasta los 90 d postparto (Gómez *et al.*, 2012). Se presentan los valores como medias de mínimos cuadrados (MMC) por tratamiento. Se aplicó análisis de Supervivencia Kaplan-Meyer (Si = 1; No = 0) para cada estructura según tiempo y tratamientos (SM, PSO, CE) (Marqués de Sá, 2007; Pinto-Santini *et al.*, 2009). Los estadísticos de Gehan-Wilcoxon, Logrank Test y Peto-Wilcoxon determinan el valor de probabilidad de la ji-cuadrada para los tratamientos. La gráfica de la función de Hazard permitió la mejor interpretación.

En el caso de CORT, P₄, Nivel Basal de OT (-t₁ = -1min) y AUC para OT de cada ordeño se aplicó MANOVA para medidas repetidas en el tiempo según los tratamientos.

Se aplicó Prueba de Correlación (R) a los fines de determinar el grado de asociación ($p < 0,05$) entre variables. En el caso de variables discretas fue utilizada la

prueba de correlación de Rango de Spearman y en el caso de aquellas variables continuas se aplicó prueba de correlación de Pearson.

El paquete estadístico Statistical (IBM® SPSS 21®) sirvió de apoyo para todos los análisis expuestos.

VI. RESULTADOS

VI. 1. EFECTO DE TRES DIFERENTES TIPOS DE MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN Y REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MANUAL Y CON CRIA AL PIE.

1. Control

La CC (NIRD 1-5) disminuyó progresivamente a lo largo de la experiencia en todos los animales evaluados. El valor inicial del grupo de novillas gestantes fue de $3,0 \pm 0,2$, sin diferencia entre grupos por tratamientos ($p=0,30$). Al 90 d postparto se encontró en $2,5 \pm 0,2$; representando un 20% de pérdida de grado de reservas corporales. En cuanto a la proporción (%) de Hto en sangre, el valor promedio inicial fue de $32 \pm 3,7$ % y a los 90 d postparto se ubicó en $29 \pm 2,6$, equivalente a menos de un 10%.

2. Temperamento

a. Reactividad en el Brete (REAC). Fueron analizados 224 registros. La Prueba de Correlación de Rango de Spermán mostró la asociación ($R=-0,38$; $p<0,01$) entre los tratamientos. REAC y tiempo también mostraron asociación ($R = -0,65$; $P <0,01$). En ambos casos, las correlaciones resultaron negativas lo cual indica que a mayor interacción gentil humano – animal y mayor transcurrir del tiempo la REAC es menor.

En términos generales, la práctica del cepillado corporal de la novilla gestante disminuyó la REAC ($p < 0,01$) de la vaca F1 primípara, en relación a cualquiera de los otros dos tratamientos aplicados (Figura 4). La Figura 5 muestra la frecuencia en la que se observaron los valores de la escala de REAC (1, 2, 3), según cada tratamiento.

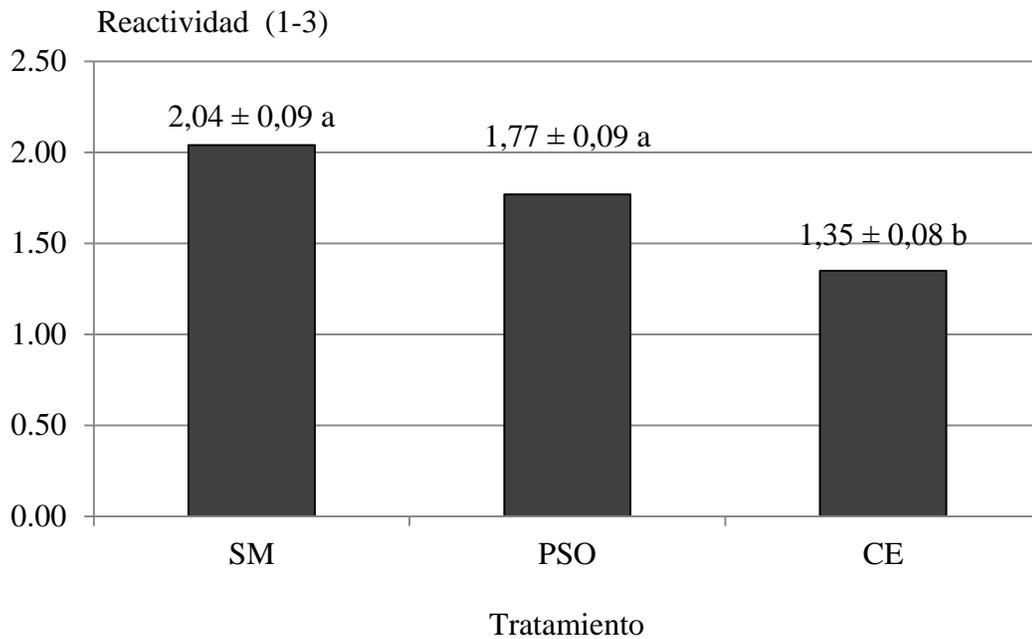


Figura 4. Reactividad en el Brete (REAC) según el tratamiento aplicado a las novillas gestantes.

SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal. Distintas letras corresponden a diferencias estadísticas entre tratamientos dentro de periodo ($p < 0,01$).

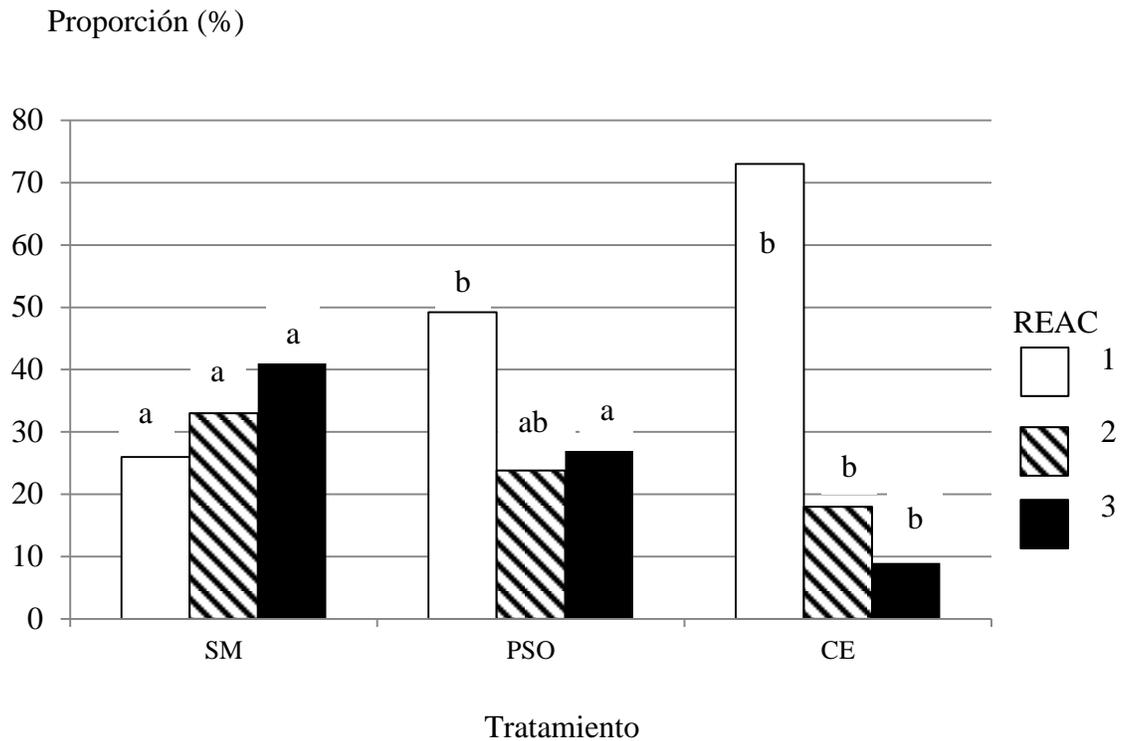


Figura 5. Frecuencia de la prueba de Reactividad en el Brete (REAC) según el tratamiento considerado.

SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal. REAC 1= calmo, 2 = atento, 3 = nervioso/irritable/agresivo.

En el Cuadro 1 se detallan los cambios en el tiempo, tal como media y desviación estándar de la media para la Reactividad en Brete (REAC) cuantificada en hembras vacunas según los días aplicación o no del tratamiento de manejo gentil (cepillado corporal y paso por manga) desde el parto, esto con fines descriptivos y de apreciación cualitativa de los cambios sucesivos que surgen.

Cuadro 1. Valores de la prueba de Reactividad en el Brete para hembras vacunas cruzadas según el periodo evaluado y tratamiento considerado

Día de muestreo (d)		Reactividad (1 - 3)		
		SM	PSO	CE
Preparto: - 43 ± 13		2,8 ± 0,4	2,8 ± 0,5	2,6 ± 0,7
Postparto	5 ± 4	2,7 ± 0,5	2,5 ± 0,8	1,6 ± 0,7
	15 ± 4	2,7 ± 0,5	2,1 ± 0,8	1,3 ± 0,5
	30 ± 4	2,2 ± 0,4	1,8 ± 0,5	1,2 ± 0,4
	45 ± 4	2,1 ± 0,3	1,8 ± 0,5	1,1 ± 0,3
	60 ± 4	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
	75 ± 4	1,3 ± 0,7	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,4
	90 ± 4	1,3 ± 0,7	1,0 ± 0,0	1,00 ± 0,0

SM = sin manejo; PSO = paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal; ^{2/} 24 ± 22; 43 ± 17; 43 ± 14 para SM, PSO, CE, respectivamente.

La Figura 6 muestra el análisis gráfico arrojado por la Prueba de Sobrevivencia para REAC (0 = calmo; 1 = nervioso) según los tratamientos parto aplicados. El tiempo 0 se hizo equivalente al valor preparto de las novillas gestantes (inicial o pretratamientos), los sucesivos valores corresponden a aquellos posteriores al parto (5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 d). Las pruebas de criterios de Gehan-Wilcoxon, Logrank y Peto-Wilcoxon indicaron la diferencia estadística ($p < 0,01$) de PSO contra CE hasta el 60 y 75 d postparto, respectivamente.

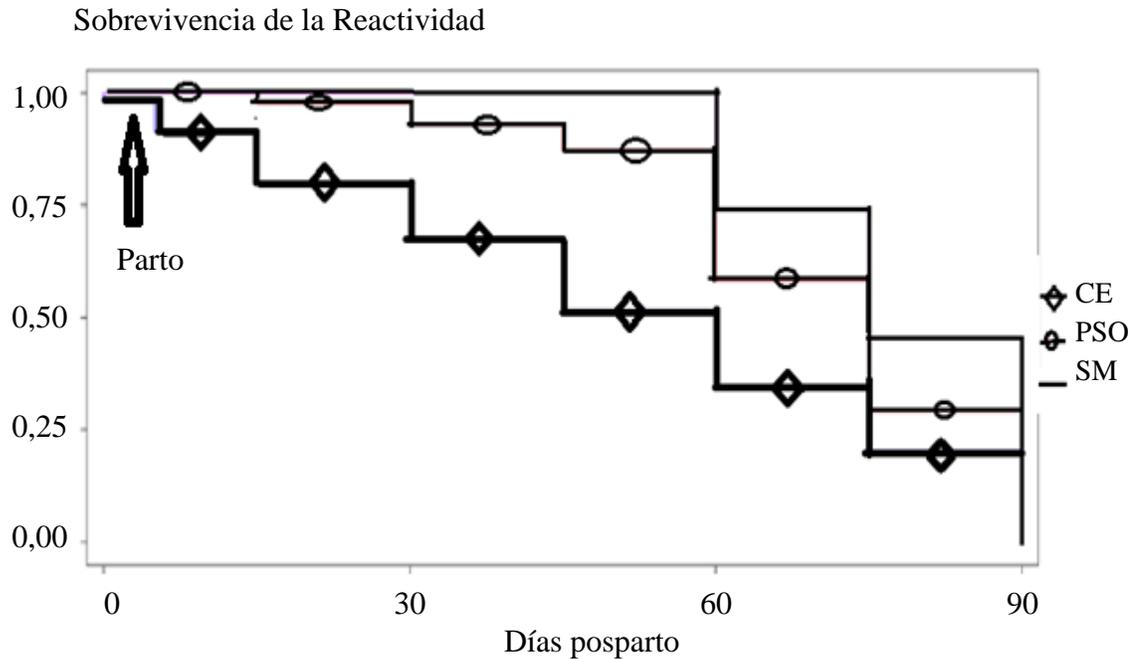


Figura 6. Curva de Sobrevivencia para la Prueba de Reactividad en el Brete de hembras vacunas sometidas a tratamientos de manejo gentil humano – animal.

SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal durante el período de evaluación.

En CE, desde el 5 d postparto se hallaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) con respecto a PSO y SM; PSO se igualó a CE a partir de día 60 d postparto.

b. Etograma

- Primeras 48 horas. El parto ocurrió en el potrero, por lo que una vez trasladado el binomio madre-cría al corral contiguo a la sala de ordeño se procedió a observar las actividades de interacción epimelética y et-epimelética

durante las primeras 48 h. La Figura 7 muestra los acontecimientos generalizados.

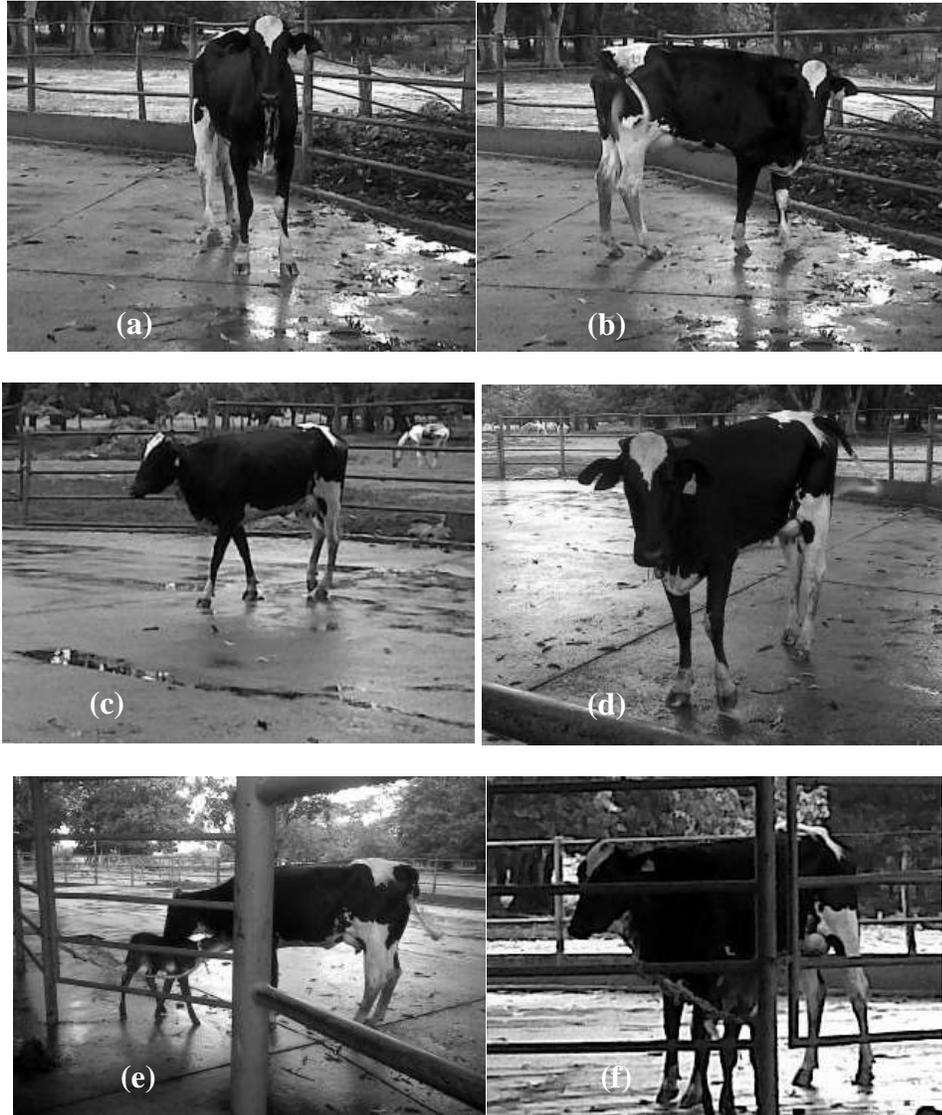




Figura 7. Secuencia de actividades comportamentales de la vaca y su cría en las primeras 48 horas postparto.

(a) Llegada de la vaca al corral desde el potrero. Madre con la mirada en dirección al movimiento del personal que manipula a la cría (b) La vaca observa a la cría y al personal humano que la manipula (c) Retirado el personal la vaca inicia la inspección del área con un movimiento circular, donde la cría es el punto central (d) Se dirige hacia la cría (e) Hace contacto táctil mediante hocico e inicia a lamer a la cría en diferentes partes del cuerpo, especialmente en el lomo. Se encuentran en posición bipolar. (f) Inicia el amamantamiento. (g) Se separa de la cría posterior al mamado ininterrumpido ($\pm 10 - 15$ min). (h) La vaca hace recorridos alrededor y se mantiene atenta a ruidos y movimientos.

Ninguna vaca o cría presentó rechazo o falta de empatía en la relación inicial de establecimiento del vínculo materno filial.

- Durante el ordeño (COND)

Una vez que inició el ordeño diario y de acuerdo a los muestreos establecidos, se recabaron 3398 registros de comportamiento animal de 28 hembras vacunas durante cada ordeño y período. En el Cuadro 2, se muestran los resultados de las actividades registradas y que manifestaron diferencias estadísticas entre los tratamientos. Las actividades de la vaca definidas como: mira al ordeñador, mira a la cría, mira alrededor, movimiento de los ojos,

orejas erectas y cabeza erguida presentaron igual frecuencia estadística entre los tratamientos ($p>0,05$).

Cuadro 2. Frecuencia (%) de actividades realizadas por las vacas durante el ordeño y de acuerdo a los tratamientos de manejo gentil humano - animal durante el parto de las novillas

Actividades	Frecuencia (%)		
	SM	PSO	CE
Brinca	80,4 b	19,6 a	0,0 a
Bufa	55,1 b	44,9 b	0,0 a
Defeca	64,8 b	35,2 b	0,0 a
Micción	27,7 c	19,9 b	52,4 a
Dorso arqueado	41,0 b	45,9 b	13,1 a
Embiste	100,0 b	0,0 a	0,0 a
Hociquea	49,4 a	0,0 b	50,6 a
Huye	47,6 b	23,2 a	29,2 a
Lame	36,8 ab	18,0 b	45,2 a
Patea	100,0 b	0,0 a	0,0 a
Se tumba	33,8 b	66,2 c	0,0 a
Vocaliza	36,6 b	44,7 b	18,7 a

SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal. Letras distintas dentro de la misma fila corresponden a diferencias estadísticas ($p<0,05$).

De la misma forma, se presentan las actividades realizadas por la cría hacia la madre en el Cuadro 3. Estas actividades contemplan aquellas realizadas durante el tiempo de ordeño (TO), posterior al apoyo de la cría. En el Cuadro 4, se encuentran las correlaciones significativas para las actividades realizadas por la vaca, realizadas por las crías y aquellas que vinculan a ambas (madre-cría).

Cuadro 3. Frecuencia (%) de actividades realizadas por la cría inmovilizada a un lado de su madre y durante el ordeño según los tratamientos de manejo gentil humano - animal durante el parto aplicado a las novillas.

Actividades	Frecuencia (%)		
	SM	PSO	CE
Movimientos activos	0,0 b	15,0 b	85,0 a
Mueve cola	0,0 c	38,9 b	61,1 a
Quieta	0,0 a	100,0 b	0,0 a
Reflejo de succión	12,2 a	65,4 b	22,4 a
Salta	0,0 b	20,3 b	79,7 a
Vocaliza	19,4 a	56,8 b	23,8 a

SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal. Letras distintas dentro de la misma fila corresponden a diferencias estadísticas ($p < 0,05$).

Cuadro 4. Correlación de actividades realizadas por la madre, la cría y en interacción durante el ordeño (posterior a la eyección láctea)

	Variable	Correlación	p
<i>En la vaca</i>	Brinca – Dorso arqueado	0,31	<0,01
	Brinca – Se tumba	0,41	<0,01
	Embiste – Bufo	0,74	<0,01
	Lame – Busca la cría	0,43	<0,01
	Patea – Dorso arqueado	0,26	<0,01
	Se Tumba – Patea	0,22	<0,01
	Ver a la cría – Mirar al ordeñador	0,43	<0,01
	Ver a la cría – Mirar alrededor	0,46	<0,01
	Vocalización – Busca a la cría	0,43	<0,01
	Vocalización - Embiste	0,43	<0,01
	Vocalización– Dorso arqueado	0,22	<0,01
	Vocalización – Bufar	0,59	<0,01
	Vocalización – Huye	0,30	<0,01
<i>En la cría</i>	Movimientos activos - Salta	0,34	<0,01
	Salta – Mueve la cola	0,35	<0,01
<i>Entre madre y cría</i>	Movimiento de los ojos madre - Vocalizaciones cría	0,20	<0,02
	Se Tumba – Quieta	0,34	<0,01
	Vocalización – saltos de la cría	0,29	<0,01

3. Eyección láctea

a. Tiempos: estimulación (TE), ordeño (TO) y muerto (TM)

Verificada la normalidad e independencia de las variables de los tiempos evaluados, expresados en minutos y segundos, se aprecia que el tiempo para la eyección estuvo influenciado ($p < 0,01$) por el tratamiento parto de la novilla, independiente del momento de la lactancia considerado. Es así que los promedios por tratamiento se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Tiempo promedio (MMC \pm EE) de actividades durante la labor del ordeño, matutino y vespertino, y según los tratamientos a que fueron sometidas las vacas primíparas en su parto.

Variable (min:s)	Tratamiento		
	SM	PSO	CE
TE matutino	00:55 \pm 0:13	00:54 \pm 0:13	00:52 \pm 0:11
TM1 matutino	00:33 \pm 0:14	00:31 \pm 0:08	00:35 \pm 0:13
TO matutino	03:37 \pm 0:42 b	04:31 \pm 1:09 a	04:54 \pm 1:39 a
TE vespertino	00:59 \pm 0:14	00:53 \pm 0:18	00:54 \pm 0:13
TM1 vespertino	00:36 \pm 0:23	00:33 \pm 0:09	00:33 \pm 0:08
TO vespertino	03:10 \pm 0:46 c	03:55 \pm 0:51 b	04:31 \pm 1:31 a

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar. TE= tiempo de estimulación para iniciar la eyección láctea (apoyo); TM = tiempo empleado en retirar y sujetar a la cría al lado de la madre. TO = tiempo de ordeño efectivo. SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal. Letras diferentes en la misma fila corresponden a diferencias estadísticas ($p < 0,01$).

En el caso de TO, se encontró diferencias debidas al tratamiento ($p < 0,01$), así, el tiempo total de ordeño para CE fue superior tanto en la mañana como en la tarde. Los TE resultaron iguales en ambos ordeños al igual que el tiempo empleado por el ordeñador en sujetar firmemente a la cría una vez retirada de la corta succión estimuladora de la eyección láctea (apoyo).

b. Fracciones de leche

Se presentó efecto de tratamiento y los días postparto pero no de la interacción, es decir, tanto el condicionamiento gentil preparto de la novilla gestante como la propia curva de lactancia produjeron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) en los valores de las variables de leche evaluadas.

El Cuadro 6 muestra el efecto de tratamiento para cada una de las variables consideradas. La covariable corresponde al valor inicial de la variable correspondiente la cual resultó altamente significativa ($p < 0,01$) en todos los casos que se indican, y por tanto fue introducida en el modelo para la corrección de los valores respectivos.

La Figura 8 muestra las variaciones para LT a lo largo de la lactancia y según los tratamientos evaluados y periodos considerados. Los cambios eran esperables debido a las características fisiológicas propias de la curva de lactancia, más aún cuando a 90 días se espera alcanzar el pico de producción. Hasta 90 d postparto todas las curvas tendieron al ascenso

Cuadro 6. Valores promedio (MMC \pm EE) para las fracciones de leche evaluadas hasta los 90 días de lactancia de acuerdo a los tratamientos implementados durante el parto de hembras vacunas F1.

Fracción de leche	Covariable	Tratamiento		
		SM	PSO	CE
LVA (Kg/d)	3,65	3,47 \pm 0,10 b	4,07 \pm 0,12 a	4,23 \pm 0,12 a
LCBA (Kg/d)		1,11 \pm 0,12 a	0,74 \pm 0,15 b	0,92 \pm 0,16 a
LVP (Kg/d)	2,87	3,25 \pm 0,08 c	3,43 \pm 0,09 b	3,81 \pm 0,10 a
LCBP (Kg/d)		0,68 \pm 0,08	0,49 \pm 0,1	0,75 \pm 0,1
LVT (Kg/d)	6,77	6,9 \pm 0,17 b	7,35 \pm 0,19 b	7,95 \pm 0,21 a
LCB (Kg/d)		1,79 \pm 0,15 b	1,23 \pm 0,18 a	1,68 \pm 0,19 a
LT (Kg/d)	7,96	8,68 \pm 0,23 b	8,68 \pm 0,27 b	9,52 \pm 0,29 a
LCB/LT (%)		20,81 \pm 1,34 b	14,15 \pm 1,66 a	16,43 \pm 1,75 a
LAC90 (Kg)		740,19 \pm 43,92 b	720,6 \pm 46,59 b	913,90 \pm 39,73 a

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar. SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal. Letras diferentes en la misma fila corresponden a diferencias estadísticas ($p < 0,05$). LVA = leche vendible matutina; LCBA = leche consumida por la cría en la mañana; LVP = leche vendible vespertina; LCBP = leche consumida por la cría en la tarde; LVT= leche vendible diaria; LCB = leche consumida por la cría diaria; LT = leche total diaria; LCB/LT = eficiencia de ordeño; LAC90 = leche total acumulada a 90 días de lactación

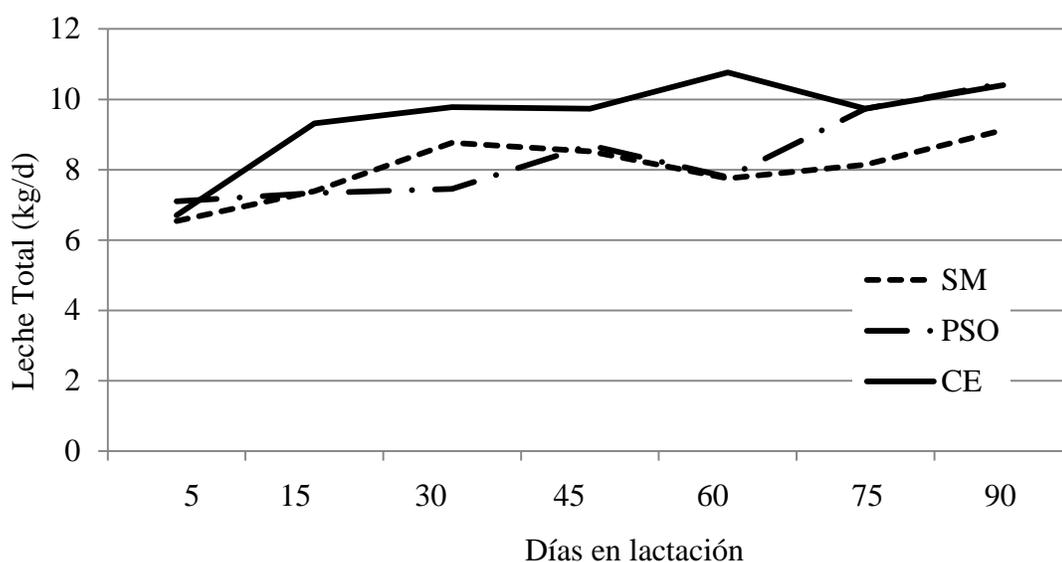


Figura 8. Producción promedio de leche total (Kg/día) (fracciones de leche vendible + leche consumida por la cría en cada ordeño) hasta 90 días de lactación y según los tratamientos preparto de las vacas.

SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal.

Los valores de la composición físico química en las distintas fracciones de leche evaluadas en cada ordeño (leche vendible y leche consumida por la cría) de mayor interés para este estudio, se observan expresadas como media de mínimos cuadrados (MMC) y su error estándar (EE) en el Cuadro 7.

No se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) en el contenido de los componentes de la leche, descritos en el Cuadro 7, que pudiesen estar asociados a la aplicación de los tratamientos preparto (SM, PSO, CE).

Cuadro 7. Valores relacionados a la composición de la leche (%) (MMC \pm EE) para las fracciones muestreadas y según los tratamientos aplicados a las hembras F1 de primera lactancia.

Componente	Ordeño	Tratamientos					
		SM		PSO		CE	
		LVT	LCB	LVT	LCB	LVT	LCB
Grasa (%)	am	3,94 \pm 0,08	7,57 \pm 0,22	3,95 \pm 0,09	7,85 \pm 0,25	4,05 \pm 0,09	7,35 \pm 0,25
	pm	3,83 \pm 0,09	6,84 \pm 0,19	3,95 \pm 0,10	7,32 \pm 0,21	3,97 \pm 0,11	6,83 \pm 0,22
Proteína (%)	am	3,10 \pm 0,02	3,08 \pm 0,02	3,13 \pm 0,02	3,11 \pm 0,02	3,08 \pm 0,02	3,08 \pm 0,02
	pm	3,14 \pm 0,03	3,14 \pm 0,03	3,18 \pm 0,03	3,16 \pm 0,03	3,08 \pm 0,03	3,11 \pm 0,03
Total sólidos no grasos (%)	am	8,42 \pm 0,09	8,50 \pm 0,05	8,59 \pm 0,10	8,59 \pm 0,06	8,54 \pm 0,10	8,55 \pm 0,06
	pm	8,60 \pm 0,07	8,59 \pm 0,08	8,74 \pm 0,08	8,70 \pm 0,09	8,57 \pm 0,08	8,60 \pm 0,09
Lactosa (%)	am	4,66 \pm 0,03	4,65 \pm 0,03	4,71 \pm 0,03	4,71 \pm 0,04	4,63 \pm 0,04	4,66 \pm 0,04
	pm	4,71 \pm 0,04	4,68 \pm 0,07	4,77 \pm 0,04	4,75 \pm 0,08	4,67 \pm 0,04	4,74 \pm 0,08
Sales (%)	am	0,67 \pm 0,01	0,70 \pm 0,01	0,70 \pm 0,01	0,70 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01	0,70 \pm 0,01
	pm	0,68 \pm 0,01	0,70 \pm 0,01	0,70 \pm 0,01	0,70 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01

MMC = media de mínimos cuadrados EE = Error estándar; SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal. am = ordeño matutino; pm = ordeño vespertino; LVT= leche vendible; LCB = Leche consumida por la cría.

El contenido de grasa en LVT fue equivalente al 50% de LCB en todos los tratamientos y periodos de la lactancia considerados.

La fracción grasa LVA resultó diferente según los días de lactación ($p < 0,05$). Los valores de grasa en LVA y sus diferencias estadísticas se aprecian en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Contenido de grasa (%) en la leche vendible de la mañana (MMC \pm EE) según los días postparto evaluados.

Contenido de grasa (%) en LVA	Día de evaluación (d)					
	15	30	45	60	75	90
	3,2 \pm 0,1 c	3,7 \pm 0,1 c	4,0 \pm 0,1 c	4,1 \pm 0,1 bc	4,4 \pm 0,2 b	4,5 \pm 0,2 a

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar. Letras diferentes en la misma fila corresponden a diferencias a $p < 0,05$.

LVP, LCBA y LCBP presentaron algunas diferencias ($p < 0,05$) pero no fueron continuas por lo que se dificulta su interpretación biológica.

Los sólidos totales no grasos de LCBA y la lactosa de LCBA y LVP también presentaron efecto en algunos días de la evaluación predefinida para la lactación.

Al realizar la corrección de LT por grasa al 4% las diferencias absolutas entre tratamientos se acortan pero se mantienen las diferencias estadísticas ($p < 0,05$) (Figura 9).

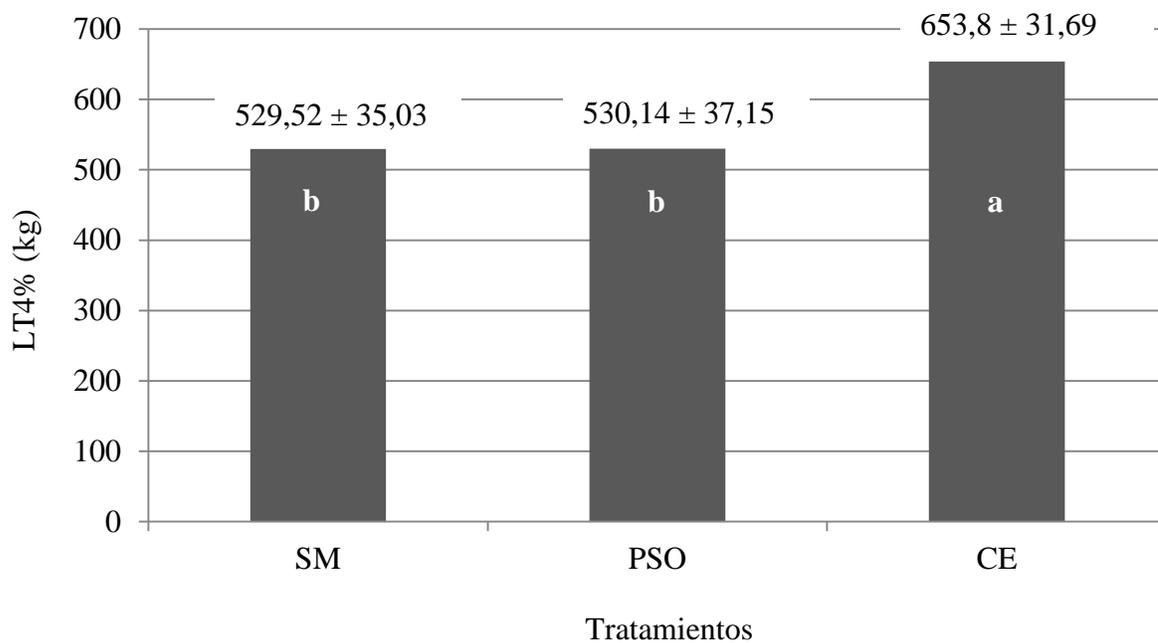


Figura 9. Producción total de leche corregida por grasa (4%) (LT4%) hasta 90 días de lactancia y según los tratamientos aplicados a las vacas en el parto.

SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal.

4. Reinicio de actividad ovárica

La cantidad promedio (MMC ± EE) de folículos según su clase y por tratamiento se observan en el Cuadro 9. Los tratamientos no causaron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) sobre las cantidades de folículos presentes según su clase (FC1, FC2 y FC3) o como cantidad total (NTF).

A los 90 d postparto no se detectaron estructuras ováricas correspondientes a CL.

Cuadro 9. Cantidad promedio (MMC + EE) de folículos presentes a los 90 d postparto según su clase y de acuerdo a los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Cantidad de folículos presentes (n)			
	FC1	FC2	FC3	NTF
SM	7,5 ± 0,5	1,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	9,4 ± 0,5
PSO	5,6 ± 0,7	1,2 ± 0,3	0,9 ± 0,1	7,7 ± 0,6
CE	7,4 ± 0,7	1,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	10,0 ± 0,6

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar. SM = Sin manejo; PSO= paso por manga de conducción; CE = cepillado corporal. FC1 = Folículo clase 1 (≤ 5 mm); FC2 = Folículo clase 2 (6 - 9 mm); FC3 = Folículo clase 3 (≥ 10 mm).

La cantidad de FC1 fue constante entre los diferentes periodos, no encontrándose así diferencias debidas a los días del postparto ($p > 0,05$) (Cuadro 10). Para el caso de los FC2 se presentaron fluctuaciones en las cantidades debido a la dinámica de los d postparto ($p < 0,05$), al igual que ocurrió para los FC3 ($p < 0,05$). El estadístico de la Prueba de Peto-Wilcoxon mostró diferencias sobre los FC2 (0,02) y en el caso de FC3 las tres pruebas aplicadas, arrojaron diferencias (Gehan-Wilcoxon = 0,03; Logrank Test = 0,04; Peto-Wilcoxon = 0,01) según los tratamientos.

Cuadro 10. Cantidad promedio de folículos (MMC \pm EE) de acuerdo a los días postparto (DPP).

DPP	Cantidad de Folículos (n)		
	FC1	FC2	FC3
21 \pm 4	6,7 \pm 0,8	1,1 \pm 0,3	0,0 \pm 0,1
34 \pm 4	7,7 \pm 0,7	0,9 \pm 0,3	0,2 \pm 0,1
47 \pm 4	6,9 \pm 0,7	1,7 \pm 0,3	0,4 \pm 0,1
60 \pm 4	6,9 \pm 0,7	2,0 \pm 0,3	0,5 \pm 0,1
73 \pm 4	8,6 \pm 0,8	1,9 \pm 0,3	0,7 \pm 0,1
86 \pm 4	4,8 \pm 1,3	2,0 \pm 0,5	0,9 \pm 0,2
99 \pm 4	6,2 \pm 1,3	1,0 \pm 0,5	1,6 \pm 0,2

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar; DPP= Días postparto; FC1 = Folículo clase 1 (\leq 5 mm); FC2 = Folículo clase 2 (6 - 9 mm); FC3 = Folículo clase 3 (\geq 10 mm).

La Figura 10 muestra la gráfica de la función de Hazard para la prueba de sobrevivencia de Kaplan-Meyer en FC2 y FC3. Los FC3 aparecen a partir del 47 d postparto en todos los tratamientos. A 90 d postparto es igualmente probable ($p < 0,05$) encontrar FC2 y FC3 en vacas de PSO y CE.

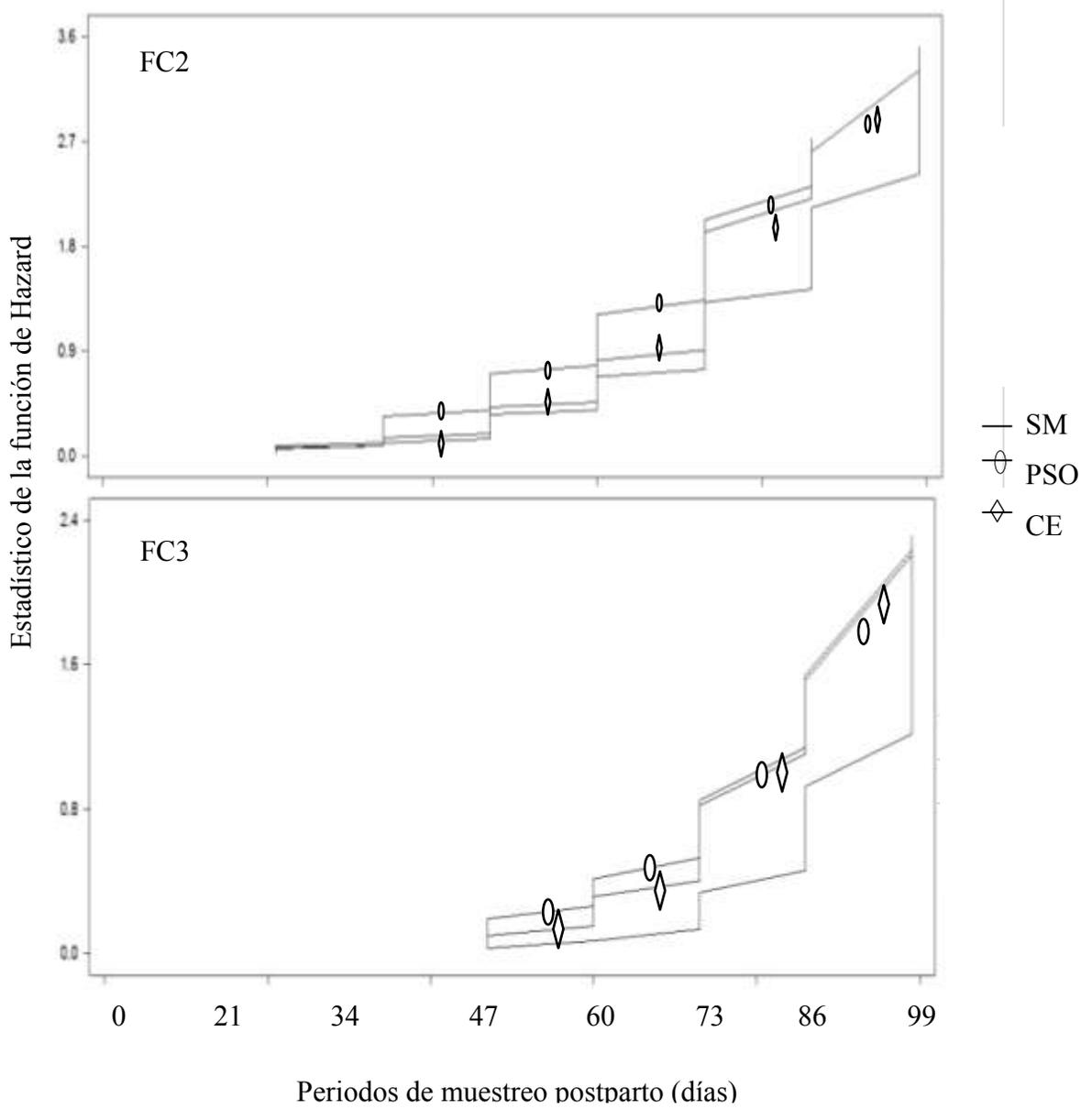


Figura 10. Gráfica de la función de Hazard para la Prueba de Supervivencia de Kaplan-Meier de los Folículos clase 2 (FC2=6 -9 mm) y clase 3 (FC3 \geq 10 mm) en función de los días postparto y según los tratamientos.

5. Hormonas

a. Cortisol

El periodo de evaluación mostró efecto ($p < 0,05$) sobre la concentración de Cortisol (pg/mL) de las vacas de primer parto según los tratamientos aplicados durante la fase final de la gestación, los resultados se aprecian en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Valores promedio (MMC \pm EE) de la concentración de Cortisol (pg/mL) para hembras vacunas sometidas a tratamiento gentil preparto según los periodos de muestreo pre y postparto

Día (d) de muestreo	Cortisol (pg/mL)			p
	SM	PSO	CE	
-43 \pm 13 ^{1/}	578,27 \pm 115,83	596,57 \pm 94,58	558,62 \pm 87,56	0,95
5 \pm 4 ^{2/}	570,62 \pm 86,40 ab	632,77 \pm 78,87 b	357,33 \pm 68,30 a	0,04
21 \pm 4	556,54 \pm 114,28	643,89 \pm 93,31	414,44 \pm 86,39	0,22
34 \pm 4	603,40 \pm 101,51	726,80 \pm 101,51	578,30 \pm 76,73	0,51
47 \pm 4	513,58 \pm 260,43	616,26 \pm 184,15	627,75 \pm 138,75	0,91

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar; ^{1/} preparto; ^{2/} postparto; Letras distintas en la misma fila corresponden a diferencias estadísticas al nivel p indicado; SM = tratamiento sin manejo preparto; PSO = tratamiento paso por manga de conducción; CE= tratamiento de manejo gentil con cepillado corporal preparto

La concentración promedio de CORT en las vacas primíparas en CE en el 5 d postparto fue 43% menor a aquella de SM o PSO ($p < 0,05$).

b. Oxitocina (OT)

El periodo de evaluación no mostró efecto ($p>0,05$) sobre el nivel basal de OT o el área bajo la curva, debido a ello en el Cuadro 12 se muestran los valores correspondientes a las media y error estándar según los tratamientos aplicados a las novillas en el parto. La hora de toma de la muestra, ordeño matutino o vespertino manifestó tendencia ($p=0,06$) para el nivel basal de OT, mas no ($p=0,89$) para área bajo la curva.

Cuadro 12. Concentración promedio (MMC \pm EE) de oxitocina (pg/mL) basal o como área bajo la curva según los tratamientos parto de las vacas.

Variable	Oxitocina (pg/mL)			p
	SM	PSO	CE	
BAm (pg/mL)	35,1 \pm 4,1 (n=10)	33,3 \pm 6,0 (n=7)	36,3 \pm 5,0 (n=15)	0,93
BPm (pg/mL)	33,4 \pm 4,2 (n=14)	20,0 \pm 7,0 (n=5)	26,9 \pm 4,9 (n=10)	0,25
AUCAm (pg/mL)	117,0 \pm 12,9 (n=9)	100,6 \pm 17,3 (n=5)	149,0 \pm 19,4 (n=4)	0,20
AUCPm (pg/mL)	75,1 \pm 34,2 (n=8)	101,8 \pm 40,5 (n=5)	179,8 \pm 32,0 (n=7)	0,09
AUC (pg/mL)	98,7 \pm 17,5 B (n =17)	101,2 \pm 22,1 AB (n = 10)	169,5 \pm 20,2 A (n = 12)	0,02

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar. BAm = Nivel basal de oxitocina en la mañana; AUCAm = Área bajo la curva de OT liberada durante el ordeño de la mañana; BPm = Nivel basal de oxitocina en la tarde; AUCPm = Área bajo la curva de OT liberada durante el ordeño de la tarde. Letras distintas en la misma fila corresponden a diferencias estadísticas ($p<0,05$)

Al graficar los valores promedio de la concentración de oxitocina (pg/mL) durante la actividad del ordeño (Figura 11), se aprecia la tendencia de las curvas por tratamiento.

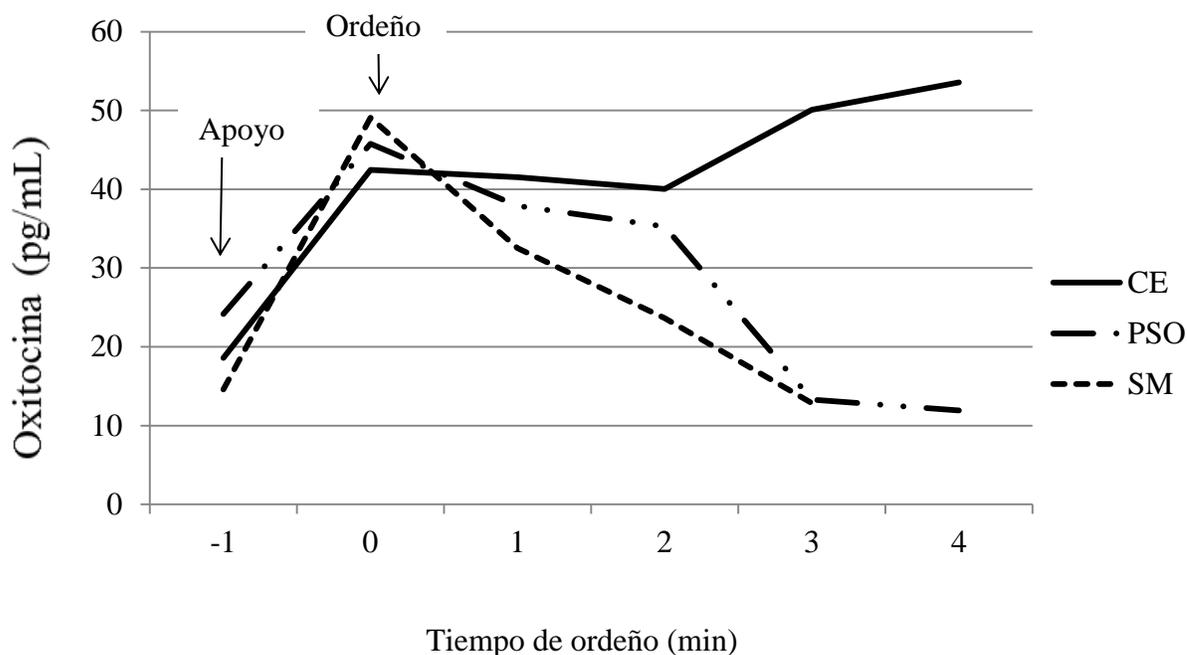


Figura 11. Concentración de oxitocina (pg/mL) en muestras de leche de vacas primíparas bajo ordeño manual con cría al pie y aplicación de tratamientos parto de manejo gentil humano – animal.

SM = Sin manejo parto, PSO = paso por manga de conducción, CE = cepillado corporal. -1 (min) = Inicio de la estimulación preordeño mediante succión de la cría (“apoyo”); 0 (min) = Inicio del ordeño manual; 1...n (min) = Tiempo final de ordeño manual

Las vacas del tratamiento SM culminaron el ordeño antes de los 4 min (Cuadro 5) con lo cual no pudieron recolectarse mayor cantidad de muestras de leche para cuantificar la concentración de oxitocina (pg/mL), asimismo, en aquellas vacas que continuaron en ordeño (CE) se presentó una

alta variabilidad (EE=17,7) para los valores de concentración. Es notorio, de acuerdo a la Figura 11, que las vacas CE continúan en ordeño y con valores de concentración de oxitocina elevada y sostenida hasta el final del ordeño ($04:54 \pm 1:39$ min; Cuadro 5).

c. Progesterona

En el Cuadro 13 se muestran las concentraciones promedio de progesterona sérica según los periodos evaluados.

Cuadro 13. Concentraciones de Progesterona (P₄) sérica (ng/mL) en vacas primíparas sometidas o no a manejo gentil preparto y ordeño manual con presencia de la cría al pie.

Día de muestreo	Concentración de P ₄ (ng/mL) (media \pm desviación estándar)
-43 ± 13 ^{1/}	$31,85 \pm 14,04$
21 ± 4	$0,64 \pm 0,28$
34 ± 4	$0,77 \pm 0,25$
47 ± 4	$0,83 \pm 0,57$
60 ± 4	$0,63 \pm 0,17$
73 ± 4	$0,56 \pm 0,1$
86 ± 4	$0,43 \pm 0,14$

^{1/} Muestreo preparto; novillas gestantes

No se presentaron diferencias estadísticas entre periodos ($p>0,05$), así mismo, todos los animales en todos los periodos, independientemente del tratamiento preparto aplicado mostraron inactividad ovárica desde el punto de vista cíclico. Aún a los 86 d postparto no se determinaron concentraciones plasmáticas por encima de 2,5 ng/mL indicativas de la presencia de un cuerpo lúteo funcional, según las especificaciones del fabricante del kit DSI® (0,5 – 6,5 nmol/L ó 0,2 – 2 ng/mL en fase folicular; 8 – 87 nmol/L ó 2,5 – 27 ng/mL en fase luteal); esto se corroboró con la inexistencia, en la evaluación ultrasonografía, de tales estructuras (Cuadro 13). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 8,8% 7,1%, respectivamente.

VI. 2. EFECTO DE DOS DIFERENTES TIPOS DE MANEJO DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN LÁCTEA Y REINICIO DE ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MECANIZADO Y SIN CRIA AL PIE.

1. Control

La CC disminuyó progresivamente a lo largo de la experiencia y en todos los animales evaluados. El valor de CC de las novillas gestantes previo a la aplicación de los tratamientos (preparto), fue de $3,6 \pm 0,6$ (NIRD 1-5); se tomó como valor inicial y no manifestó diferencia entre animales de cada tratamientos ($p=0,48$). Al 45 d postparto se presentó el mínimo valor del grupo de animales ($CC = 2,9 \pm 0,3$) sin diferencias entre tratamientos ($p=0,23$), manteniéndose hasta finalizar el experimento a los 90 d postparto. La pérdida CC correspondió a un 19,4% de los tejidos de reserva presentes en el preparto y hasta el final del experimento. La proporción (%) de Hto en sangre presentó un valor promedio global de $33 \pm 3,6$ %.

2. Temperamento

a. Reactividad en el Brete (REAC). Fueron analizados 205 registros. La Prueba de Correlación de Rango de Spearman mostró la asociación ($R = -0,24$; $p < 0,01$) entre los tratamientos (SM=1, CE=2; donde 1= mínima vs. 2 = máxima interacción gentil humano/animal) y REAC (1 = calmo, 2 = atento, 3 = nervioso/ irritable/ agresivo). REAC y d también mostraron asociación ($R = -0,68$; $p < 0,01$). En ambos casos, las correlaciones resultaron negativas lo cual indica que a mayor interacción gentil humano – animal y mayor transcurrir del tiempo (d postparto) se presentaron menores valores de REAC. La práctica del cepillado corporal preparto de la novilla gestante causó efecto sobre la REAC, ($p < 0,01$) de la vaca F1 primípara en lactación (Figura 12).

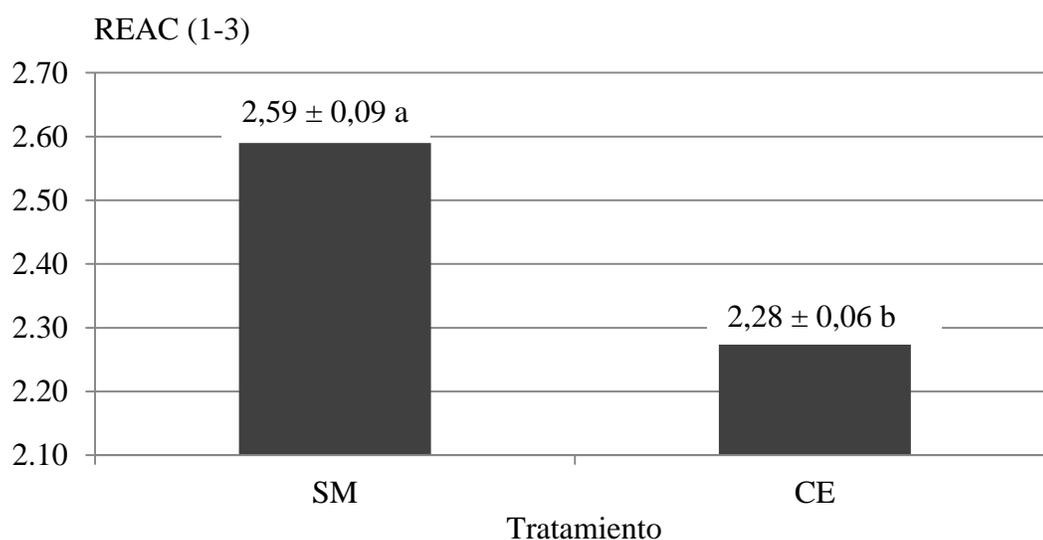


Figura 12. Promedio general \pm SE de los valores de Reactividad en el Brete (REAC) en hembras F1 según el tratamiento aplicado en el preparto.

SM = Sin manejo; CE = cepillado de corporal. Distintas letras corresponden a diferencias estadísticas entre tratamientos dentro de periodo ($p < 0,01$).

La Figura 13 muestra la frecuencia de los valores en la escala de REAC según cada tratamiento, se observa que según el tratamiento preparto aplicado se presentaron distintas proporciones en los índices encontrados.

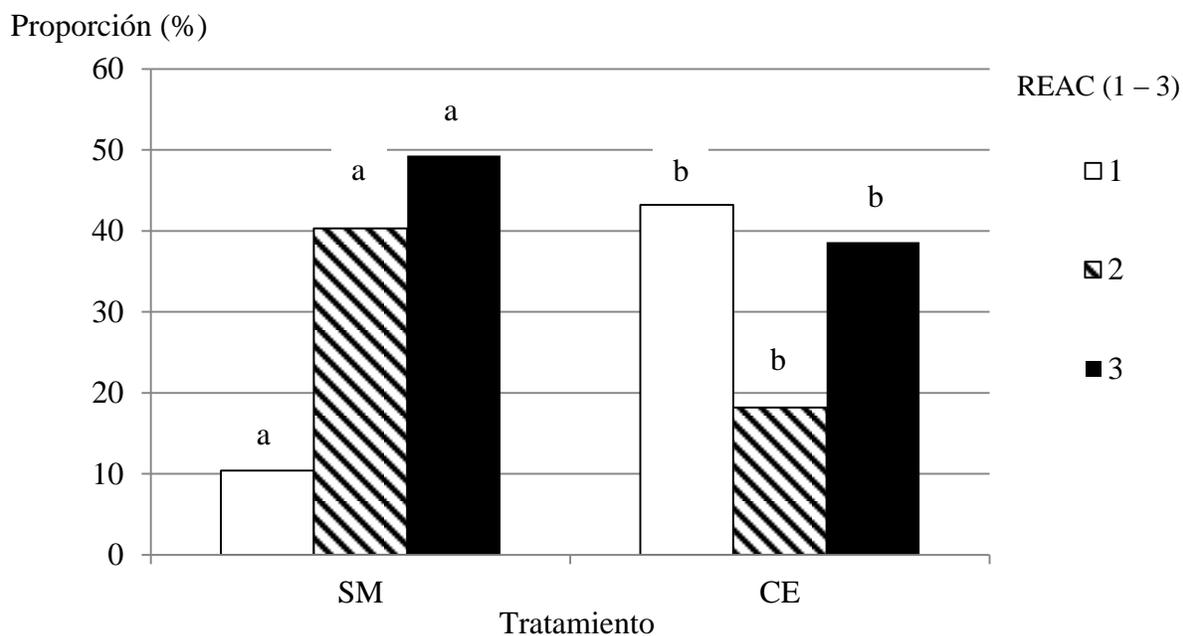


Figura 13. Frecuencia de valores de la escala de medición de la prueba de Reactividad en el Brete (REAC) según el tratamiento considerado.

SM = Sin manejo; CE = cepillado corporal. REAC 1 = calmo, 2 = atento, 3 = nervioso/irritable/agresivo.

En el Cuadro 14 se detallan los cambios en el tiempo, tal como media de mínimos cuadrados (MMC) y error estándar (EE) de la media para la Reactividad en Brete (REAC) aplicada en hembras vacunas según los tratamientos y DPP.

Al aplicar el análisis estadístico de la Prueba de Supervivencia para REAC (0 = calmo; 1 = nervioso) según los tratamientos preparto aplicados, puede observarse gráficamente (Figura 14) que siendo igual la supervivencia al tiempo 0 (preparto = 49 ± 23 d; $p > 0,05$), a partir de los 5 d postparto el tratamiento CE expresa una caída superior ($p < 0,01$) (Gehan-Wilcoxon, Logrank y Peto-Wilcoxon) de la REAC en todos los períodos posteriores al parto (5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 d); es decir, se presentaron diferencias estadística ($p < 0,01$) de la REAC de SM contra CE.

Cuadro 14. Valores de la prueba de Reactividad (MMC \pm EE) en el Brete para hembras vacunas cruzadas según el periodo evaluado y tratamiento considerado

Día de muestreo (d)		Reactividad (1 – 3)	
		SM	CE
Preparto: -49 ± 23		$3,0 \pm 0,03$	$2,9 \pm 0,03$
Postparto	5 ± 4	$3,0 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$
	15 ± 4	$3,0 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$
	30 ± 4	$2,7 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$
	45 ± 4	$2,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$
	60 ± 4	$1,9 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
	75 ± 4	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
	90 ± 4	$1,3 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$

SM = sin manejo; CE = cepillado corporal

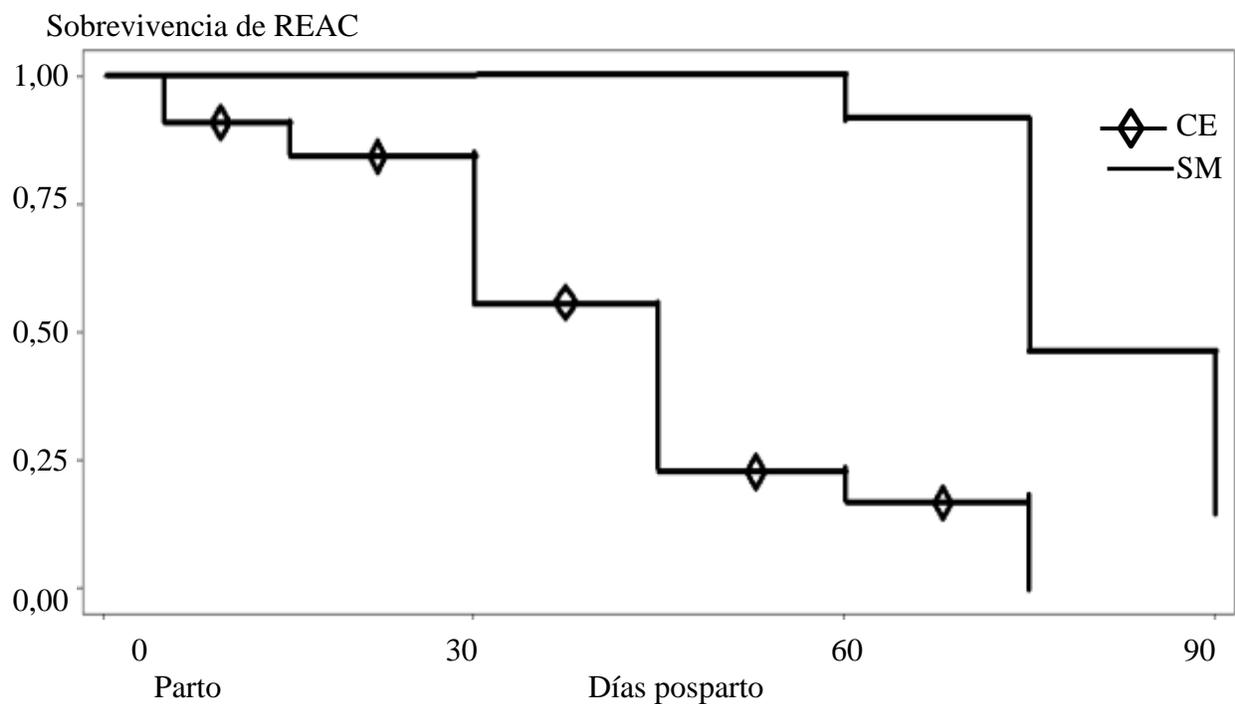


Figura 14. Curva de Supervivencia para la Prueba de Reactividad en hembras vacunas sometidas a tratamientos de manejo gentil humano – animal (SM = Sin manejo; CE = cepillado corporal).

b. Etograma

Ninguna vaca o cría presentó problemas de rechazo, falta de empatía o debilidad corporal. La expresión de la conducta epimelética y et-epimelética, durante las primeras 48 h se desarrolló tal como en el Experimento 1.

Debido a que para esta experiencia fue premisa el retiro de la cría posterior a las 48 horas de consumo de calostro, en adelante, sólo se presentan los resultados correspondientes al comportamiento de la vaca primípara en ordeño mecanizado. Según los muestreos establecidos,

se recabaron 1216 registros de comportamiento animal de las 38 hembras vacas en ordeño. En el Cuadro 15 se muestran los resultados de las actividades registradas y que manifestaron diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Cuadro 15. Frecuencia (%) de actividades realizadas por la cría inmovilizada a un lado de su madre y durante el ordeño según los tratamientos de manejo gentil parto aplicado a las novillas gestantes.

Actividades	Frecuencia (%)		p
	SM	CE	
Brinca	52,9	47,1	>0,05
Defeca	52,1	46,5	>0,05
Micción	47,4	52,6	>0,05
Patea	59,7	35,1	>0,05

SM = sin manejo; CE = cepillado corporal

3. Eyección láctea

a. Tiempos: estimulación (TE), ordeño (TO) y muerto (TM)

Verificada la normalidad e independencia de los tiempos evaluados, expresados en segundos, en el Cuadro 16, se aprecia que solo el tiempo de ordeño matutino estuvo influenciado por el tratamiento parto de la novilla. El resto de los tiempos evaluados no fue afectado por el tratamiento parto de la novilla ($p > 0,05$) o el momento de la lactancia ($p > 0,05$).

Cuadro 16. Tiempo promedio (MMC \pm EE) de actividades durante la labor del ordeño, matutino y vespertino, y según los tratamientos a que fueron sometidas las vacas primíparas en su parto.

Variable (min:s)	Tratamiento		p
	SM	CE	
TE matutino	01:21 \pm 0:09	01:02 \pm 0:08	0,37
TM matutino	00:35 \pm 0:05	00:34 \pm 0:06	0,41
TO matutino	05:22 \pm 0:10 b	06:06 \pm 0:19 a	0,04
TE vespertino	00:51 \pm 0:04 b	01:02 \pm 0:05 a	0,02
TM vespertino	00:31 \pm 0:04	00:38 \pm 0:05	0,28
TO vespertino	04:47 \pm 0:17	04:59 \pm 0:19	0,77

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar. TE= tiempo de estimulación para iniciar la eyección láctea; TM = tiempo empleado entre el inicio de la eyección láctea y la colocación de pezoneras; TO = tiempo de ordeño efectivo. SM = Sin manejo; CE = cepillado corporal. Letras diferentes en la misma fila corresponden a diferencias estadísticas al nivel de probabilidad especificado.

b. Fracciones de leche

Se presentó efecto de tratamiento y días postparto pero no de la interacción, es decir, tanto el condicionamiento gentil parto de la novilla gestante como la propia curva de lactancia produjeron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) en los valores de las variables de leche evaluadas. El Cuadro 17 muestra el efecto de tratamiento para cada una de las variables consideradas. La covariable corresponde al valor inicial de la variable correspondiente la cual resultó altamente

significativa ($p < 0,01$) en todos los casos que se indican, y por tanto fue introducida en el modelo para la corrección de los valores respectivos.

Cuadro 17. Valores promedio (MMC \pm EE) para las fracciones de leche evaluadas hasta los 90 días de lactancia de acuerdo a los tratamientos implementados durante el parto de hembras vacunas F1 bajo ordeño mecanizado sin cría al pié.

Fracción de leche	Tratamiento		p
	SM	CE	
LVA2 (L/d)	1,64 \pm 0,17 a	2,87 \pm 0,20 b	0,01
LVA5 (L/d)	6,18 \pm 0,51	5,64 \pm 0,37	0,40
LVA (L/d)	4,86 \pm 0,33 a	6,60 \pm 0,30 b	0,01
LVP2 (L/d)	1,58 \pm 0,17 b	2,73 \pm 0,23 a	0,01
LVP5 (L/d)	5,94 \pm 0,67	4,12 \pm 0,61	0,07
LVP (L/d)	4,47 \pm 0,31 b	5,24 \pm 0,29 a	0,05
LVT (L/d)	9,33 \pm 0,64 b	11,84 \pm 0,54 a	0,01

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar. SM = Sin manejo; CE = cepillado corporal.

Letras diferentes en la misma fila corresponden a diferencias estadísticas al valor de p indicado. LVA2 = leche vendible matutina a 2 min de iniciado el ordeño; LVA5 = leche vendible matutina a 5 min de iniciado el ordeño; LVA = leche vendible matutina; LVP2 = leche vendible vespertina a 2 min de iniciado el ordeño; LVP5 = leche vendible vespertina a 5 min de iniciado el ordeño; LVP = leche vendible vespertina; LVT= leche vendible diaria

La Figura 15 muestra la variación de la para LVT a lo largo de la lactancia y según los tratamientos evaluados y periodos considerados. No se detectaron diferencias en los valores (LVT) debidas al periodo de muestreo ($p>0,05$). Sin embargo, se observa una tendencia al incremento de la producción, con el transcurrir del tiempo.

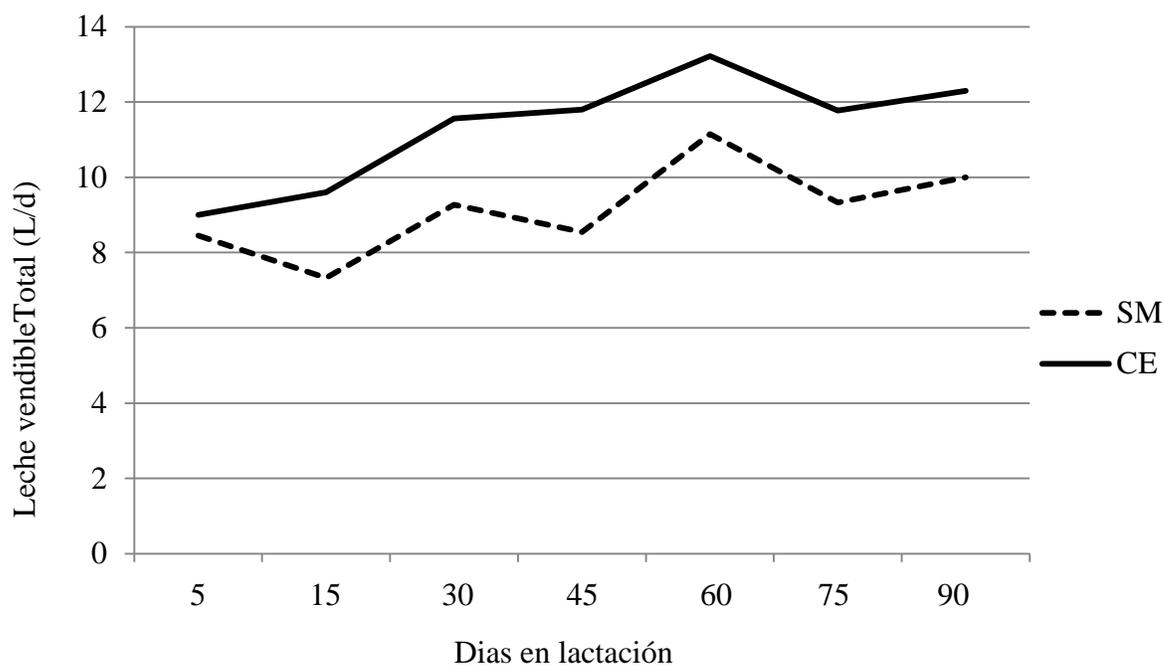


Figura 15. Producción promedio de leche vendible total (L/día) según los periodos de lactancia y los tratamientos preparto aplicados a las vacas (SM = Sin manejo; CE = cepillado corporal).

En relación al total de leche vendible acumulada al 90 d postparto se observó una tendencia ($p=0,11$) para CE de +178 L (Figura 16).

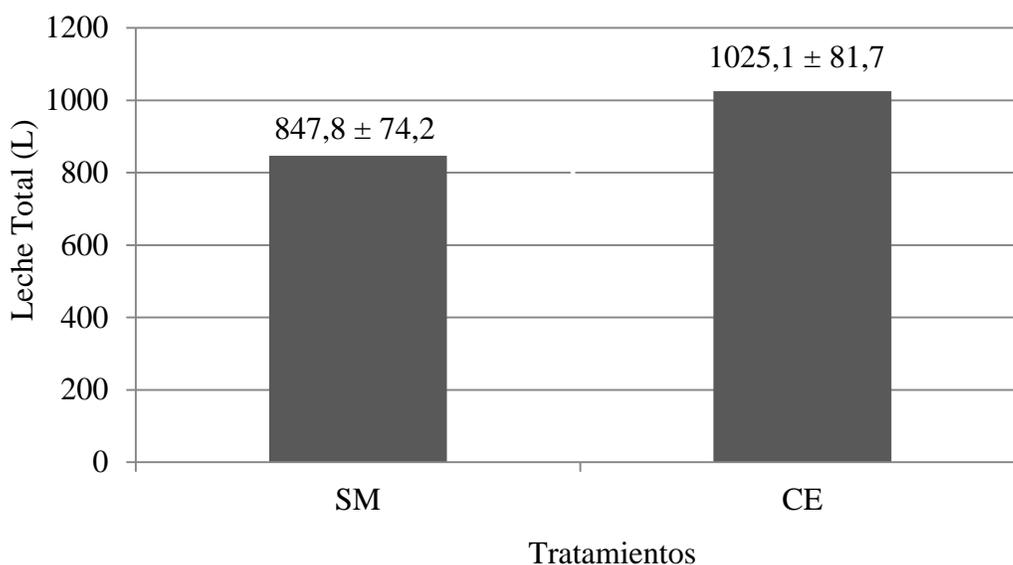


Figura 16. Producción total de leche hasta 90 días de lactancia y según los tratamientos parto aplicados a las vacas (SM = Sin manejo; CE = cepillado corporal).

Valores relacionados con la eficiencia del ordeño (EO) muestran que CE mejoró ($p < 0,01$) los problemas de eyección láctea en las vacas debido a las menores proporciones de leche residual.

Los valores de EO para el CE oscilaron entre 10,5 y 20%, mientras que para SM el valor mínimo observado fue de 23,4 y el máximo 76,5%. La media de mínimos cuadrados y su respectivo error estándar fue de $15\% \pm 8\%$ y $47\% \pm 5\%$ para CE y SM, respectivamente.

c. Composición de la leche (%)

Los valores de la composición físico química en las distintas fracciones de leche evaluadas en cada ordeño (leche cisternal - y leche alveolar) con mayor impacto para la producción, se observan expresadas como media de mínimos cuadrados (MMC) y su error estándar (EE) en el Cuadro 18, así mismo se acotan con las diferencias estadísticas donde corresponden.

Cuadro 18. Valores relacionados a la composición de la leche (%) (MMC ± EE) para las fracciones muestreadas y según los tratamientos aplicados a las hembras F1 de primera lactancia.

Componente	Ordeño	Tratamientos			
		SM		CE	
		Cisternal	Alveolar	Cisternal	Alveolar
Grasa (%)	am	1,08 ± 0,06 a	9,21 ± 0,34	1,46 ± 0,12 b	9,47 ± 0,42
	pm	1,38 ± 0,20 a	9,72 ± 0,03	2,98 ± 0,32 b	9,55 ± 0,55
Proteína (%)	am	3,11 ± 0,03	3,19 ± 0,02	3,19 ± 0,04	3,18 ± 0,04
	pm	3,16 ± 0,04	3,13 ± 0,02 a	3,27 ± 0,04	3,29 ± 0,04 b
Total sólidos no grasos (%)	am	8,56 ± 0,07	8,78 ± 0,06	8,71 ± 0,11	8,78 ± 0,09
	pm	8,61 ± 0,05	8,58 ± 0,09 a	8,96 ± 0,10	8,96 ± 0,07 b
Lactosa (%)	am	4,67 ± 0,04	4,81 ± 0,03	4,74 ± 0,06	4,84 ± 0,55
	pm	4,69 ± 0,04 a	4,71 ± 0,40 a	5,02 ± 0,05 b	4,94 ± 0,04 b
Sales (%)	am	0,67 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,66 ± 0,01	0,67 ± 0,01
	pm	0,66 ± 0,11	0,70 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,68 ± 0,01

MMC = Media de mínimos cuadrados EE = Error estándar; SM = Sin manejo; CE = cepillado corporal. am = ordeño matutino; pm = ordeño vespertino. Distintas letras dentro de fila corresponden a diferencias estadísticas ($p < 0,01$) entre tratamientos para la misma variable.

El contenido de grasa en fracción de leche cisternal fue aproximadamente equivalente al 10% de aquella leche alveolar. Las variaciones observadas en algunas variables durante el periodo en estudio fueron no significativas estadísticamente ($p < 0,05$) y propias del período inicial de la lactancia.

Una vez obtenidos los valores de grasa en la leche y realizar los cálculos para LVA4%, LVP4% y LVT4% destaca en el análisis estadístico que si bien en el caso de LVA4% el tratamiento y los períodos correspondientes a los d postparto causaron efecto ($p = 0,01$), para LVP4% y LVT4% sólo lo hizo el tratamiento ($p = 0,01$ y $p = 0,004$ respectivamente; d postparto $p = 0,30$ y $p = 0,07$, respectivamente). El efecto del CE sobre la LVA y TO matutino, ya discutido, se corresponde con LVA4%, con lo cual la ponderación debida a la grasa en la leche mantuvo el efecto de CE ($13,5 \pm 1$ contra $10,0 \pm 0,8$ L/vaca/d para CE y SM, respectivamente). Parece evidente que el mayor intervalo entre ordeños posibilita incremento en la síntesis láctea y del efecto evaluado.

4. Reinicio de actividad ovárica

La cantidad promedio ($MMC \pm EE$) de folículos según su clase y por tratamiento se observan en el Cuadro 19. Los tratamientos no causaron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) sobre las cantidades de folículos presentes según su clase (FC1, FC2 y FC3) o como cantidad total (NTF), al igual que no hubo efecto ($p > 0,05$) sobre el número total de CL detectados. Tampoco se detectaron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) debidas a los d postparto y/o su interacción con los tratamientos preparto aplicados.

Cuadro 19. Cantidad promedio (MMC + EE) de folículos presentes según su clase y de acuerdo a los tratamientos evaluados.

Variable	Tratamiento	
	SM	CE
Folículos Clase 1 (FC1)	5,17 ± 0,91	6,31 ± 0,69
Folículos Clase 2 (FC2)	2,96 ± 0,73	2,36 ± 0,55
Folículos Clase 3 (FC3)	0,42 ± 0,28	0,81 ± 0,21
Número Total de Folículos (NTF)	8,49 ± 0,88	9,42 ± 0,66
Número Total de Cuerpos Lúteos	0,54 ± 0,10	0,38 ± 0,10

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar. SM = Sin manejo; CE = cepillado de dorso, extremidades y cuello. FC1 = Folículo clase 1 (≤ 5 mm); FC2 = Folículo clase 2 (6 - 9 mm); FC3 = Folículo clase 3 (≥ 10 mm).

La cantidad de FC1 mostró fluctuaciones biológicas entre los diferentes periodos, siendo máximo su valor en el primer muestreo (21 d postparto), de forma progresiva se observaron incrementos los FC2, FC3 y CL. En ningún caso las diferencias fueron estadísticas debidas a los d postparto ($p > 0,05$) (Cuadro 20).

Cuadro 20. Cantidad promedio de folículos (MMC \pm EE) de acuerdo a los días postparto

DPP	Cantidad de Folículos (n)			Cantidad de cuerpos
	FC1	FC2	FC3	lúteos (n)
21 \pm 4	10,5 \pm 2,1	2,0 \pm 2,8	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
34 \pm 4	3,8 \pm 2,6	1,0 \pm 1,2	1,2 \pm 0,5	0,5 \pm 0,1
47 \pm 4	7,0 \pm 2,0	1,3 \pm 2,3	1,0 \pm 1,0	0,3 \pm 0,1
60 \pm 4	5,7 \pm 0,6	3,3 \pm 1,2	0,7 \pm 0,6	0,5 \pm 0,2
73 \pm 4	7,0 \pm 1,4	2,5 \pm 0,7	0,5 \pm 0,7	0,5 \pm 0,2
86 \pm 4	7,0 \pm 1,4	3,5 \pm 2,1	0,5 \pm 0,7	0,5 \pm 0,3
99 \pm 4	3,5 \pm 0,7	4,0 \pm 1,4	0,5 \pm 0,7	1,0 \pm 0,3

DPP = días postparto; ^{1/} Muestreo preparto en las vacas (gestantes); MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar; DPP= Días postparto; FC1 = Folículo clase 1 (\leq 5 mm); FC2 = Folículo clase 2 (6 - 9 mm); FC3 = Folículo clase 3 (\geq 10 mm).

Los indicadores de la prueba de sobrevivencia indicaron la igual probabilidad de encontrar FC3 y CL en ambos tratamientos, esto se comprobó a partir del valor p de los estadísticos Gehan-Wilcoxon (0,62; 0,87), Logrank Test (0,38; 0,54) y Peto-Wilcoxon (0,64; 0,62) respectivamente.

La Figura 17 muestran el incremento progresivo y uniforme de los FC3 y CL. Los FC3 aparecieron en el ultrasonido a partir del 34 d postparto, mientras que los CL a partir del 47 d postparto, según la frecuencia de muestreo aplicada.

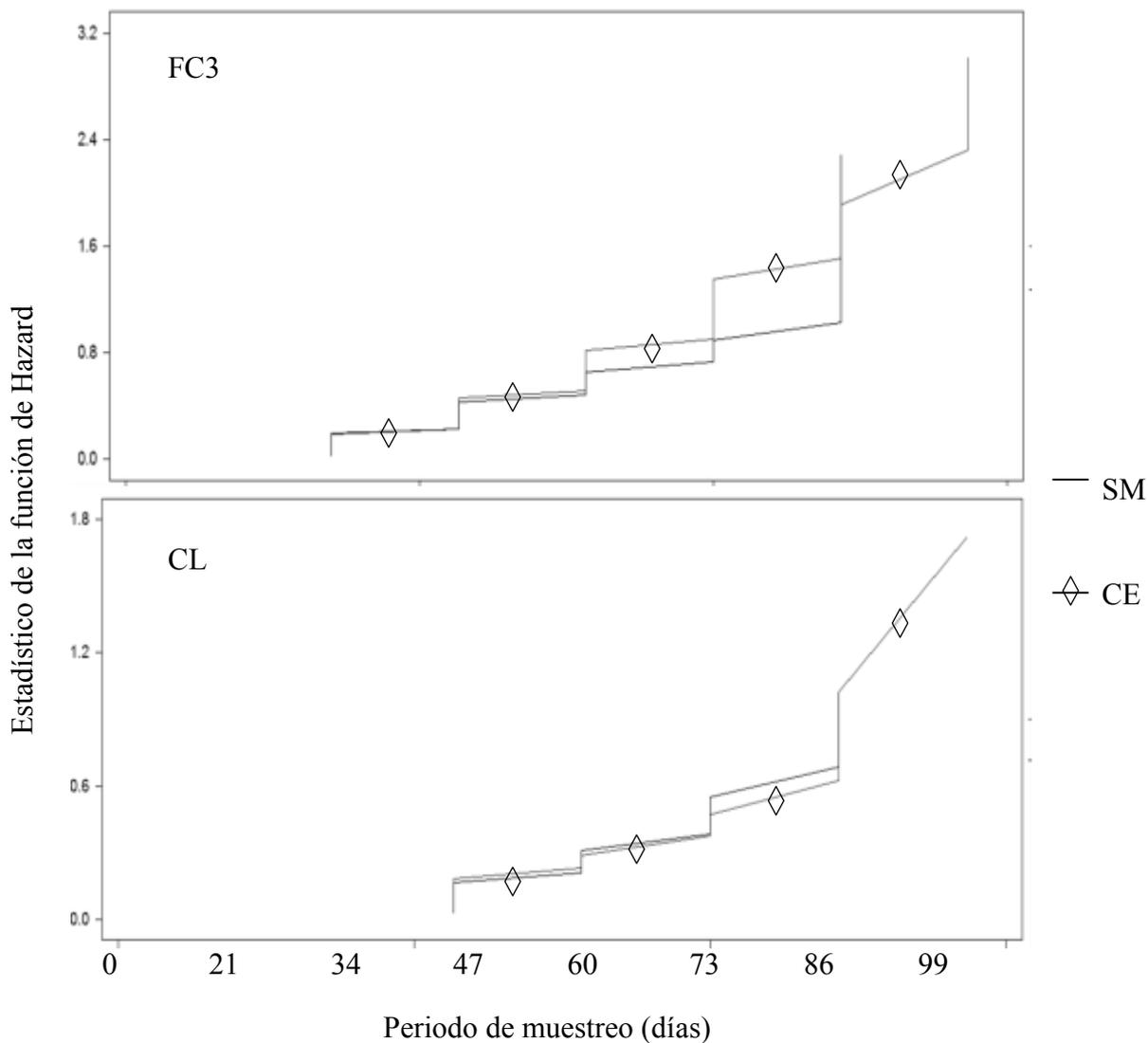


Figura 17. Gráfica de la función de Hazard para la Prueba de Supervivencia de Kaplan-Meier para los folículos clase 3 ($FC3 \geq 10$ mm) y cuerpos lúteos (CL) en función de los días postparto y según los tratamientos.

5. Hormonas

a. Cortisol

El periodo de evaluación mostró efecto ($p < 0,05$) sobre la concentración de Cortisol (pg/mL) de las vacas de primer parto según los tratamientos aplicados durante la fase final de

la gestación, igualmente el tratamiento y la interacción tratamiento y día de muestreo, por ello los resultados se aprecian en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Valores promedio (MMC \pm EE) de la concentración de Cortisol (pg/mL) para hembras vacunas sometidas a tratamiento gentil preparto según los periodos de muestreo pre y postparto.

Día (d) de muestreo	Cortisol (pg/mL)		p
	SM	CE	
-49 \pm 23 d ^{1/}	904,8 \pm 47,2	1011,9 \pm 61,5	0,80
5 \pm 4 ^{2/}	975,5 \pm 68,5	901,0 \pm 221,6	0,52
21 \pm 4	1046,1 \pm 70,1 a	785,2 \pm 78,3 b	0,01
34 \pm 4	802,2 \pm 64,0 a	594,4 \pm 90,5 b	0,01
47 \pm 4	862,4 \pm 78,3 a	649,5 \pm 83,8 b	0,01
60 \pm 4	645,8 \pm 66,8	592,9 \pm 90,5	0,60
73 \pm 4	613,9 \pm 78,4	458,8 \pm 110,8	0,57
86 \pm 4	585,3 \pm 110,8	545,6 \pm 127,9	0,73

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar; ^{1/} preparto; ^{2/} postparto; Letras distintas en la misma fila corresponden a diferencias estadísticas al nivel de p indicado; SM = tratamiento sin manejo preparto; CE= tratamiento de manejo gentil con cepillado corporal preparto

La concentración promedio de CORT en las vacas primíparas en CE en el 5 d postparto fue igual a ($p < 0,05$) aquella de SM. El promedio global para SM fue de $780,08 \pm 28,7$ y para CE $692,43 \pm 41,7$ ($p < 0,01$).

b. Oxitocina (OT)

El periodo de evaluación y la hora del ordeño no mostraron efecto ($p>0,05$) sobre el nivel basal de OT o el área bajo la curva.

En el Cuadro 22 se muestran los valores correspondientes a las media y error estándar, según los tratamientos aplicados a las novillas en el parto.

Cuadro 22. Concentración promedio (MMC \pm EE) de oxitocina (pg/mL) basal o como área bajo la curva según los tratamientos parto de las vacas.

Variable	Oxitocina (pg/mL)		p
	SM	CE	
BA (pg/mL)	23,1 \pm 3,6 (n=11)	29,1 \pm 3,6 (n=12)	0,25
AUC (pg/mL)	62,4 \pm 26,6 (n =17)	128,5 \pm 22,3 (n = 12)	0,07

MMC= Media de mínimos cuadrados; EE = Error estándar. BA = Nivel basal de oxitocina; AUC = Área bajo la curva de OT liberada durante el ordeño de la mañana; BA = Nivel basal de oxitocina; p = valor de probabilidad para diferencias estadísticas; SM = tratamiento sin manejo parto; CE= tratamiento de manejo gentil con cepillado corporal parto

Al graficar los valores promedio de la concentración de OT (pg/mL) durante la actividad del ordeño (Figura 18), se aprecia la tendencia de las curvas de liberación de OT según los tratamientos, así como los valores del AUC (pg/mL) correspondientes, fueron encontradas diferencias a ($p=0,07$). En general, las vacas del tratamiento SM culminaron el ordeño poco antes de los 5 min, siendo que las de CE lo hicieron pasado tal tiempo (Cuadro 16).

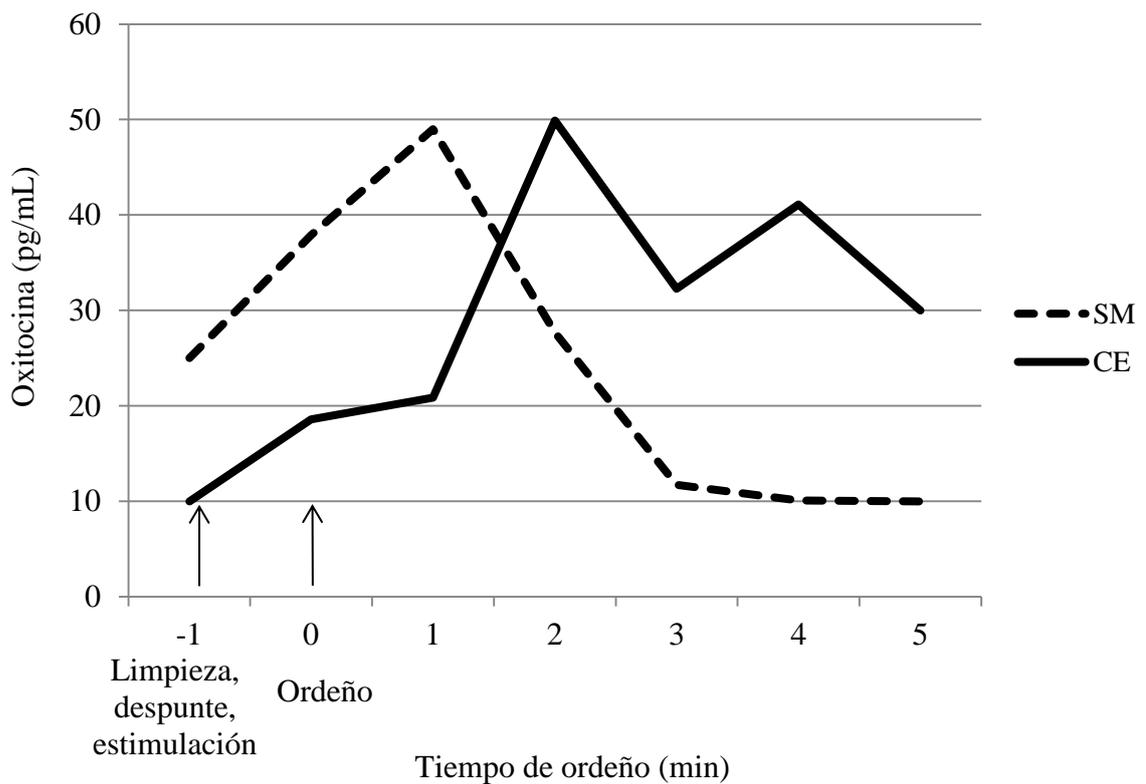


Figura 18. Concentración de oxitocina (pg/mL) en muestras de leche de vacas primíparas bajo ordeño mecanizado sin cría al pie y previa aplicación de tratamientos de manejo gentil preparto.

SM = Sin manejo parto; CE = manejo gentil a través de cepillado corporal parto; -1 (min) = Inicio de la estimulación preordeño mediante limpieza, masaje y descarte de los primeros chorros de leche; 0 (min) = Inicio del ordeño mecanizado; 1...n (min) = Tiempos transcurridos durante el ordeño hasta finalizar

c. Progesterona (P₄)

No se determinaron diferencias estadísticas debidas a los tratamientos aplicados (p>0,05). Sin embargo, el transcurrir de los d postparto considerados en las evaluaciones de la concentración sérica de P₄ (p<0,05). En el Cuadro 23, se observan los valores de

concentración promedio de acuerdo a los d postparto. En promedio, se observó reinicio de la ciclicidad ovárica de grupo animal a partir del 34 d postparto, esto según concentraciones de $P_4 \geq 2,5$ ng/mL. Si bien los CL detectados por ultrasonido (Figura 17) se hicieron evidentes a partir del 47 d postparto, concentraciones de P_4 , indicativas de inicio de descargas hormonales correspondientes con el reinicio de la ciclicidad, fueron detectadas precozmente, ya que para el 21 d postparto un 14,3% de los animales mostraron valores superiores a 2,5 ng/mL. A los 60 y 73 d postparto se observaron las mayores frecuencias de animales cíclicos (50 y 81,8% respectivamente).

Cuadro 23. Concentraciones de Progesterona (P_4) sérica (ng/mL) en vacas primíparas sometidas o no a manejo gentil preparto y ordeño mecanizado sin presencia de la cría

DPP	Concentración de P_4 (ng/mL) (media \pm desviación estándar)
-49 \pm 23 d ^{1/}	25,99 \pm 5,63
21 \pm 4	1,38 \pm 1,49
34 \pm 4	6,24 \pm 1,55
47 \pm 4	3,78 \pm 1,77
60 \pm 4	8,78 \pm 1,41
73 \pm 4	9,79 \pm 1,69
86 \pm 4	2,21 \pm 2,13

DPP = días postparto; ^{1/} Muestreo preparto en las novillas (gestantes)

VII. DISCUSIÓN

VII. 1. EFECTO DE TRES DIFERENTES TIPOS DE MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN LÁCTEA Y REINICIO DE ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MANUAL Y CON CRIA AL PIE

1. Control

La CC al parto es determinante sobre la expresión del potencial de producción de leche, temprana involución uterina y adecuado reinicio de actividad ovárica postparto (Martínez *et al.*, 1998b; Domínguez *et al.*, 2007; 2008). Un valor de CC al parto superior o igual a 2,5 parece ser el límite para no afectar detrimentalmente la reproducción (Ruiz *et al.*, 2010; Pinto-Santini *et al.*, 2009); mientras que en relación a la expresión del potencial para producción de leche el valor sugerido es igual o por encima de 3 (Gallo *et al.*, 1996). Ambos criterios parecen haber sido satisfechos por la CC inicial de los animales al entrar al ensayo. Durante el postparto ocurrió una disminución de los valores de CC, esperable debido a movilización de reservas para producción de leche (Broster y Broster, 1998; Bewley y Schutz, 2008). En la experiencia, las vacas de primer parto y cruzadas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) manifestaron ligeras pérdidas de CC en comparación con vacas adultas y altamente especializadas (Gallo *et al.*, 1996; Pinto-Santini *et al.*, 2009), similar a lo acá ocurrido, 20% es una pérdida ligera.

La variable de control relacionada con la proporción de células sanguíneas, Hto (%), presentó valores dentro de rango (27 – 46 %) para ganado vacuno (Camus, 1983; Calzada *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2006), por lo cual se presumió un adecuado estado de salud, adicional a los signos clínicos evidenciados. Las ligeras variaciones observadas son parte de la dinámica metabólica de alta demanda de nutrientes en la fase inicial de la lactación.

2. Temperamento

Se evidenció el impacto positivo del marcaje de conductas mediante el manejo gentil por humanos en novillas gestantes debido a la disminución progresiva de los valores de REAC, en los periodos evaluados, promedio general y frecuencia de valores según los tratamientos (Figura 2, 3; Cuadro 1). Los resultados de Bertenshaw *et al.* (2009), Hild *et al.*, (2011) en Europa y con ganado especializado en producción de leche y ovejas coinciden con estos hallazgos, siendo los primeros en la región tropical.

En sistemas de producción con alta interacción humano – animal, característicos de la producción de leche especializada, se han propuesto metodologías para la cuantificación de REAC que consideran una corta distancia entre dichos individuos (Rushen *et al.*, 1999; Waiblinger *et al.*, 2006; Bertenshaw *et al.*, 2008; Bertenshaw y Rowlinson, 2009). Sin embargo, en aquellos individuos de presunta y/o manifiesta indocilidad, intranquilidad y nerviosismo (definida por grupo racial) (Phocas *et al.*, 2006; Landaeta-Hernández *et al.*, 2005; Negrão y Marnet, 2006) debida a la distancia de fuga al humano y alta resistencia a ser atado (Grandin, 1997), tal como en esta experiencia, es necesario considerar otras opciones de menor estrés y riesgo para el animal y el trabajador (Waiblinger *et al.*, 2002). El método aplicado para la determinación de REAC, Brete de Contención (Grandin *et al.*, 1993; Halloway y Johnston, 2003), permitió alcanzar el objetivo en éstos animales de temperamento nervioso, agresivo o huidizo en las instalaciones (Fell *et al.*, 1999).

El hecho que REAC mantuviese un continuo descenso en todos los tratamientos (Cuadro 1), hasta los 90 d postparto, evidencia que todas las vacas primíparas se habituaron a la labor de ordeño, tanto a la rutina como al personal de trabajo (Hemsworth *et al.*, 1989; Bertenshaw *et al.*, 2008; Waiblinger *et al.*, 2002), con diferencias ($p < 0,05$) en la pendiente de la curva, según el condicionamiento preparto (Figura 4).

Las primeras 48 h de monitoreo de la relación madre cría transcurrieron sin evidencia de problemas para la vaca primípara o su cría (Paranhos da Costa *et al.*, 2006; 2008). El establecimiento natural del vínculo sin perturbación aparente, así como el estado de salud de la vaca y su cría permitieron el seguimiento y análisis de las siguientes variables.

TEM de CE estuvo definida con los valores más bajos (Cuadro 2) para conductas relacionadas al nerviosismo, irritabilidad y agresividad (Lahitte *et al.*, 2002; 2003), mientras que, para SM se exhibieron altos valores de frecuencia en dichas conductas ($p < 0,05$). Las vacas de PSO presentaron conductas intermedias entre ambos tratamientos. El hecho de las elevadas frecuencias en Huye, Embiste, Patea y Se Tumba implica violación del espacio vital por el personal de trabajo (Grandin, 1997; Hild *et al.*, 2011); expresión del instinto inflexible de resguardo por la presión ejercida del que se asume como depredador (Thayer y Lane, 2002; Jensen, 2002; 2006; Brosschot *et al.*, 2006; Martini, 2008).

Los cambios hormonales y metabólicos naturales y de manejo mediante la intervención humana (cercanía del trabajador, rutinas en ambientes desconocidos –sala de ordeño-, reorganización del grupo animal, retiro/presencia temporal con la cría y contacto cercano con seres humanos - sujeción, manipulación de la ubre- entre otros) que ocurren en el parto y los días posteriores en animales destinados a la producción, son desencadenantes de ajustes fisiológicos adaptativos mediados por el eje adenocorticotrópico (Tancin *et al.*, 2000b; Kraetzl *et al.*, 2001; Trevisi *et al.*, 2005; Negrão y Marnet, 2006); así, CORT es una variable de importancia desde el punto de vista de la manifestación de situaciones adaptativas consideradas como estrés (Rushen *et al.*, 1999; Negrão y Marnet, 2006; Saco *et al.*, 2008; Burdick *et al.*, 2011; Sánchez- Rodríguez *et al.*, 2013).

Los resultados (Cuadro 11) muestran que el grupo de novillas gestantes (animales en el -43 ± 13 d parto) presentó valores de CORT sin diferencia ($p = 0,95$) entre grupos al iniciar la

experiencia. En el 5 ± 4 d postparto, el CORT de las hembras de CE mostró un valor de concentración inferior ($p=0,04$), en un 40% (357 pg/mL) al de aquellas vacas primíparas de SM y PSO (media de medias = 601 pg/mL).

Esta evidencia permitió evidenciar la asociación entre el efecto benéfico de la práctica de marcaje de manejo gentil mediante el cepillado corporal preparto (CE) y la reducción de un indicador del nivel de estrés de la hembra primípara, inmediatamente después del parto y en inicio de lactancia. Esto ocurre debido a que las novillas manifiestan una adaptación cognitiva a la presencia humana cercana y a la práctica de manipulación por contacto táctil (Van Reenen *et al.*, 2002). La variación del CORT muestra ser una respuesta, a los estímulos exteroceptivos, del eje adenocorticotrópico (hipotálamo - hipófisis - adrenal) la cual desencadenó (Smith *et al.*, 1972) la una menor elevación del CORT circulante en aquellas hembras vacunas manipuladas de forma personalizada durante el preparto (CE) y sometidas, a partir de las 48 h postparto, al inicio de una práctica novedosa: ordeño de tipo manual (con alta interacción humano – animal) y contacto cría por lapsos cortos (Smith *et al.*, 1972; Hemsworth y Barnett, 2000; Drescher, 2000; Van Reenen *et al.*, 2002; Drescher *et al.*, 2006).

Sin embargo, todas las vacas fueron igualando, estadísticamente, los niveles de CORT sérico durante el transcurso de la lactación (Van Reenen *et al.*, 2002). Esto pudiera ser explicado, debido a que las adaptaciones al medio ambiente, por desafíos a nivel del eje hipófisis – adrenal, son flexibles y dinámicas en el tiempo; éstas adaptaciones pueden implicar la sensibilización y desensibilización, por ejemplo, debido a cambios reversibles en la densidad y sensibilidad de ACTH y los receptores de CORT, ello habría que ser precisado. La ausencia de diferencias estadísticas en el preparto era esperable debido a que todos los animales presentaron iguales manejos desde la crianza, el levante y a la primera preñez por inseminación artificial. Si bien, desde el punto de vista fisiológico el CORT aumenta durante

el periparto, debido a que éste es el detonante fisiológico para el inicio de la expulsión del feto (Brook y Marshall, 1999), el valor de concentración a los 5 ± 4 d postparto mostró diferencias significativas ($p < 0,04$) que coinciden exactamente con la hipótesis planteada y con recientes resultados de Sutherland y Huddart (2012). No se considera que ésta disminución en los valores de CORT en las vacas primíparas sometidas a CE pudo interferir negativamente con el CORT fisiológico necesario para la ocurrencia normal del parto debido a la ausencia de trastornos patológicos de algún tipo. Por lo tanto, el factor novedoso del momento inicial de la lactación, tal como resulta la alta interacción humano animal debida a la rutina de pastoreo (traslado dos veces por día a potreros) y ordeño, fue asumido sin estrés por aquellos animales con previo marcaje de contacto positivo (CE). Por otro lado, para aquellos animales de los tratamientos SM y PSO los niveles séricos se mantuvieron prácticamente invariables desde el parto y a todo lo largo del estudio. Es claro, que la reactividad del sistema pituitario-adrenal puede ser de aumento, sin cambios o de disminución según las situaciones que afronta el individuo (Smith *et al.*, 1972; Toates, 1997; Neumann *et al.*, 2005; Mormède *et al.*, 2007).

Animales no acostumbrados a la presencia humana cercana y rutinas de manejo, caso común en los sistemas de producción no intensivos con vacunos en los trópicos y que poseen mediana habilidad para la producción de leche por un componente *Bos indicus* importante (1/2 de herencia cebuína) para rusticidad y habilidad de amamantar y proteger a la cría, se manejan bajo el criterio del tratamiento SM, donde la novilla gestante permanece en potrero con animales no lactantes hasta llegado el inminente momento del parto u ocurrido el mismo (Drescher, 2000). Seguidamente, el hecho de ser sometidos a una rutina desconocida, muchas veces con un trato de forma no gentil, caracterizado por la sujeción con cuerdas resistentes (cabeza y extremidades traseras), gritos, movimientos bruscos y con caballos, golpes con objetos contundentes y encierro en corrales, desencadena y mantiene elevados niveles de

CORT circulante (Grandin, 1997; Hild *et al.*, 2011; Curley *et al.*, 2006). De allí la importancia fisiológica de estos hallazgos para Venezuela y otros sistemas tropicales manejados de forma similar, ya que un manejo calmo parece reducir, al menos temporalmente dicho estrés crónico.

Hemsworth *et al.* (1989) señala que a través de la lactación ocurre una disminución progresiva de los niveles de CORT circulantes debido a la adaptación de los animales a las rutinarias y presencia humana, los resultados de este experimento mostraron que tales niveles se mantuvieron estables en las hembras de SM y PSO hasta el final de la experiencia y en el caso de CE los valores de CORT se incrementaron progresivamente después del 5 d postparto; para el 21 d postparto se observó apenas una tendencia ($p=0,22$) hacia la diferencia y a partir del 34 d postparto la concentración de CORT quedó igualada entre tratamientos ($p>0,05$).

Dos condiciones de manejo pueden haber influido en la respuesta fisiológica característica de situaciones de estrés agudo o crónico donde CORT es indicador (Salposky *et al.*, 2000). En primera instancia, el efecto de la presencia de la cría con la madre durante dos ordeños diarios después de lo cual es separada, produce un efecto estrés – anti-estrés, especialmente en estos animales cruzados con elevada aprehensión a la cría debida el componente *Bos indicus* (Hoffman *et al.*, 1996; Stevenson *et al.*, 1997; Yavas y Walton, 2000; Galina *et al.*, 2001; Kraetzl *et al.*, 2001; Drescher, 2003; Negrão y Marnet, 2006). En la experiencia, el uso de la cría para la estimulación preordeño, su presencia inmovilizada al lado de la vaca durante el ordeño y el amamantamiento postordeño dos veces por día, pudo mantener elevados los niveles sanguíneos de CORT (Kraetzl *et al.*, 2001). Por otro lado, el animal de primer parto - lactancia debe establecer un conjunto de relaciones de jerarquía en un rebaño de animales adultos, que hasta ese momento eran desconocidas; para ello, los primeros días se presentan

interacciones agonísticas, especialmente en momentos de competencia por recursos (acceso potrero, acceso a agua, encuentro con la cría, espacio vital en corral de ordeño, entre otros), hasta que se logra la estabilidad del rebaño (Kondo y Hurnick, 1990). La vaca de primer parto tiende a ocupar posiciones de menor rango social, por lo cual se ubica en la base de la pirámide de jerarquía con los individuos denominados “Subordinados” esto debido a que, edad, tamaño, peso y nivel de producción, entre otros, influyen (Reinhardt y Reinhardt, 1975; Landaeta-Hernández *et al.*, 2005; 2013; Val-Laillet *et al.*, 2009). La tensión social genera elevación en los niveles de CORT (Grandin, 1997; Trevisi *et al.*, 2005; Neumann *et al.*, 2005; Curley *et al.*, 2006). Por otro lado, el incremento de las deyecciones (Defeca) ha sido reportado cuando el animal ingresa o permanece en un lugar desconocido (Sirvén, 2015), en la cual no solo CORT puede ser parte de la respuesta sino posiblemente la activación del eje ACTH con consecuente liberación de catecolaminas, epinefrina y norepinefrina (Fukudo y Suzuki, 1987). Las manifestaciones de Dorso Arqueado y Vocalizaciones (frecuencia e intensidad) han sido reportadas como signos asociados al dolor y ansiedad respectivamente, así, según, el Cuadro 3, las vacas de SM expresaron limitaciones en su bienestar (Grandin, 1997; Broom y Fraser, 2007). En el caso de la actividad denominada Micción, ésta ha sido relacionada al posible efecto contráctil de la OT liberada durante la eyección láctea para el ordeño y amamantamiento; cuyos receptores en el tracto genital femenino son estimulados de forma simultánea (Kraetzl *et al.*, 2001). El tratamiento CE presentó la mayor liberación (AUC) y nivel circulante de OT en el tiempo de ordeño (Cuadro 12; Figura 8), con lo cual la conexión fisiológica pudiera ser explicada (Gimpl y Fahrenholz, 2001).

Las actividades de Hociquea y Lame a la cría (Cuadro 3) representan particular interés debido a que se han asociado a estereotipias en animales bajo estrés (p.e. acicalamiento en roedores) (García-Cairasco, 1989; Saco *et al.*, 2008) y/o sociabilidad (Fox, 1966; Nowak *et*

al., 2000; Gimpl y Fahrenholz, 2001; Paranhos da Costa *et al.*, 2006; 2008), lo cual explicaría elevadas frecuencia en SM y CE, respectivamente. Tal como señala Lahitte *et al.* (2002; 2003), el etograma considera acto, tiempo y contexto, por lo que el conjunto de acciones – reacciones definen a la conducta. Es así, como al observar los resultados del Cuadro 3, donde se encuentra la frecuencia de las actividades realizadas por las crías, se percibe la correspondencia para CE en cuanto a los movimientos activos, saltos y movimientos de la cola, mientras la cría permanece atada al lado de su madre; esto indica la mayor capacidad de interacción del tipo comportamiento normal (Jensen y Kyhn, 2000) asociada a la sociabilidad y docilidad, y debida al efecto de la estimulación humana gentil de la madre sobre la cría, ya demostrado que existe una asociación entre la elevada OT basal en ratones y humanos ejercida a nivel central (Hovatta y Barlow, 2008; Petrovic *et al.*, 2008; Palgi *et al.*, 2015). La igualdad en los niveles de OT basal entre tratamientos (Cuadro 12) pudiera ser indicador de ausencia de estrés prenatal (Kofman, 2002; Yang *et al.*, 2013). Sin embargo, los menores valores de CORT en el 5 y 21 d postparto, concomitantemente con un nivel similar de OT basal podrían actuar de manera diferencial y sinérgica sobre la percepción y modulación psicológica positiva ante la misma situación: contacto humano rutinario debido al ordeño. Esto ocurre debido a la acción combinada de CORT y OT en las regiones prefrontal y límbica del cerebro relacionadas a la percepción y emociones (Damasio, 2003; Dedovic *et al.*, 2009). Los mecanismos a través de los cuales el receptor de oxitocina es estimulado durante la gestación y la forma en cómo actúa en la posterior respuesta de amamantamiento/eyección láctea, son aún desconocidos (Bealer *et al.*, 2010).

En humanos y ratones, la OT puede ser liberada al torrente sanguíneo y fluido cerebroespinal mediante estímulos anti-ansiedad, tales como contacto táctil gentil (caricias) y la temperatura cálida (Braastad, 1998; Uvnäs-Moberg *et al.*, 2001). Es aquí donde el CE,

desde el inicio de la aplicación en el -43 ± 13 d preparto, pudo causar esas descargas de OT anti-ansiedad que a su vez fueron sensibilizando positivamente áreas del cerebro posiblemente controladoras de las emociones (Damasio, 2003; Aleman *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2008; Charil *et al.*, 2010). Ya en pequeños rumiantes, trabajos recientes, han demostrado el mayor desarrollo sináptico en animales sometidos a trato gentil de sus madres durante el preparto y comienzan a presentarse hallazgos de la mejora de la interacción madre - cría (Coulon *et al.*, 2011; 2013; Hild *et al.*, 2011). Por lo antes descrito, es que el presente trabajo hace un aporte y abre un área de investigación en vacunos cruzados en el trópico.

Las crías de las vacas de PSO se diferenciaron ($p < 0,05$) y con respuestas inesperadas en actividades tales como Quieta y Succión (definida en materiales y métodos como aplicación del reflejo sobre tejido no glandular de la madre: pe. piel); la primera actividad, puede corresponderse con el término “freezing”, de uso frecuente en comportamiento y evaluaciones de temperamento, y el cual está definido como aquel individuo paralizado debido a una respuesta de estrés agudo (Brandão *et al.*, 2008). Ambas actividades podrían ser consideradas estereotipias propias de animales bajo estrés (García-Cairasco, 1989). Estudios fisiológicos en las crías deberán precisar la naturaleza del signo observado.

Por último, las correlaciones significativas entre actividades de la vaca, de la cría y del binomio (Cuadro 4) puede contribuir a la comprensión del lenguaje de la unidad madre – cría sometida a manejo humano de ordeño. Si bien, se muestran todas aquellas asociaciones que fueron altamente significativas ($p < 0,01$), casi todas resultaron bajas, exceptuando las actividades de Embiste – Bufa ($C=0,74$). Explorar dentro de cada actividad, a través de escalas cualitativas pudiera permitir hallar relaciones precisas, así como la inclusión del humano en las evaluaciones del conjunto vaca – cría - ordeñador (Waiblinger *et al.*, 2002; Bertenshaw *et al.*, 2008; Bertenshaw y Rowlinson, 2009).

En conclusión, la hembra primípara F1 (*Bos taurus* x *Bos indicus*) condicionada con manejo gentil durante el parto presenta ventajas conductuales y fisiológicas durante la labor de ordeño, y este animal presenta un menor riesgo a sufrir y causar accidentes (caídas, golpes y ataques) (Fell *et al.*, 1999; Waiblinger *et al.* 2004; 2006). La ventaja adicional sobre la vivacidad y vitalidad de la cría (Petrovic *et al.*, 2008; Coulon *et al.*, 2011; 2013; Hild *et al.*, 2011; Palgi *et al.*, 2015) merece atención de estudio. Si bien, Narváez *et al.* (2006b) habían encontrado beneficios conductuales de la presencia de la cría durante el ordeño (menor frecuencia de pateo y tumbado de pezoneras en sistema de ordeño mecanizado), lo cual representa el típico manejo de los sistemas de producción de doble propósito en el trópico bajo, estos hallazgos demuestran posibilidades de impacto benéfico mediante prácticas adicionales que pudieran permitir una mayor eficiencia y menor riesgo para la mano de obra, aun bajo ordeño manual.

3. Eyección láctea

La información del Cuadro 5 muestra que el condicionamiento gentil parto no causó efectos sobre TE ($p < 0,05$) debido a los tratamientos, así como tampoco se observó ($p > 0,05$) en el intervalo de tiempo entre la dicha estimulación y la sujeción de la cría por el ordeñador (TM). Las diferencias encontradas ($p < 0,05$) se hallaron en el tiempo efectivo para la extracción de la leche (TO). Esto guarda relación con los resultados cuantitativos del impacto positivo del condicionamiento sobre la producción de leche, ya que el CE causó una mayor ($p < 0,05$) cantidad de leche vendible en la mañana (LVA), tarde (LVP) y sumatoria diaria (LV), así como también, en la leche total producida por la vaca durante cada día (LT) (resultante de la sumatoria de la fracción vendible –LV- y la leche que es estimada consume la cría mediante el amamantamiento restringido posterior a cada ordeño -LCB = LCBA + LCBP-) (Cuadro 6, Figura 7). Los beneficios de la aplicación de la práctica del CE

comprueban la hipótesis esperable y coincide con trabajos de Hemsworth *et al.* (2000; 2002), Bertenshaw y Rowlinson (2009) y Bertenshaw *et al.* (2008) en relación al potencial del condicionamiento favorable a través de manejo humano gentil de los vacunos en fases sensibles (Hemsworth *et al.*, 2000; 2002; Brosschot *et al.*, 2006; Martini, 2008; Campbel, 2010; Grandin, 2010) para elevar las respuestas productivas, en este caso, remover cantidades de leche significativas de la glándula mamaria.

Los hallazgos de TO y LV, en ordeño manual, demuestran que se presentó una mayor disponibilidad de leche a nivel de la cisterna de la glándula mamaria para las vacas de CE. Esta señal permitió al personal de ordeño continuar con la extracción de leche hasta el vaciado completo (TO mayor en CE vs. SM de la mañana y la tarde).

Solo es posible extraer cantidades de leche sintetizadas y almacenadas en los alvéolos de la glándula mamaria de la vaca mediante una descarga elevada y continua de la cantidad de OT circulante (Bruckmaier *et al.*, 1994; Samuelsson, 1996; Johansson, 2000; Tancin *et al.*, 2000a,b; Bruckmaier, 2005), sea en animales *Bos taurus* especializados (Bruckmaier *et al.*, 1994; Bruckmaier y Hilger, 2001; Negrão y Marnet, 2006) o en *Bos taurus* x *Bos indicus* (Negrão y Marnet, 2006). Así, la Figura 8 proporciona el nexos fisiológico directo a este hecho productivo, ya que las vacas CE presentaron mayores valores de AUC para OT (Cuadro 12), con un pico elevado y, especialmente, una persistencia más prolongada (Bruckmaier *et al.*, 1994; Bruckmaier y Hilger, 2001; Weis, 2004) el patrón de la curva individual por animal (valor basal, pico y persistencia) permite interpretar los ajustes fisiológicos propios del individuo a las condiciones intrínsecas y/o ambientales que lo afectan (Carter y Altemus, 1997; Uvnäs-Moberg *et al.*, 2001; Negrão y Marnet, 2006; Campbell, 2010; Churchland y Winkielman, 2012). La descarga inicial de OT en los tres tratamientos evaluados (SM, PSO, CE) es a su vez la explicación fisiológica de los resultados en los valores encontrados en TE,

ya que todas las vacas manifestaron una descarga inicial igual en tiempo y valor (pg/mL) debida a que la presencia y estimulación condicionada de la cría en todos los tratamientos es el estímulo natural más potente (Wakerley *et al*, 1994; Bar Peled *et al.*, 1995). La Figura 8 muestra que aún transcurridos 4 min después de iniciado el ordeño las cantidades de OT siguen siendo más elevadas en CE, aunque todos continúan con la cría al pie.

Es conocido, que la degradación de la OT, péptido de nueve aminoácidos, mediante las enzimas proteolíticas sanguíneas es muy rápida, por ello, si la práctica de CE fue capaz incrementar las posibilidades de descarga de OT de la neurohipófisis o disminuir la inhibición de la misma, por los inferiores valores iniciales de CORT hasta los 21 d postparto, pudieron desencadenarse mecanismos locales de crecimiento del tejido alveolar en la fase inicial de la lactancia (Wakerley *et al.*, 1994); esto tendría una oportunidad de expresión adicional sobre la producción de leche hasta el final de la misma (Schams *et al.*, 1984). En el caso del experimento esto se observó mediante la LAC90 (Cuadro 6). Aunque, Bertenshaw y Rowlinson (2009) no cuantificaron perfiles hormonales obtuvieron resultados similares en vacas primíparas especializadas en el Reino Unido, así el presente trabajo se encuentra un paso adelante. La información obtenida por este estudio es inédita para este tipo de planteamiento de manejo humano gentil preparto y sistema de ordeño en el trópico.

En esta experiencia, todos los animales estuvieron sometidos al mismo manejo del ordeño, siendo atribuible la variación de LCB y LCB/LT solo a la aplicación de los tratamientos de manejo humano gentil; así CE produjo un efecto de mayor eficiencia en la remoción que SM ($p < 0,05$). Si bien es conocido que la ausencia de la cría en el ordeño de animales cruzados ha manifestado máximos niveles de LCB y baja eficiencia en vacunos cruzados (Bar Peled *et al.*, 1995; Combellas y Tesorero, 2003, Drescher, 2003), cuando se incrementan los valores de LV en vacas con presencia de la cría se compensa el total por la menor cantidad absoluta de LCB

(Combellas y Tesorero, 2003). Sin embargo, y debido a que la mayor remoción total de leche de la glándula mamaria puede disminuir el efecto de retroalimentación negativa sobre los lactocitos alveolares, por vía de la menor secreción del Factor Inhibidor de la Lactancia (FIL) (Wilde y Peaker, 1990; Wilde *et al.*, 1995) y de la menor presión física que activa los nervios simpáticos de la glándula mamaria y hace decrecer el flujo sanguíneo periférico y la disponibilidad de nutrientes (Wakerley *et al.* 1994), el condicionamiento preparto, del manejo humano gentil, favorecería la eficiencia de remoción de leche de la glándula mamaria y la síntesis total. Esta práctica merece una consideración tecnológica para los sistemas de ganado vacuno cruzado en el trópico.

Narváez *et al.* (2006a), evaluaron diferentes modalidades de estimulación de vacas adultas para iniciar y mantener la eyección láctea a través del uso de la cría en ordeño mecánico y en condiciones tropicales y encontraron rangos de entre 10 a 50 s de estimulación preordeño para alcanzar la eyección y tiempos de ordeño que variaron entre 4,9 a 12,5 min, la amplitud del rango de valores viene dada por la presencia/ausencia de la cría en los tratamientos aplicados y los diferenciales intervalos entre ordeños (10 y 14 h). Así, las todas las variables descritas son altamente susceptibles a cambios en el manejo, por lo cual los resultados acá obtenidos resultan aún más convincentes.

En relación a la composición físico – química de la leche en sus diferentes fracciones no se evidenciaron efectos de los tratamientos ($p>0,05$). Los valores encontrados están acordes a promedios reportados por la literatura y norma de exigencia nacional (Wakerley *et al.*, 1994; Ayadi *et al.*, 2004; COVENIN 798, 1994), aunque superiores a otros trabajos en condiciones tropicales con manejo de uso de la cría (Combellas y Tesorero, 2003; Drescher, 2003). Debido a la menor densidad de la grasa y la forma de emulsión, en la cual se almacena en la leche en la glándula mamaria, se requiere la activa compresión del alvéolo para su expulsión

(Bruckmaier *et al.*, 1994; Bruckmaier y Hilger, 2001), por lo cual se esperaría el reflejo en mayores tenores de grasa en CE, debido a mayor LV (Bertenshaw y Rowlinson, 2009). Sin embargo, todos los trabajos que citan que el mayor contenido graso de la leche fueron a causa de la mayor remoción de LV en vacas de herencia *indicus* (30 – 50%) comparaciones de la presencia contra la ausencia, total o parcial, de la cría (Combellas *et al.*, 2003; Drescher, 2003; Pérez *et al.*, 2006). Tal como señala Drescher (2003), la sola presencia de la cría al lado de la madre es tan potente como la administración (i.m) de 30 UI OT exógena para desencadenar la eyección láctea y no afectar diferencialmente ($p>0,05$) el contenido de grasa de la LV. Esto coincide con que el contenido graso de la LCB en ningún trabajo ha mostrado diferencias estadísticas ($p>0,05$) bajo la misma premisa.

Las diferencias acotadas para LAC90 (+173 Kg/90 d), disminuyeron ligeramente al aplicar la corrección al 4% en grasa (+124 Kg/90 d) debido a que los valores parciales LT4% (Kg/d) se ajustaron según la variación de la misma durante el transcurso de los días de lactancia (Figura 7). Este hecho revela una posible eficiencia de conversión alimenticia superior a favor de CE que requiere ser evaluada, considerando que la CC disminuyó en todos los tratamientos sin diferencia entre ellos ($p>0,05$).

Debido a la constante elevación del contenido de grasa en la LVA de todos los tratamientos durante los 90 d de lactancia y conjuntamente con la tendencia de las curvas de LT en los tres tratamientos (Figura 5) es posible que al final de la experiencia no se haya alcanzado el pico de la lactancia en este grupo animal (Botero y Vertel, 2006).

El ordeño de vacas de primera lactancia es un reto en las unidades de producción de cualquier nivel de intensidad debido a que la hembra primípara llega a esta etapa fisiológica sin conocimiento previo de la experiencia (instalaciones, rutinas y personal). No sólo es un asunto de bienestar animal, que exige garantizar un manejo libre de estrés psicológico para el

animal (Broom y Fraser, 2007; FAWC, 2009), es proporcionar condiciones en las que el comportamiento natural pueda expresarse (p.e. relación materno filial) sin detrimento del potencial de producción biológico de aquellos individuos implicados en el sistema de producción. A esto se añade, la exigencia que se le impone a la vaca de primer parto a expresar un nivel de producción que justifique su permanencia en la unidad de producción en el tiempo.

Por mucho tiempo la selección por temperamento y recomendación de eliminación de animales nerviosos y temerosos ha sido una premisa aceptada debido al detrimento de los niveles de producción y riesgo de pérdidas por lesiones al propio animal o a los trabajadores (Phocas *et al.*, 2006; Gutiérrez-Gil *et al.*, 2008). Sin embargo, la sensibilización positiva del sistema nervioso central mediante sustancias químicas endógenas (hormonas, neurotransmisores y otros compuestos) ha sido estudiada en humanos con propósitos de investigación de patologías del comportamiento y terapias de salud mental.

En el mundo animal estas investigaciones se ha realizado con miras a aplicar como modelos de experimentación que aporten soluciones a los humanos, solo en la última década se han iniciado trabajos científicos con el propósito de estudiar la influencia de la condición psicológica de los animales sobre sus niveles de socialización y producción (Bertenshaw y Rowlinson, 2008; Bertenshaw *et al.*, 2009; Hild *et al.*, 2011; Ross y Young, 2009; De Oliveira, 2013). El estudio de Coulon *et al.* (2013) es la primera demostración que experiencias negativas tempranas con humanos causan alteración neuronal de profundo impacto en el la morfología cortico límbica en animales domesticados hace más de 12 mil años (ovejas), así este trabajo, coadyuva a abrir un camino en la psico-neuro-zootecno-endocrinología para la ganadería vacuna tropical.

3. Reinicio de la actividad ovárica

La inexistencia de cuerpos lúteos y niveles elevados de P_4 (Cuadro 13) es determinante para aseverar que las hembras vacunas F1 de primer parto no reiniciaron la actividad ovárica funcional de manera cíclica hasta el 90 d postparto.

La condición corporal al parto y durante el postparto pareciera no haber limitado el crecimiento folicular (Domínguez *et al.*, 2007; 2008; Ruiz *et al.*, 2010), lo cual ocurre inicialmente debido a la regulación por secreción de factores autocrinos del ovario (IGF-1) y hormonas metabólicas (Insulina) (Lucy *et al.*, 1991; Pinto-Santini *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010). El inicio del apareamiento de FC3 a los 47 d postparto concuerda con la esperable culminación de la involución uterina al 45 d postparto (Landaeta-Hernández *et al.*, 2004; Drescher *et al.*, 2014) con lo cual se garantiza que todas las estructuras del tracto genital respondan anatómica y fisiológicamente a la ciclicidad del eje gonadotrópico (Domínguez *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2010). El inicio de la detección de FC3, concuerda con el previo incremento y reclutamiento de los FC2 (Figura 7), a partir del 21 d postparto para FC2 y 47 para FC3 (Ruiz-Cortes y Olivera-Angel, 1999); el desarrollo de receptores para hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) en los FC3 permite el crecimiento y desarrollo funcional (secreción E_2), con la consecuente ovulación y formación de CL (Lucy *et al.*, 1992; Kamimura *et al.*, 1994; Roa *et al.*, 2006). La fase de evolución de los FC3 no fue detectada en la experiencia, por ello se presume un bloqueo en todos los animales considerados en el estudio. Si bien es claro que el temperamento excitable, la reactividad (Rueda, 2012) y el estrés son capaces de elevar el CORT (Curley *et al.*, 2006; Saco *et al.*, 2008) y disminuir la amplitud de los pulsos de GnRH a nivel central (hipotalámico) (Breen y Karsch, 2006; Breen *et al.*, 2008; Wagenmaker *et al.*, 2009) era esperable que la hipótesis de la influencia del manejo humano gentil sobre el temprano reinicio de la actividad ovárica pudiera causar una disminución de esta supresión (Cooke *et al.*, 2009).

Ha sido discutido previamente que los resultados de los niveles de CORT fueron bajos a inicio de la lactancia solo en CE, pero se equipararon al resto de los tratamientos a partir del 34 d postparto (Cuadro 11), que es cuando inicia el apareamiento de los FC3. También, ha sido documentado que la presencia de la cría es suficiente para mantener elevados los niveles de CORT. Adicionalmente, la presencia de la cría y el amamantamiento retrasan el reinicio de la actividad ovárica (Mukasa-Mugerwa *et al.*, 1991; Ruiz-Cortes y Olivera-Angel, 1999; Galina *et al.*, 2001) y consecuentemente ovulación debido a la falta de pulsos de LH generada su depleción en adenohipófisis; esto ocurre por la continua sensibilidad del pulso generador de GnRH proveniente del efecto de retroalimentación negativa del 17β -estradiol ovárico modulado por la liberación endógena de péptidos opioides del hipotálamo (Connor *et al.*, 1990; Williams y Griffith, 1995; Griffith y Williams, 1996; Stagg *et al.*, 1998; Yavas y Walton, 2000). Así, como en vacas de carne la permanente presencia de la cría puede mantener elevada cantidad de FC3 ($10,6 \pm 1,2$) con retrasos de la ovulación (Hoffman *et al.*, 1996a, b) hasta cerca del 100 d postparto en vacas adultas (Mukasa-Mugerwa *et al.*, 1991; Silveira *et al.*, 1993; Lamb *et al.*, 1997) estos hallazgos (Cuadro 9) en vacas primíparas F1 con dos ordeños por día, cría al pie y amamantamiento restringido post cada ordeño, alimentadas sobre la base de pasturas y suplementación mineral parecen coincidir parcialmente.

Por último, un factor adicional y no menos importante en la dinámica del eje gonadotrópico pudiera haber sido limitante: la ausencia de machos en el rebaño de ordeño. La Bioestimulación por presencia de macho, fértil o recelador, en los rebaños de vacas con amamantamiento ha demostrado acelerar el reinicio de la ciclicidad ovárica, así como el mayor tamaño de los folículos, mayores niveles de P_4 y mayor longitud en la duración del primer estro (Landaeta-Hernández *et al.*, 2004, 2008; 2013). Landaeta-Hernández *et al.*

(2013) señala que este efecto de retraso en los días para el reinicio de la actividad ovárica es aún más crítico en los animales subordinados del rebaño ($60,2 \pm 6,4$ contra $26,3 \pm 8,2$ d en las subordinadas y no expuestas a toro contra las dominantes y expuestas a toro respectivamente). Si bien, no se realizaron estudios de jerarquía, fue acotado que las vacas primíparas en el rebaño tienden a ocupar la base de la pirámide (Reinhardt y Reinhardt, 1975). Así, mayor investigación es necesaria en este grupo etario con miras a esclarecer el comportamiento jerárquico y su influencia sobre los mecanismos fisiológicos involucrados en la reproducción de vacas cruzadas de primera lactación; con ello se permitirá afinar estrategias de manejo en la ganadería tropical.

VII.2. EFECTO DE DOS DIFERENTES TIPOS DE MANEJO GENTIL DURANTE EL PREPARTO SOBRE EL TEMPERAMENTO, EYECCIÓN LÁCTEA Y REINICIO DE ACTIVIDAD OVÁRICA DE VACAS PRIMÍPARAS EN ORDEÑO MECANIZADO Y SIN CRIA AL PIE

1. Control

Valores de 3,5 (NIRD 1-5) para CC al parto, tales como los obtenidos en el experimento, son los más recomendados por diversos autores (Fattet y Jaurena, 1988; Gallo *et al.*, 1996; Broster y Broster, 1998; Bewley y Schutz, 2008). Ello, con el propósito de garantizar la expresión del potencial genético en animales seleccionados para habilidad lechera y, propio de la elevada movilización de reservas corporales para secreción láctea, minimizar la longitud del anestro debido a escasas reservas de tejido graso ($CC \geq 2,5$), leptina, insulina, entre otros metabolitos (Martínez *et al.*, 1998b; Galvis y Correa, 2002; Domínguez *et al.*, 2007; 2008; Pinto-Santini *et al.*, 2009). De acuerdo a los resultados, la pérdida de 0,7 unidades de CC hasta el 45 d postparto evidencia la activa movilización de reservas corporales para garantizar la secreción y producción láctea conforme al potencial (Broster y Broster, 1998; Bewley y

Schutz, 2008), sin que ello, potencialmente pudiere afectar, culminada la involución uterina, el reinicio de la actividad ovárica postparto debido al valor mínimo alcanzado (2,9) (Connor *et al.*, 1990). El grupo de vacas primíparas y cruzadas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) evidenció pérdidas importantes de CC durante los primeros 45 d postparto, equivalente a de vacas de alta habilidad para producción de leche (Gallo *et al.*, 1996; Galvis y Correa, 2002; Campos *et al.*, 2007; Pinto-Santini *et al.*, 2009).

La variable de control relacionada con la proporción de células sanguíneas, Hto (%), presentó valores dentro de rango (27 – 46 %) para ganado vacuno (Camus, 1983; Calzada *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2006) coincidentes con el valor máximo hallado por Campos *et al.* (2007) con diversos grupos genéticos en Colombia (24,2 -32,6%) y bajo condiciones similares de manejo (pastoreo). Por lo anteriormente descrito, y los signos clínicos evidenciados en los animales es posible asegurar el adecuado estado de salud general de las vacas en experimentación.

2. Temperamento

La práctica del CE preparto mostró ser efectiva en términos de reducir los valores de REAC, indicativos de comportamiento nervioso o de miedo, en vacas cruzadas F1 cuando fueron sometidas a un manejo novedoso de alta interacción humano - animal durante la rutina del ordeño mecanizado y sin la presencia de la cría una vez que se produjo el primer parto. Esta reducción de la REAC se manifestó tempranamente (5 d postparto en CE) (Cuadro 1, Figura 6), a pesar que este período es reconocido como de cambios neuropsicofisiológicos debidos a las adaptaciones que debe sufrir la hembra vacuna cuando pasa de ser una novilla gestante a vaca de primer parto y posterior e inmediatamente a vaca en producción de leche por primera vez (Neumann *et al.*, 2005; Rueda, 2012; Shkurko, 2012).

La importancia de éste resultado en la REAC radica en que con vacas cruzadas en condiciones tropicales (clima, sistema de alimentación, ente otras), manejadas en instalaciones de alta inversión monetaria y diseñadas para minimizar la interacción humano – animal, en términos de visualización, posibilidad de embestida y menor riesgo laboral, y que a su vez mejoran la eficiencia de la mano de obra debido a que el animal es conducido por pasillos para entrar y salir con relativa naturalidad debido a que perciben un área de escape o salida (Grandin, 1997; Grandin y Deesing, 1998). El CE parto puede hacer sinergia y favorecer tempranamente las adaptaciones a las rutinas de manejo en inicio de lactación (Rushen *et al.*, 1999; Bertenshaw y Rowlinson, 2009; Rueda, 2012).

Veintiún por ciento de las vacas primíparas de SM no disminuyeron los valores de REAC, hasta el último período considerado en la evaluación (90 d postparto); Van Reenen *et al.* (2002) atribuyen estas respuestas a la variación individual de los animales.

Debido a que pruebas como el Test de Reactividad se aplican para determinar índices de heredabilidad del temperamento, sobre los cuales es posible ejercer selección, descarte y establecer planes de mejoramiento (Halloway y Johnston, 2003; Curley *et al.*, 2006; Phocas *et al.*, 2006), animales no condicionados favorablemente, por prácticas similares al CE, pudieran ser eliminados de programas de selección y mejoramiento por ausencia de oportunidad de condicionamiento positivo para la expresión del mismo. Debido a que el procesamiento afectivo progresa lateralmente en cadenas paralelas de acontecimientos que se amplifican rememorando estímulos asociados, de forma que se elimina, mitiga, mantiene o incluso se amplifica el estímulo (Toates, 1997; Damasio, 2003; Martini, 2008; De Oliveira, 2013) es el flujo de los contenidos mentales del individuo el que particularmente prepara a los desencadenantes para las respuestas emocionales, por ello los eventuales cambios en el modo

cognitivo y mapas somáticos de las respuestas pueden ser alterados (Toates, 1997; Damasio, 2003; De Oliveira, 2013), por ejemplo, mediante la acción combinada y relación CORT/OT- influyendo en la percepción y expresión de las emociones (Damasio, 2003; Dedovic *et al.*, 2009).

Este trabajo es evidencia de ello, sin embargo, la cuantificación de los valores de OT basales, una vez señalado su rol sobre los posibles efectos en diferencias afectivo – sociales (Uvnäs-Moberg *et al.*, 2001; Petrovic *et al.*, 2008; Ross y Young, 2009; Campbell, 2010), tal como lo viene a ser la interacción entre vacas primíparas en producción y personal de ordeño, no fue determinado.

En la literatura, la OT ha sido evaluada en muestras de sangre, saliva (Yang *et al.*, 2013) y fluido cerebro espinal (Parker *et al.*, 2010), los reportes de OT en leche solo han sido realizados en humanos con éstos fines (Mishra *et al.*, 2014). De acuerdo a la metodología aplicada, la OT basal en leche no fue capaz de arrojar diferencias debidas a los tratamientos aplicados. Así, se requiere profundizar la investigación en este aspecto, con técnicas de mayor precisión, tales como cuantificación en sangre, aplicación de inmunohistoquímica para identificación de receptores y áreas cerebrales de acción, entre otras) (Bale *et al.*, 2001; Aleman *et al.*, 2008; Dedovic *et al.*, 2009); así mismo, mediciones sobre la cría, esté o no presente en el ordeño son de interés científico y tecnológico (Johansson, 2000; Coulon *et al.*, 2011; 2013). Para las metodologías anteriormente indicadas se requiere de procedimientos invasivos.

En el caso de la variedad de actitudes apreciadas en los animales dentro de la sala de ordeño mecanizada, éstas fueron escasas. El tipo de sala de ordeño, espina de pescado, limitó el contacto humano - animal. Narváez (2005) reporta la atención de la vaca hacia el personal

de ordeño (movimientos oculares y espera por la colocación de alimento) cuando las vacas fueron ordeñadas en una sala mecanizada del tipo tándem. La sala de ordeño tipo espina de pescado reduce las actitudes y reacciones que la vaca puede exhibir y/o las que pueden ser detectadas por el ordeñador desde la fosa, esto debido a la minimización de interacción entre el campo visual del animal y el humano. El ordeñador dentro de la fosa de ordeño queda ubicado hacia el área de la zona ciega de la vaca (Grandin, 2010) y, debido a que el lote de vacas a ordeñar se ajusta de forma lateral y continua entre sí, existe una mínima distancia entre animales que coadyuva a impedir al animal a girar la cabeza y/o el cuerpo hacia el mismo. Por otro lado, no es posible visualizar el movimiento de los ojos, orejas o cabeza del animal, vocalizaciones, arqueado del lomo, entre otras, una vez que el animal es ubicado en el puesto de ordeño; la vaca y el ordeñador se mantienen con nulas posibilidades de interacción visual frontal durante la extracción de la leche. Así, el área de interacción entre el ordeñador y la vaca queda reducida al tren posterior, extremidades traseras y zona de la glándula mamaria, es decir, el área de trabajo.

No es posible definir un continuo de actitudes que pudieran significar una conducta reiterativa y característica en los animales (TEM) (Lahitte *et al.*, 2002; 2003) en ordeño mecanizado debido al efecto SM o CE. Las actividades de excreción (orinar y defecar), pateo o brincar, son de tipo genérico y están influenciadas por múltiples factores (p.e. consumo de agua, alimento, sonido del equipo de ordeño o metálicos sobre la estructura, presencia de algún animal dominante o subordinado contiguo al animal en observación, celo, entre otras), los cuales no permiten su asociación exclusiva con la relación humano – animal durante el ordeño. La conducta natural del animal es minimizada dentro de la sala de ordeño tipo espina de pescado.

Es probable que la falta de marcadas diferencias individuales en la conducta de las vacas se haya debido al manejo de pequeños lotes (Van Reenen *et al.*, 2002). El manejo de pequeños lotes de animales en el corral de alimentación, ubicado previo a la sala de ordeño (Figura 3), visión de túnel de salida (Grandin, 1997; Grandin y Deesing, 1998) y posibilidad de las vacas de avanzar en grupo hacia la entrada a los puestos de ordeño (lado derecho o izquierdo de la fosa central) debido a la presencia del ordeñador en un ángulo de 60° (Figura 1; posición A y B) del punto de balance (cruz del animal), sin presión excesiva sobre la distancia de fuga (Grandin, 2010), pudieran haber evitado la manifestación de conductas asociadas al miedo en el animal (p.e. huida, embestida y bufar) (Rushen *et al.*, 1999; Grandin, 2010).

Por su parte, la diferencia en los niveles circulantes de CORT entre tratamientos en todos los periodos de muestreo, excepto el inicial (pretratamiento) y recién postparto (5 d postparto) (Cuadro 21), evidenciaron la potencia en la reducción de éste indicador de estrés durante el inicio de la lactación (Fell *et al.*, 1999), al aplicar el CE durante el final del último tercio de la gestación (Rushen *et al.*, 1999; Waiblinger *et al.*, 2002; 2004; Bertenshaw y Rowlinson, 2009).

La tendencia en el tiempo a la disminución de los valores de REAC fue observada en ambos grupos de vacas primíparas, sin embargo, se mantuvieron ciertas distancias en los valores de concentración promedio de CORT y éstas determinaron diferencias entre tratamientos (Cuadro 21) durante varios periodos consecutivos. La significancia de la interacción tratamiento y días ($p < 0,05$) muestra la respuesta diferencial en cada periodo evaluado. A inicio de la experiencia (-49 ± 23 d preparto), se esperaban concentraciones de CORT similares en cada uno de los grupos experimentales debido a que aún no habían

iniciado los tratamientos y efectivamente así fue ($p>0,05$). El valor de CORT a los 5 d postparto muestra que la dinámica del parto causante de situaciones metabólicas y fisiológicas que involucran la normal variación en los niveles de CORT (Brook y Marshall, 1999) deben haber sido superiores al efecto que la práctica de manejo gentil en la interacción humano – animal pudo causar (Hemsworth *et al.*, 1989). A partir de los 21 d postparto fue posible atribuir la respuesta diferencial ($p<0,05$) en el CORT circulante al manejo gentil humano – animal del preparto (CE) (Hemsworth *et al.*, 1989; Bertenshaw y Rowlinson, 2009; Rueda, 2012). Sin embargo, hacia el final de la etapa evaluado y coincidiendo el comportamiento de los valores de la curva de sobrevivencia para la REAC (Figura 14), los animales de SM fueron disminuyendo brecha con respecto a aquellos de CE, por lo cual la adaptación del animal a las rutinas del ordeño causó un gradual paso de distres a eutres.

La ausencia de la presencia de la cría con su madre posterior a las 48 h postparto pareciera haber minimizado la dualidad referida por Drescher (2003), Drescher *et al.* (2006), Kendrick (2013), Wellnitz y Bruckmaier (2014) en cuanto a que actúa como factor estimulador - estresor de la vaca en el ordeño y/o en amamantamiento restringido postordeño y hasta pudiera haber sido causa de la no diferencia de CORT entre tratamientos a los 5 días postparto debido a su temprana separación (Narváez *et al.*, 2006b). Así, aun es necesario precisar las mejores respuestas a la interacción gentil humano - animal en vacas de primera y sucesivas lactancias en el trópico y bajo distintas modalidades de ordeño.

3. Eyección láctea

Cuando el intervalo ente ordeños es regular, aproximadamente cada 12 horas, es esperable que los TE y TO entre ordeños no se encuentren afectados debido a que la presión intramamaria causada por la acumulación de leche sintetizada es equiparable (Bruckmaier y

Hilger, 2001; Bruckmaier y Wellnitz, 2014). Así, para el siguiente ordeño se condiciona la similitud de respuesta en cuanto al requerimiento de estímulos neuroendocrinos rutinarios, indispensables para el nuevo inicio de una eyección láctea (Bruckmaier y Hilger, 2001; Bruckmaier y Wellnitz, 2014). Sin embargo, intervalos de 10 y 14 horas, tales como los que se presentaron en la experiencia, condicionan un distinto grado de llenado de la ubre y en consecuencia diferente presión intramamaria entre los ordeños (Bruckmaier y Hilger, 2001; Bruckmaier y Wellnitz, 2014). El mayor intervalo entre ordeños determina la mayor presión intramamaria debido a la acumulación de mayor cantidad de leche en la glándula, así, es esperable que con ligeros estímulos de preparación de la glándula mamaria para el ordeño (entrada a la sala, limpieza de pezones y masaje) la vaca inicie rápidamente la eyección. Ya que esto es aplicable a ambos tratamientos, las diferencias observada a favor de CE sobre el TO permiten evidenciar, que si bien los intervalos no incidieron sobre el TE matutino porque para ambos grupos el efecto de los estímulos fue del ordeño inminente (alta presión por mayor intervalo), es probable que existiesen mayores cantidades de leche alveolar, con lo cual se requiere mayor tiempo para el vaciado de dicha leche sintetizada y acumulada. Cuando ocurre el mayor vaciado de leche de la glándula, ordeño a fondo, reduce al mínimo la presión intramamaria, se evitan los efectos del Factor Inhibidor de la Síntesis Láctea (FIL) (Weis, 2004) por lo que al ser estimulada se activa la síntesis de leche. En el caso de SM el menor TO puede estar asociado a la mayor REAC y al estrés evidenciado por los valores de CORT (Hemsworth, 1989; Liberzon y Young, 1997; Hemsworth *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2009), así como por la menor liberación OT (Negrão y Marnet, 2003) y/o menor síntesis láctea (Hemsworth *et al.*, 2000; 2002).

La aplicación de estrategias de selección y cruzamiento de vacunos, por rápido ordeño y elevado nivel productivo, ha sido implementada en rebaños especializados en leche, debido a

los altos índices de heredabilidad observados y a las posibilidades de mejorar la eficiencia de extracción, menor permanencia de los animales en la sala, diseño apropiado de equipos (Laureano *et al.*, 2012). El interés de la cuantificación de la leche en los tiempos especificados durante esta experiencia fue concebido desde la perspectiva del posible impacto de la práctica de CE hacia la eficiencia en el uso tiempo, recolección de leche en menos tiempo.

Debido a que LVA2 y LVP2, LVA y LVP y finalmente LVT fueron afectados por CE, la interacción gentil humano – animal preparto mostró un efecto benéfico cuantificable en el manejo animal y la eficiencia del tiempo de ordeño de vacunos cruzados en condiciones tropicales (Sapolsky *et al.*, 2000; Bertenshaw y Rowlinson, 2009; Laureano *et al.*, 2012). El beneficio del CE sobre la velocidad de ordeño es de consideración especial en sistemas de alimentación basados en el pastoreo, ya que menor tiempo en la sala de ordeño implica la maximización del uso del tiempo del animal en el consumo de alimentos fibrosos, con lo cual se optimiza el desempeño global del sistema, es por ello que la velocidad de ordeño ha sido una variable a considerar en programas de selección y mejoramiento genético (Laureano *et al.*, 2012).

El efecto de CE sobre la fracción de leche LVAM se corresponde con lo ocurrido en el TO matutino (Bertenshaw y Rowlinson, 2009). El valor de LVA a los 2 min de haber iniciado el ordeño también muestra el impacto de la práctica, es decir, en el inicio del pronto vaciado de la leche de la glándula. Si bien, la LV5 matutina y vespertina no mostraron efecto ($p>0,05$), esto puede ser debido a la alta variabilidad expresada en el lote de vacas de ambos tratamientos y a que en la mañana y tarde solo el 41% ó 20% respectivamente de los animales de SM lograron alcanzar los 5 min en ordeño, mientras que en CE lo hicieron 68% y 30%, respectivamente; las diferencias entre el ordeño de la mañana y la tarde para los animales que

alcanzaron 5 o más min en ordeño también se corresponde con el menor intervalo entre ordeños, la respectiva leche sintetizada y presión intramamaria (Bruckmaier y Hilger, 2001; Lollivier *et al.*, 2002; Bruckmaier y Wellnitz, 2014). Narváez *et al.* (2006) encontraron tiempos de ordeño mecanizado entre 7 y hasta 8 min cuando la cría estuvo presente, es decir, los tiempos son susceptibles a múltiples factores.

En relación a la tendencia de la curva de la lactancia, esta se mantuvo en dirección ascendente para ambos casos, SM y CE. Esto indicaría que aún no se culminó la primera fase de la lactancia para las condiciones de manejo de este grupo animal (García-Muñiz *et al.*, 2008). Sin embargo, para CE la diferencia de leche en L/d entre el 5 y el 90 d postparto fue de +36%, mientras que para SM fue de +18%. Entre los factores implicados y necesarios para la galactopoyesis se encuentra la remoción de la leche de la glándula mamaria (Lollivier *et al.*, 2002), ya que aquellas cantidades remanentes auto-inhiben la secreción láctea debido a la liberación del factor inhibidor de la lactancia (FIL) (Wilde y Peaker, 1990; Wilde *et al.*, 1995; Weis, 2004). Al cuantificar la fracción de leche remanente en la ubre (LR), posterior al ordeño, y seguidamente calcular la EO la contundencia de la práctica de CE muestra mayores evidencias del beneficio (Bruckmaier *et al.*, 2004; Bar Peled *et al.*, 1995; Tesorero *et al.* 2001; Drescher, 2003; Ayadi *et al.*, 2004; Bruckmaier, 2005; Negrão y Marnet, 2006; Bertensaw y Rowlinson, 2009). La tendencia estadística de CE a superar en producción de leche acumulada a los 90 d postparto es un signo positivo de impacto de la práctica preparto en el sistema de producción (Waiblinger *et al.*, 2002; Bertenshaw y Rowlinson, 2009).

Desde el punto de vista de la producción de los componentes lácteos, la grasa es la fracción más sensible al manejo de la alimentación y ordeño (Bar Peled *et al.*, 1995; Samuelsson, 1996; Johansson, 2000; Tesorero *et al.*, 2001; Drescher, 2003; Drescher *et al.*,

2009). CE favoreció la cantidad de grasa determinada en la cisterna; sin embargo, la mayor importancia comercial del componente radica en su proporción en la fracción alveolar (70 - 80% del total de la leche) (Drescher, 2003; Ayadi *et al.*, 2004; Bruckmaier, 2005). Así, aparentemente la mayor cantidad de LVT y su óptima remoción durante el ordeño no estuvo correspondida con la composición grasa, que de aparecer sería un indicativo contundente de baja eficiencia en el retiro de la fracción alveolar, es decir, el hecho de no variar la composición grasa de las fracciones alveolares orienta a considerar la paulatina merma en la síntesis (Lollivier *et al.*, 2002).

El hallazgo de alteración de lactosa en la leche cisternal y alveolar sustenta químicamente la elucubración anterior, ya que es lactosa un componente determinante en el equilibrio de potenciales entre lo sintetizado hacia el lumen del alvéolo y los componentes de la sangre contenida en capilares; por ello se asocia la lactosa como el componente químico determinante de la activación - detención de la síntesis láctea (Wilde y Peaker, 1990; Wilde *et al.*, 1995). La variación de lactosa es clave para complementar el ciclo explicativo que entreteje la relación de menor REAC, mayor TO y mayor síntesis – eyeción láctea para CE.

Por otro lado, el ligero pero significativo aumento ($p < 0,05$) de la proporción de proteína en leche alveolar a favor de CE coincide con el reporte de Bertenshaw y Rowlinson (2009); sus implicaciones para mejorar la aptitud industrial de la leche incrementan la significancia biológica del CE parto en animales bajo ordeño mecanizado. El posible apropiado balance energía: proteína de la ración (Pinto-Santini *et al.*, 2011), permitió alcanzar la optimización de respuestas productivas (nivel de producción y contenido de grasa), ya que los animales no perdieron CC de manera excesiva (de Vries y Veerkamp, 2000; Menzies *et al.*, 2009; Pinto-Santini *et al.*, 2009; 2011), lo cual es determinante del nivel de insulina circulante (Pinto-

Santini *et al.*, 2009; 2011) y a su vez fuerte determinante de la síntesis de proteínas lácteas (Menzies *et al.*, 2009). Finalmente, las fracciones LVA4%, LVP4% y LVT4% mostraron mantener los beneficios a favor de CE ($p < 0,01$), lo cual muestra correspondencia con los planteamientos anteriores.

El condicionamiento a ambientales estimulantes (lugar conocido, suministro de alimentos, presencia de la cría, entre otros) incrementa la secreción y liberación de oxitocina en vacas durante ordeño (Samuelsson, 1996; Johansson, 2000; Bruckmaier y Wellnitz, 2014).

A pesar de aplicar las mismas y rutinarias técnicas de estimulación preordeño en todos los animales, la liberación de OT fue inferior en SM que en CE ($p = 0,07$). El rango AUC en SM varió entre 35,8 a 91,9 pg/mL, mientras que en CE fue de 62,7 pg/mL, para corresponder a una vaca con pobre liberación, hasta el extraordinario valor de 371 pg/mL en un animal. La variación individual siempre estuvo presente, pero, en ausencia de la cría, y dados los valores de las fracciones de leche (LV, EO) descritos en puntos anteriores es razonable pensar que los factores de estrés en la vaca primípara en ordeño fueron minimizados (Bar Peled *et al.*, 1995; Kraetzl *et al.*, 2001; Drescher, 2003; Negrão y Marnet, 2006; Bruckmaier y Wellnitz, 2014) ya que ningún animal presentó bloqueo total de la eyección láctea a pesar de la probable insuficiente cantidad y tiempo (AUC) de vacas SM, lo cual se reflejó en tiempos de ordeño y niveles de producción.

Si bien, las vacas de SM liberaron precozmente OT, esta decayó rápidamente. Sin embargo, en las primíparas de CE la elevación del nivel de OT circulante fue gradual y sostenido en nivel y tiempo (AUC), dos factores determinantes para la mayor remoción de la leche durante el ordeño (Schams *et al.*, 1984; Bruckmaier *et al.*, 1994; Bruckmaier y Wellnitz, 2014; Negrão y Marnet, 2003; 2006).

La principal significación biológica de esta caracterización, inédita en el país, radica en su vinculación con la eyección láctea, donde todos los resultados descritos en puntos previos (tiempos, fracciones de leche y composición) coinciden con perfiles de OT circulante.

4. Reinicio de actividad ovárica

El pronto reinicio de la actividad ovárica en hembras vacunas en lactancia bajo ordeño ha sido documentado cuando la cría está ausente (Silveira *et al.*, 1993; Viker *et al.*, 1993; Toribio *et al.*, 1995; Williams y Griffith. 1995; Hoffman *et al.*, 1996; Lamb *et al.*, 1997; Stagg *et al.*, 1998; Yavas y Walton. 2000; Wagenmaker *et al.*, 2009).

El efecto de la presencia de la cría y el grado de reservas energéticas, expresado por la CC son los dos principales, y más fuertes efectos, causantes del anestro postparto (Lucy *et al.*, 1991; 1992; Pérez *et al.*, 2001; Domínguez *et al.*, 2004; Pinto-Santini *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010). Los animales de ambos tratamientos, SM y CE, se comportaron de igual forma, siendo que ningún efecto sobre las estructuras ováricas puede atribuirse a la interacción humano – animal preparto, tal como pudiera haberse esperado motivado al estrés (Breen y Karsch, 2006).

La correspondencia entre las estructuras ováricas evaluadas, cantidad y calidad de folículos y cuerpos lúteos, aconteció de manera biológicamente esperable (Lucy *et al.*, 1992), la alta CC promueve, proporcionalmente, menores cantidades de Folículos Tipo II y mayores de Tipo III (Domínguez *et al.*, 2008; Pinto-Santini *et al.*, 2009). La vaca primípara en óptima condición corporal al parto durante la lactancia recobra su aptitud ginecológica (Drescher *et al.*, 2014) y reinicia tempranamente (34 -47 d postparto) la ciclicidad ovárica debido al

desbloqueo central de GnRH (Lucy *et al.*, 1991; Yavas y Walton, 2000) y efectos centrales y locales de naturaleza metabólica (Domínguez *et al.*, 2008; Pinto Santini *et al.*, 2009).

En condiciones de seguimiento diario de hembras vacunas cruzadas *Bos indicus x Bos taurus* durante el ciclo estral y aplicando programa de sincronización y transferencia de embriones, Roa *et al.* (1997 b) encontraron correspondencia entre estructuras ováricas y valores de concentración P₄ mediante la técnica de ELISA. Los valores de P₄ obtenidos muestran una correspondencia esperable cuando la condición del animal fue gestante, inicio parto de la aplicación de los tratamientos, y cuando inició el restablecimiento gradual de la función gonadal durante el postparto.

La ausencia de la cría permitió el restablecimiento temprano de la ciclicidad (Viker *et al.*, 1993; Toribio *et al.*, 1995; Williams y Griffith, 1995; Hoffman *et al.*, 1996b; Williams *et al.*, 1996). En la presente experiencia la estructura ovárica secretora de progesterona, cuerpo lúteo, fue capaz de producir cantidades correspondientes a niveles asociados a funcionalidad de dicha estructura y, en consecuencia de las gónadas, a los 34 d postparto. Los valores de concentración de P₄ se corresponden con lo observado anatómicamente en estructuras ováricas mediante la técnica de ultrasonido (Lucy *et al.*, 1991; Ruiz-Cortes y Olivera-Ángel, 1999; Domínguez *et al.*, 2008; D'Enjoy *et al.*, 2012). Los valores parto fueron especialmente elevados debido a la secreción conjunta del cuerpo lúteo y la placenta (Brook y Marshall, 1999).

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Una práctica de manejo de manejo gentil humano – animal previa a la conocida situación estresante, correspondiente al primer parto y la primera lactancia de la hembra vacuna, sirvió, mediante dos experiencias, para dilucidar aspectos neuroendocrinos implicados en animales característicamente utilizados para la producción de leche en la condición de clima tropical, todo esto de un óptica integral.

Posiblemente, la metodología aplicada, no permitió detectar variaciones en el nivel basal de OT de los animales según los tratamientos; pero su importancia en el comportamiento individual y social ha sido documentada ampliamente (Carter y Altemus, 1997; Uvnäs-Moberg *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2009; Campbell, 2010; Churchland y Winkielman, 2012; Feldman *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Palgi *et al.*, 2015) y los contrastes entre tratamientos en el AUC de OT detectados durante el ordeño pudieran estar relacionados con ella, debido a la posibilidad de mayor secreción del péptido por la neurohipófisis (Bealer *et al.*, 2010), a pesar de actuar sobre la base de mecanismos y lugares completamente distintos: neuropéptido/cerebro vs. neurohormona/células mioepiteliales de la glándula mamaria. En el cerebro la actuación es en múltiples regiones que incluyen el hipocampo, amígdala, cuerpo calloso, comisura anterior, córtex cerebral, cerebelo e hipotálamo, y hasta su propio desarrollo dendrítico (Charil *et al.*, 2010; Coulon *et al.*, 2013); por ello, los conceptos y modelos sobre consecuencias fisiológicas (Chousos, 2009). Los indicadores relacionados con la REAC y etología (madre y cría, cuando estuvo presente), cobraron importancia por las sensibles respuestas observadas en ambas experiencias, las cuales fueron coincidentes con diversos autores (Kabuga y Appiah, 1992; Becker y Lobato, 1997; Hemsworth *et al.*, 1989;

Hemsworth y Barnett, 2000; Lim y Young, 2006), por ello, es deseable precisar el/los mecanismos implicados bien mediante estudios a nivel de receptores cerebrales (Bale *et al.*, 2001), determinaciones de OT basal en muestras en sangre o fluido espinal (Kendrick *et al.*, 1991) o identificación molecular de locus que afectan temperamento (Gutiérrez *et al.*, 2008; Magolski, 2012). En el caso del CORT, también relacionado con la REAC y miedo (Petrovic *et al.*, 2008) más no como inhibidor de la liberación de OT (Tancin *et al.*, 2000a), resulta normal la expresión de elevados valores dada la sensibilidad del eje adrenocorticotrópico para enfrentar el estrés y reajustar la homeostasis del individuo en hembras primíparas (Hemsworth *et al.*, 1989; Negrão y Marnet, 2003); sin embargo, es el estrés prenatal y situaciones novedosas (parto/ordeño) cobran importancia por la asociación a anormalidades cognitivas, comportamentales y psicosociales tanto en animales y humanos (Toates, 1997; Sapolsky *et al.*, 2000; Lim y Young, 2006; Chrousos, 2009; Charil *et al.*, 2010). Las concentraciones de CORT observadas en ambas experiencias, se comportaron cualitativamente de manera distinta según los d postparto. Sin embargo, aunque la modalidad de ordeño y presencia o ausencia de la cría pudieron influenciar esas diferencias, el objetivo de contrastar el efecto de la interacción humano – animal fue demostrado por las diferencias entre grupos tratados de cada una de las experiencias. La práctica de manejo preparto alteró la REAC animal en el postparto. Más allá de un asunto de bienestar y derechos animales (libre de miedo, dolor y estrés; expresión de comportamiento normal), está documentado el impacto de la interacción humano – animal sobre las emociones (miedo, interacciones), fisiología y respuestas biológicas en especies domésticas (Liberzon y Young, 1997; Nissen *et al.*, 1998; Wellnitz y Bruckmaier, 2001; Damasio, 2003; Waiblinger *et al.*, 2002; 2004; Neumann *et al.*, 2005; Lim y Young, 2006; Broom y Fraser, 2007; Mormède *et al.*, 2007; Bertenshaw *et al.*, 2008; Bertenshaw y Rowlinson, 2009; Paranhos da Costa *et al.*, 2006; Toates, 1997; Petrovic

et al., 2008; Nätt *et al.*, 2009; Grandin, 2010; Burdick *et al.*, 2011; Coulon *et al.*, 2011; Hild *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013).

En relación a las variables productivas, y sobre la base de una adecuada condición corporal al parto, un balance energético que no pareció mostrar mayor compromiso nutricional y el óptimo estado de salud, el efecto de la interacción humano – animal gentil durante la fase altamente sensible del parto impactó sobre la eyección y síntesis láctea (> 100 Kg leche a 90 d de lactancia, independientemente de la modalidad de ordeño: manual – mecánico; con o sin cría), coincidiendo con trabajos de referencia en vacas de primer parto de alta aptitud para leche bajo ordeño mecanizado (Hemsworth *et al.*, 1989; Bertenshaw *et al.*, 2008; Bertenshaw y Rowinson, 2009). Esta respuesta se debió a la verificada activación del mecanismo neuroendocrino donde la continua y elevada concentración de OT durante el ordeño (AUC) garantizó la máxima remoción de la leche (Bruckmaier *et al.*, 1994; Bar Peled *et al.*, 1995; Samuelsson, 1996; Johansson, 2000; Lollivier *et al.*, 2002; Combellas y Tesorero, 2003; Drescher, 2003; Negrão y Marnet, 2003; Negrão y Marnet, 2006) y posiblemente por la minimización de la liberación del factor inhibidor de la síntesis láctea (Wilde y Peaker, 1990; Wilde *et al.*, 1995). En la experiencia con ordeño manual y su cría (Experimento 1) se observó la potencia de la succión preordeño (“apoyo”) para desencadenar la eyección láctea (TE) y liberación de OT (AUC) (Bar Peled *et al.*, 1995; Wellnitz y Bruckmaier, 2001; Drescher, 2003). Si bien, la ausencia de la cría en el ordeño ha sido reportada como fuerte disruptor de la eyección láctea en vacas cruzadas, esta ausencia en el ordeño combinada con interacción postordeño debido al amamantamiento restringido ha caracterizado los reportes en el trópico (Bar Peled *et al.*, 1995; Tesorero *et al.*, 2001; Combellas y Tesorero, 2003; Drescher, 2003; Pérez *et al.*, 2006). Cuando la cría se retira definitivamente del contacto con la madre (destete), la producción de leche cae y posterior se recupera, aunque esto dependerá

del momento de la curva de la lactancia en el cual se aplica el destete (Piña *et al.*, 2001) debido a la fuerte dependencia materno – filial está implicada (Paranhos da Costa *et al.*, 2006; 2008), el nivel de producción de leche de la vaca y la intensidad de estímulos que se ofrezcan al animal para dicha remoción. En el caso de la separación madre – cría muy temprana ($\pm 48 - 72$ h) se minimiza en vínculo (Nowak *et al.*, 2000) y las complicaciones de ordeño en sala mecanizada y con animales seleccionados para alta habilidad de producción de leche y baja habilidad materna son prácticamente inexistentes (Kraetzl *et al.*, 2001; Negrão y Marnet, 2006; Bruckmiaeer y Wellnitz, 2014); sin embargo, reportes en animales cruzados *Bos taurus* con *Bos indicus* indican alta frecuencia de lactancias cortas por ausencia de la cría (Vaccaro *et al.*, 1999). Es claro que la cría es el más potente desencadenador de la eyección láctea en todas las hembras mamíferas acostumbradas a su presencia (Bar Peled *et al.*, 1995; Kraetzl *et al.*, 2001; Combellas y Tesorero, 2003; Drescher, 2003), pero el escaso conocimiento y la reducida capacitación del personal de ordeño en materia de comportamiento animal y neurofisiología de la eyección láctea (estímulos medio ambientales, rutina, trato calmo y basado en visión y área de fuga del animal, ausencia total de situaciones inesperadas durante el ordeño y todos los días del ordeño) pudieran estar confundiendo las respuestas (Uetake *et al.*, 2002). Son necesarios estudios detallados de la influencia del trato del personal de ordeño (óptima estimulación, ambiente enriquecido y estricto cumplimiento de las rutinas) a hembras vacunas en el parto, inicio y plena producción de leche, tanto del primer como sucesivos partos, sobre variables relacionadas al comportamiento animal, respuestas fisiológicas y productivas que garanticen la atribución correcta del efecto del factor en medición.

Desde el punto de vista reproductivo, Cooke *et al.* (2009) observaron efectos de la aclimatación al manejo humano – animal sobre los niveles de P₄, inicio de la pubertad y preñez en novillas cruzadas Brahman. En el presente estudio, se analizó solamente la

actividad ovárica (estructuras y cantidad de P₄ circulante) hasta los 90 d postparto, posiblemente otras variables de mayor plazo de medición, tales como fertilidad y preñez, pudieran haber estado asociadas (Cooke *et al.*, 2009; Rueda, 2012), esto deberá ser precisado en futuros estudios. Si bien, el contraste entre el experimento con la cría presente en el ordeño y amamantamiento restringido postordeño contra aquel sin contacto con la cría durante la lactancia fue apreciable en cuanto a la precocidad del reinicio de la actividad ovárica de éste último, esto ha sido documentado ampliamente por la literatura (Williams y Griffith, 1995; Williams *et al.*, 1996; Yavas y Walton, 2000; Galina *et al.*, 2001; Fröberg *et al.*, 2008). Sin embargo, la hipótesis del CORT como supresor del eje gonadotrópico no fue posible verificarla (Mukasa-Mugerwa *et al.*, 1991; Viker *et al.*, 1993; Breen y Karsch, 2006; Breen *et al.*, 2008). Wagenmaker *et al.* (2009) reportan que el mecanismo por el cual el estrés psicosocial es inhibidor de la liberación, pulsos y amplitud, de GnRH es dependiente del receptor tipo II de glucocorticoides no de CORT.

Drescher *et al.* (2013) plantearon un modelo de la interacción vaca - cría, interacción humano - animal, modalidad de ordeño, cuya integración se observa en la Figura 19. Los resultados expuestos en el presente trabajo permiten ir alimentando cualitativamente dicho modelo y a futuro es necesario ir planteando ecuaciones que permitan cuantificar el impacto de éstos y otros efectos, en diversas condiciones de manejo, para la obtención de productos finales. La construcción de ecuaciones que permitan alimentar un modelo animal de temperamento, eyección láctea y reinicio de actividad ovárica en hembras vacunas tropicales de diferentes edades, en el cual se contemple el potencial cuantitativo mejora o empeoramiento del bienestar animal mediante la práctica de manejo gentil de la interacción humano animal y otras tantas estrategias de manejo según grupo racial sería de gran utilidad para estudios *in silico*. El modelo planteado muestra efectos en el animal y en el humano.

Hallazgos en relación a la modificación positiva de la conducta animal y a la disminución del estrés por manejo humano en vacas de primera lactancia, así como el beneficio de la práctica de manejo con contacto personalizado, gentil, racional y bioético fueron concluyentes con los experimentos desarrollados.

El manejo gentil preparto, acorde a paradigmas actuales del bienestar animal y en una fase sensible del animal, es cónsono con la tendencia internacional actual.

Los resultados de la investigación mostraron las alteraciones fisiológicas sobre dos hormonas altamente sensibles a las practicas de manejo y de amplio espectro de acción: cortisol y oxitocina. Los anterior permite esclarecer incógnitas en la ganadería tropical y venezolana y, partiendo de la visión holística, alimenta un constructo continuo de un modelo psico-neuro-endocrino-zootécnico para las relaciones ser humano - vaca – cría en estos sistemas de producción.

IX. CONCLUSIONES

El manejo gentil con contacto personalizado en la interacción humano – animal durante las seis últimas semanas de gestación de novillas F1 (Holstein x Brahman) manejadas a pastoreo afectó positivamente la conducta epimelética y et-epimelética.

En presencia o ausencia de la cría durante el ordeño, la vaca de primer parto disminuyó la reactividad durante la rutina de ordeño e incrementó la producción de leche vendible diaria y hasta 90 d de lactación por la mayor eyección láctea debido al manejo gentil con contacto personalizado en la interacción humano – animal.

No se evidenciaron cambios en el nivel basal de oxitocina, según el manejo gentil preparto, asociados a las mejoras en el temperamento y sociabilidad de la vaca y su cría.

La concentración de cortisol varió notablemente antes y después de la aplicación del manejo gentil y según el avance de la lactación de la vaca.

Los resultados sobre las variables relacionadas a la eyección láctea así como aquellos correspondientes a la variación química de los componentes lácteos de mayor interés (grasa, proteína y lactosa) fueron influenciados diferencialmente según manejo gentil preparto de la vaca; adicionalmente, los resultados en presencia o no de la cría durante el ordeño o la tecnología de ordeño empleada: manual vs. mecanizada, también modularon las respuestas.

La descarga de oxitocina durante el ordeño fue notable, en amplitud y persistencia, cuando la vaca fue sometida a manejo gentil mediante el cepillado corporal personalizado en la fase de novilla gestante.

En relación a las variables reproductivas no se evidenciaron mejoras a favor del manejo gentil preparto humano - animal.

X. RECOMENDACIONES

El uso de técnicas no invasivas deben privilegiar estudios de comportamiento; sin embargo, tal como en la cuantificación de oxitocina animales tropicales, requieren precisar tanto en vacas primíparas como adultas (lactancias sucesivas) y sus crías los perfiles de indicadores adicionales del estrés (hormonas y metabolitos) y/o con mayor frecuencia (durante el día, diaria y semanal) para lo cual podrían, bajo condiciones muy controladas, seleccionarse animales dentro del manejo general de rebaños sometidos a las prácticas antes citadas. El aplicar técnicas de imagenología e inmunohistoquímica cerebral son altamente deseables debido a la profundización de hallazgos de mecanismos neuroendocrinos implicados.

Establecer protocolos y manuales deontológicos para el mejoramiento de la producción nacional y tropical basada en el bienestar animal parece una necesidad derivada de este estudio.

La sensibilidad del equipo de estimación de los componentes lácteos permitió detectar variaciones e incluso elucubrar coherentemente las posibles causas biológicas que sustentan tales respuestas según los tratamientos. Estos resultados y el amplio uso que se le ha dado a los analizadores de leche por ultrasonografía en Europa pueden favorecer, previa calibración de las particularidades de especie, grupo racial y manejo (alimenticio, de ordeño) *in situ*, la difusión como herramienta de avance en la caracterización, monitoreo y variabilidad de los componentes lácteos para ser incorporados en índices de programas de selección, mejoramiento animal e impacto de prácticas de manejo.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmadzadeh, A.; Barnes, M. and R. Pearson. 1998. Effect of naloxone on serum luteinizing hormone concentration in annovulatory Holstein cows during the early postpartum period. *Domest. Anim. Endocrin.* 15: 177 – 181.
- Aleman, A.; Swart, M. and S. van Rijn. 2008. Brain imaging, genetics and emotion. *Biol. Psychol.* 79 (1): 58-69.
- Ayadi, M.; Caja, G.; Such, X.; Rovai, M. and E. Albanell. 2004. Effect of different milking intervals on the composition of cisternal and alveolar milk in dairy cows. *J. Dairy Res.* 71: 304–310
- Baeten, V.; Fernández, J.; Dehareng, F.; Sinnaeve, G. and P. Dardenne. 2010. Regulatory considerations applying vibrational spectroscopic methods for quality control. In (E. Li-Chan, J. Chalmers and P. Griffiths, eds.): *Applications of Vibrational Spectroscopy in food Science*. John Wiley. UK. p. 486-595.
- Bale, T.; Davis, A.; Auger, A.; Dorsa, D. and M. McCarthy. 2001. CNS region-specific oxytocin receptor expression: important in regulation of anxiety and sex behavior. *Journal of Neuroscience.* 21: 2546 – 2552.
- Bar Peled, U.; Lehrer, R.; Bruckental, I.; Kali, J.; Gacitua, H.; Maltz, E.; Tagari, H.; Robinson, B. and Y. Folman. 1998. Reproductive performance of dairy cows suckled or milked three or six times daily. In (AIEA, ed.): *Development of feed supplementation strategies for improving ruminant productivity on small holder farms in Latin America through the use of immunoassay techniques*. IAEA. Piracicaba, Brasil. pp. 25 -30.
- Bar Peled, U.; Maltz, E.; Bruckental, I.; Folman, Y.; Kali, J.; Gacitua, H. and L. Lehrer. 1995. Relationships between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79: 2726-2736

- Bealer, S.; Armstrong, W. and W. Crowley. 2010. Oxytocin release in magnocellular nuclei: neurochemical mediators and functional significance during gestation. *Am. J. Physiol.-Reg. I.* 299 (2): 452-458
- Becker, B. and J. Lobato. 1997. Effect of gentle handling on the reactivity of Zebu crossed calves to humans. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 53: 219 – 224.
- Bertenshaw, C. and P. Rowlinson. 2009. Exploring stock manager's perceptions of the human-animal relationship on dairy farms and its association with milk production. *Anthrozoos.* 22: 59 – 69.
- Bertenshaw, C.; Rowlinson, P.; Edge, H.; Douglas, S. and R. Shiel. 2008. The effect of different degrees of “positive” human-animal interaction during rearing on the welfare and subsequent production of commercial dairy heifers. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 114: 65 – 75.
- Bewley, J. and M. Schutz. 2008. Review: An Interdisciplinary Review of Body Condition Scoring for Dairy Cattle. *Profes Animal Sci.* 24:507-529.
- Botero, L. y M. Vertel. 2006. Modelo matemático aplicado a la curva de lactancia en ganado vacuno doble propósito. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España.* 11: 759-765.
- Braastad, B. 1998. Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed mammals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 61: 159–180.
- Brandão, M.; Zanoveli, J.; Ruiz-Martinez, R.; Oliveira, L. and J. Landeira-Fernandez. 2008. Review Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behav. Brain Res.* 188. 1–13
- Breen, K. and F. Karsch. 2006. New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. *Front. Neuroendocrin.* 27: 233-245.
- Breen, K.; Davis, T.; Doro, L.; Nett, T.; Oakley, A.; Padmanabhan, V.; Rispoli, L.; Wagenmaker, E. and F. Karsch. 2008. Insight into the neuroendocrine site and cellular

mechanism by which cortisol suppresses pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 149 (2):767-73

Brook, Ch. and N. Marshall. 1999. *Essentials Endocrinology*. 3th. Edition. Blackwell Science. London, England. pp. 1 – 176.

Broom, D and A. Fraser. 2007. *Domestic Animal Behaviour and Welfare*. 4th. Ed. D. Broom and A. Fraser, eds. CABI. Cambridge, UK. 438 p.

Brosschot, J.; Gerin, W. and J. Thayer. 2006. The perseverative cognition hypothesis: A review of worry, prolonged stress-related physiological activation, and health. *J. Psychosom. Res.* 60 (2): 113–124

Broster, W. and V. Broster. 1998. Body score of dairy cows. Review Article. *J. Dairy Res.* 65: 155 – 173.

Bruckmaier, R. 2005. Normal and disturbed milk ejection in dairy cows. *Domes. Anim. Endocrin.* 29: 268 – 273.

Bruckmaier, R. and M. Hilger. 2001. Milk ejection in dairy cows at different degrees of udder filling. *J. Dairy Res.* 68: 369 -376.

Bruckmaier, R. and O. Wellnitz. 2014. Induction of milk ejection and milk removal in different production systems. 86 (13): 15-20

Bruckmaier, R.; Schams, D. and J. Blum. 1994. Continuously elevated concentrations of oxytocin during milking are necessary for complete milk removal in dairy cows. *J. Dairy Res.* 61: 323 – 334.

Burdick, N.; Carroll, J.; Randel, R.; Willard, S.; Vann, R.; Chase, C.; Lawhon, S.; Hulbert, L. and T. Welsh. 2011. Influence of temperament and transportation on physiological and endocrinological parameters in bulls. *Livest. Sci.* 139 (3): 213-221.

Calzada, P.; Morales, E.; Quiroz, G.; Salmerón, F.; García, C. and J. Hernández. 2002. Valores hematológicos en vacas de raza Holstein-Friesian seropositivas a *Neospora*

- caninum* de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México. Veterinaria México. UNAM. Distrito Federal, México. 33 (2): 119-124
- Campbell, A. 2010. Oxytocin and Human Social Behavior. Pers. Soc. Psychol. Rev. 14 (3): 281-295.
- Camus, E. 1983. Diagnostic de la trypanosomes bovine sur le terrain par la méthode de centrifugation hématocrite. Rev. Sci. Tech. OIE. 2 (3): 751 – 769.
- Carter, C. and M. Altemus. 1997. Integrative functions of lactation hormones in social behavior and stress management. Ann. NY. Acad. Sci. 15: 164 – 174.
- Cavagnari, B. 2012. Regulación de la expresión génica: cómo operan los mecanismos epigenéticos. Arch. Argent. Pediatr. 110 (2):132-136
- Ceballos, M. 2014. Efeito de diferentes frequências de manejos no temperamento de bovinos de corte. Dissertação Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Júlio Mesquita Filho (UNESP). Campus Jaboticabal. São Paulo, Brasil. pp. 56
- Charil, A.; Laplante, D.; Vaillancourt, C. and S. King. 2010. Review, prenatal stress and brain development. Brain Res. Rev. 65 (1): 56 – 79.
- Chrousos, G. 2009. Stress and disorders of the stress system. Nat. Rev. Endocrin. 5: 374 - 381.
- Churchland, P. and P. Winkielman. 2012. Review: Modulating social behavior with oxytocin: How does it work? What does it mean?. Horm. Behav. 61: 392–399.
- Combellas, J. and M. Tesorero. 2003. Cow-calf relationship during milking and its effect on milk yield and calf live weight gain. LRRD. 15: (3) <http://www.lrrd.org/lrrd15/3/comb153.htm>
- Connor, H.; Houghton, P.; Lemenager, R.; Malven, P.; Parfet, J. and G. Moss. 1990. Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins,

gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows, *Domest. Anim. Endocrin.* 7: 403 – 411.

Cooke, R.; Arthington, J.; Austin, B. and J. Yelich. 2009. Effects of acclimation to handling on performance, reproductive, and physiological responses of Brahman-crossbred heifers. *J. Anim. Sci.* 87: 3403 – 3412.

Coulon, M.; Wellman, C.; Marjara, I.; Janczak, A. and A. Zanella. 2013. Early adverse experience alters dendritic spine density and gene expression in prefrontal cortex and hippocampus in lambs. *Psychoneuroendocrinology*. 38 (7):1112-1121.

Coulon, M.; Hild, S.; Schroeder, A.; Janczak, A. and A. Zanella. 2011. Gentle vs. aversive handling of pregnant ewes: II. Physiology and behavior of the lambs. *Physiol. Behav.* 103 (5):575-584.

COVENIN 798, 1994. Norma Venezolana. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. FONDONORMA. Caracas, Venezuela. pp. 1 – 3.

Creswell, K.; Aidan, G.; Wright, A.; Wendy, M.; Troxel, W.; Ferrell, R.; Janine D.; Flory, J. and S. Manuck. 2014. OXTR polymorphism predicts social relationships through its effects on social temperament. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 4: nsu132v2-nsu132

Cronjé, P. 2000. Nutrient-gene interaction: future potential and applications. In (P. Cronjé and E. Boomker, eds.). *Ruminant Physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction*. CABI. Department of Animal and Wildlife Science, University of Pretoria, South Africa. 409 – 422.

Crowe, A.; Goulding, D.; Baguisi, A.; Boland, P. and J. Roche. 1993. Induced ovulation of the first postpartum dominant follicle in beef suckled cows using a GnRH analogue. *J. Reprod. Fertil.* 99: 551-555.

Curley, K.; Paschal, J.; Welsh, Th. and R. Randel. 2006. Technical note: Exit velocity as a measure of cattle temperament is repeatable and associated with serum concentration of cortisol in Brahman bull. *J. Anim. Sci.* 84: 3100 – 3103.

- D'Enjoy, D'E.; Cabrera, P.; Vivas, I.; Díaz, T. 2012. Dinámica Folicular Ovárica Durante el Ciclo Estral en Vacas Brahman. *Rev. Fac. Cienc. Vet. UCV*.53 (1): 39 -47
- Damasio, A. 2003. Feelings of Emotion and the Self. *The Self: From soul to brain*. Ann. NY. Acad. Sci. 1001: 253–261
- Das, S.; Forsberg, M. and H. Wikorsson. 1999. Influence of restricted suckling and level of feed supplementation on postpartum reproductive performance of Zebu and crossbred cattle in the semi-arid tropics. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 40: 57 – 67.
- De Oliveira, D. 2013. Potenciais efeitos da estimulação tátil no comportamento e desenvolvimento de cordeiros e leitões. Teses Doutoral em Zootecnia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Júlio Mesquita Filho (UNESP). Campus Jaboticabal. São Paulo, Brasil. p. 91.
- De Rensis, F.; Cosgrove, J.; Willis, H.; Hofacker, S. and G. Foxcroft. 1999. Ontogeny of the opioidergic regulation of LH and prolactin secretion in lactating sows. II. Interaction between suckling and morphine administration. *J. Reprod. Fertil.* 116: 243 – 251.
- De Vries, M. and R. Veerkamp. 2000. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *J Dairy Sci.* 83 (1): 62 – 69.
- Dedovic, K.; D'Aguiar, C. and J. Pruessner. 2009. What stress does to your brain: a review of neuroimaging studies. *Can. J. Psychiat.* 54 (1):6-15
- Díaz, T.; Schmitt, E.; de la Sota, R.; Thatcher, M.; and W. Thatcher W. 1998. Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *J Anim Sci.* 76:1929-1936
- Di Marco, O.; Barcellos, J. e E. Da Costa. 2006. Crescimento de bovinos de corte. Porto Alegre: Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Núcleo de Estudos em Sistemas de Produção de Bovinos de corte e Cadeia Produtiva. Brasil. P. 248.
- Domínguez, C.; Garmendia, J. y N. Martínez. 2007. Influencia de la época de parto, la condición corporal y la suplementación sobre la actividad post-parto de vacas mestizas

bajo pastoreo mixto en el norte del Estado Guárico. Rev. Fac. Cienc Vet. UCV. 48: 37 – 50.

Domínguez, C.; Martínez, N. y O. Colmenares. 2004. Características reproductivas de rebaños bovinos doble propósito en los llanos centrales de Venezuela Zoot. Trop. 22 (2):133-145.

Domínguez, C.; Ruiz, A.; Pérez, R.; Martínez, N.; Drescher, K.; Pinto-Santini, L.; Araneda, R. 2008. Efecto de la condición corporal al parto y el nivel de alimentación sobre la involución uterina, actividad ovárica, preñez y la expresión hipotalámica y ovárica de los receptores de leptina en vacas doble propósito. Rev. Fac. Cienc Vet. UCV. 49 (1): 23 – 36.

Drescher, K. 2000. Estudio del sistema de vacunos de doble propósito en el Municipio Urdaneta del Estado Aragua: Caracterización, Definición de las modalidades productivas y evaluación del efecto de arreglos alimenticios en vacas de producción de leche. Tesis de Maestría. Facultades de Agronomía y Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela, Maracay. Venezuela. pp. 97.

Drescher, K. 2003. Efecto de dos modalidades de ordeño y oxitocina sobre la producción y composición de la leche en vacas de doble propósito en el trópico. Revista ALCANCE. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 67: 1-110.

Drescher, K.; Martínez, N.; Perozo, D.; Saddy, J. and W. Uzcátegui. 2006. Is the calf presence at milking a stimulating stressing factor in crossbred cattle in the tropics? Revista de la Faculdade de Ciências Veterinárias. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 4: 39.

Drescher, K.; Roa, N.; Ambrosio, L.; Toledo, L. y M. Paranhos Da Costa 2013. Modelo conceptual del efecto de la interacción humano-animal sobre la reactividad, producción de leche y reinicio de la actividad ovárica de la vaca primípara en el trópico. En: XI Congreso Latinoamericano de Dinámica de Sistemas. Méjico. v. I. p. 656-659

- Drescher, K.; Roa, N.; D'Enjoy, D'E. y J. Avellaneda. 2014. Evaluación ultrasonográfica postparto de vacas primíparas *Bos taurus x Bos indicus* (F1) en el trópico. Rev. Cient. Fac. Cien. V. Universidad del Zulia. Venezuela. 24: 295 – 304.
- Drescher, K.; Saddy, J. y W. Uzcátegui. 2009. Evaluación de la cantidad de leche vendible y total bajo diferentes modalidades de amamantamiento restringido en vacas doble propósito. Zoot. Trop. 27: 39-47.
- DSI. 2008. Instruction for use DS-EIA-Steroid-progesterone enzyme immunoassay for the quantitative determination of progesterone concentration. DSI®. p. 1 – 12.
- Everitt, C. and Phillips, D. 1971. Calf rearing by multiple suckling and the effects on lactation performance of the cow. Proc. NZ Soc. Anim. Produc. 31: 22 – 40.
- FAO/AIEA. 1999. Animal Production and Health. Joint FAO/AIEA Programme. Viena, Austria. pp. 17-23.
- Fattet, I. y G. Jaurena. 1988. El Estado Corporal de las vacas lecheras. Hemisferio Sur. Argentina. s/p.
- FAWC, 2009. Farm Animal Welfare Council in Great Britain: Past, Present and Future, Farm Animal Welfare Council. <http://www.fawc.org.uk>
- Feldman, R.; Gordon, I.; Influx, M.; Gutbir, T. and R. Ebstein. 2013. Parental oxytocin and early caregiving jointly shape children's oxytocin response and social reciprocity. Neuropsychopharmacol. 38: 1154–1162
- Fell, L.; Colditz, I.; Walker, K. and D. Watson. 1999. Associations between temperament, performance and immune function in cattle entering a commercial feedlot. Aust. J. Exp. Agr. 39 (7): 795 – 802.
- Fox, M. 1966. Review Article: Neurobehavioral ontogeny. A synthesis of ethological and neurophysiological concepts. Brain Res. 2: 3 – 20.
- Fröberg, S.; Gatte, E.; Svennesten-Sjaunja, K.; Olsson, I.; Berg, C.; Orihuela, A.; Galina, C.; García, B. and L. Lidfors. 2008. Effect of suckling (“restricted suckling”) on dairy

cows' udder health and milk let-down and their calves' weight gain, feed intake and behavior. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 113: 1 – 14.

Fukudo, S. and J. Suzuki. 1987. Colonic motility, autonomic function, and gastrointestinal hormones under psychological stress on irritable bowel syndrome. *Tohoku J. Exp. Med.* 151: 373-385

Galina, C.; Rubio, I.; Basurto, H. and A. Orihuela. 2001. Consequences of different suckling systems for reproductive activity and productivity of cattle in tropical conditions. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 72: 255 – 262.

Gallo, L.; Carnier, P.; Cassandro, M.; Mantovani, R.; Bailoni, L.; Contiero, B. and G. Bittante. 1996. Change in body condition score of Holstein cows as affected by parity and mature equivalent milk yield. *J. Dairy Sci.* 79 (6): 1009–1015

Garcia-Cairasco, N. 1989. Considerações sobre as relações neurais e etológicas na avaliação das alterações do controle motor II. Modelos experimentais. *Arq. Neura Psiq. São Paulo, Brasil.* 47: 172 – 181.

García-Muñiz, J.; Martínez-González, E.; Núñez-Domínguez, R.; Ramírez-Valverde, R.; López-Ordaz, R. y A. Ruiz-Flores. 2008. Comparación de ecuaciones para ajustar curvas de lactancia en bovinos. *Rev. Cient. Fac. Cien. V. Universidad del Zulia.* 18 (2): 160 – 169.

Gazal, O; Guzman-Vega, G. and G. Williams. 1999. Effects of time of suckling during the solar day on duration of the postpartum anovulatory interval in Brahman x Hereford (F1) cows. *J Anim Sci.* 77 (5): 1044-1047.

Giménez, Z. 1999. La etología aplicada a la ganadería. *Márgenes Agropecuarios. Argentina.* 14: 30-31.

Gimpl, G. and F. Fahrenholz. 2001. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiol Rev.* 81: 629-683

- Gómez, J. y F. Colmenares. 1994. La causación del comportamiento: modelos clásicos y causas externas. En (Cáceres, ed.): *Etología. Introducción a la Ciencia del Comportamiento*. Universidad de Extremadura. España. p. 41 – 62.
- Gómez, S.; Torres, V.; García, Y. y J. Navarro. 2012. Procedimientos estadísticos más utilizados en el análisis de medidas repetidas en el tiempo en el sector agropecuario. *Rev. Cub. Cien. Agríc.* 46 (1): 1 – 7.
- González-Méndez, T. 2009. Psiconeuroinmunología, emociones y enfermedad. *MedULA* 18: 155-164.
- Grandin, T. 1993. Behavioral agitation during handling of cattle is persistent over time. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 36 (1): 1–9
- Grandin, T. 1997. Assessment of Stress During Handling and Transport *J. Anim. Sci.* 75: 249-257
- Grandin, T. 2010. The Importance of Measurement to Improve the Welfare of Livestock, Poultry and Fish. In: (T. Grandin, ed.). *Improving Animal Welfare: A Practical Approach*. CABI. Oxfordshire, UK. pp. 1-20.
- Grandin, T. and M. Deesing. 1998. Behavioral genetics and animal science. In (T. Grandin and M. Deesing, eds.): *Genetics and Behavior of Domestic Animals*. Academic Press. California, EEUU. p. 1- 30.
- Greene, C.; Braet, W.; Johnson, K. and M. Bellgrove. 2008. Imaging the genetics of executive function. *Biol. Psychol.* 30–42.
- Griffith, M. and G. Williams. 1996. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal selectivity, and lactational performance of beef cows. *Biol. Reprod.* 54: 761-786. 1996.
- Gutiérrez-Gil, B.; Ball, N.; Burton, D.; Haskell, M.; Williams, J. and P. Wiener. 2008. Identification of quantitative trait loci affecting cattle temperament. *J. Hered.* 99: 629 – 638.

- Halloway, D. and D. Johnston. 2003. Evaluation of flight time and crush score as measures of temperament in Angus cattle. P. Adv. Anim. Breeding Genet. 15: 261- 264.
- Harrison, R. 1964. Animal Machine: the new factory farming industry. CABI. UK. pp. 186.
- Hemsworth, P. and J. Barnett. 2000. Human–Animal Interactions and Animal Stress. In (G. Moberg and J. Mench, eds.): The Biology of Animal Stress, Basic Principles and implications for Animal Welfare. CABI. UK. pp. 309 – 336.
- Hemsworth, P.; Barnett, J.; Tilbrook, A. and C. Hansen. 1989. The effects of handling by humans at calving and during milking on the behaviour and milk cortisol concentrations of primiparous dairy cows. Appl. Anim. Behav. Sci. 22: 313–326
- Hemsworth, P.; Coleman, G.; Barnett, J. and S. Borg. 2000. Relationships between human-animal interactions and productivity of commercial dairy cows. J. Anim. Sci. 78: 2821-2831.
- Hemsworth, P.; Coleman, G.; Barnett, J.; Borg, S. and S. Dowling. 2002. The effects of cognitive behavioral intervention on the attitude and behavior of stock persons and the behavior and productivity of commercial dairy cows. J. Anim. Sci. 80: 68 -78.
- Hild, S.; Coulon, M.; Schroeer, A.; Andersen, I. and A. Zanella. 2011. Gentle vs. aversive handling of pregnant ewes: I. Maternal cortisol and behaviour. Physiol. Behav. 104: 384 -391
- Hoffman, D.; Stevenson, J. and J. Minton. 1996a. Follicular dynamics during postpartum anestrous and the first estrous cycle in suckled or non-suckled Brahman (*Bos indicus*) cows. Anim. Reprod. Sci. 63: 127 – 136.
- Hoffman, D.; Stevenson, J. and J. Minton. 1996b. Restricting calf presence without suckling compared with weaning prolongs postpartum annovulation in beef cattle. J Anim. Sci. 74: 190 – 198.
- Hoppe, S.; Brandt, H.; König, S.; Erhardt, G. and M. Gaulty. 2010. Temperament traits of beef calves measured under field conditions and their relationships to performance. J. Anim. Sci. 88:1982-1989.

- Hovatta, I. and C. Barlow. 2008. Molecular genetics of anxiety in mice and men. *Ann. Med.* 40: 92–109.
- Jacobson, R. 1998. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 7: 507-526
- Jensen, M. and R. Kyhn. 2000. Play behaviour in group-housed dairy calves, the effect of space allowance. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 67: 35 - 46
- Jensen, P. 2002. *The Ethology of Domestic Animals: an introductory text.* P. Jensen, ed. CABI. UK. pp. 217.
- Jensen, P. 2006. Domestication - from behaviour to genes and back again. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 97: 3–15
- Johansson, B. 2000. Effect of milking and feeding routines on milk production, hormone release and behavior in dairy cattle. Doctoral Thesis. Swedish University of Agriculture Science. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Agraria.* 211. Sueciae. pp. 47.
- Kabuga, J. and P. Appiah. 1992. Research Article: A note on the ease of handling and flight distance of *Bos indicus*, *Bos taurus* and their crossbreds. *Anim. Prod.* 54 (02): 309-311.
- Kadarmideen, H. and Ll. Janss. 2007. Population and systems genetics analyses of cortisol in pigs divergently selected for stress. *Physiol. Genomics.* 29: 57 – 65.
- Kamimura, S.; Sameshima, H.; Enomoto, S. and K. Hamana. 1994. Turnover of ovulatory and non-ovulatory dominant follicles in postpartum Japanese Black cows. *J. Reprod. Dev.* 40: 171 -176.
- Kemelmajer, A. 2009. La categoría jurídica “sujeto/objeto” y su insuficiencia respecto de los animales. Especial referencia a los animales usados en laboratorios. *Revista de Bioética y Derecho.* Argentina. Universidad de Cuyo. Argentina. 17: 2 -9.
- Kendrick, K. 2013. Oxytocin regulation of sheep social and maternal behavior. In (E. Choleris, D. Pfaff and M. Kavalliers, eds): *Oxytocin, Vasopressin and related Peptides*

in the Regulation of Behavior. Cambridge University Press. New York, USA. pp.185 – 192

Kendrick, K.; Keverne, E.; Hinton, M. and J. Goode. 1991. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of oxytocin and vasopressin during parturition and vaginocervical stimulation in the sheep. *Brain Res. Bull.* 26:803-807.

Klinghammer, E. and M. Fox. 1971. Ethology and its Place in Animal Science. *J. Anim. Sci.* 32:1278-1283.

Kofman, O. 2002. Review, the role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci. Biobehav. R.* 26: 457–474

Kondo, S. and J. Hurnik. 1990. Stabilization of social hierarchy in dairy cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 27: 287 – 297.

Kraetzl, W.; Tancin, V.; Schams, D. and R. Bruckmaier. 2001. The inhibition of oxytocin release in response to first suckling of dairy cows in the middle of lactation without suckling experiences is not opioid dependent. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 72: 247 - 253.

Lahitte, H.; Ferrari, H. y L. Lázaro. 2002. Sobre el etograma. 1: Del etograma como lenguaje al lenguaje de los etogramas. *Revista de Etología. Universidade de São Paulo. Brasil.* 4: 129-141.

Lahitte, H.; Ferrari, H. y L. Lázaro. 2003. Sobre el Etograma, 2: Aspectos metodológicos de la naturaleza semiótica del Etograma. *Revista de Etología. Universidade de São Paulo. Brasil.* 5: 29 – 39.

Lamb, G.; Lynch, J.; Grieger, D.; Minton, J. and J. Stevenson. 1997. *Ad libitum* suckling by an unrelated calf in the presence or absence of an own on calf prolongs postpartum annovulation. *J. Anim. Sci.* 75: 2762 -2769.

Landaeta-Hernández, A.; Chenoweth, P.; Randles, R.; Littell, R.; Rae, O. and Ch. Chase. 2005. Identifying the social dominance order in a mixed breed herd: a practical methodology. *Rev. Cient-Fac. Cien. V. Universidad del Zulia. Venezuela.* 15 (2): 148 – 154.

- Landaeta-Hernández, A.; Giangreco, M.; Meléndez, P.; Bartolomé, J.; Bennet, F.; Rae, D.; Hernández, J. and L. Archbald. 2004. Effect of biostimulation on uterine involution, early ovarian activity and first postpartum estrous cycle in beef cows. *Theriogenology*. 61: pp 1521-1532.
- Landaeta-Hernández, A.; Meléndez, P.; Bartolomé, J.; Rae, D. and L. Archbald. 2013. Effect of biostimulation and social organization on the interval from calving to resumption of ovarian cyclicity in postpartum Angus cows. *Theriogenology*. 79: 1041-1044.
- Landaeta-Hernández, A.; Meléndez, P.; Bartolomé, J.; Rae, O.; Archbald, L. 2008. Efecto de la exposición al toro sobre el desempeño reproductivo en el postparto temprano de vacas Angus amamantando. *Rev. Cient-Fac. Cien. V. Universidad del Zulia. Venezuela*. 18: 682-691.
- Laureano, M.; Bignardi, A.; El Faro, L.; Cardoso, V. and L. Albuquerque. 2012. Genetic parameters for first lactation test-day milk flow in Holstein cows. *J. Anim. Breed. Genet.* 6 (1): 31 -35.
- Lee, H.; Macbeth, A.; Pagani, J. and W. Young. 2009. Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog. Neurobiol.* 88:127-151.
- Liberzon, I. and E. Young. 1997. Effects of stress and glucocorticoids on CNS oxytocin receptor binding. *Psychoneuroendocrino.* 22 (6): 411 - 422
- LIDA. 1977. Liga Internacional por los Derechos del Animal. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, Ciencia y Cultura. www.portal.unesco.org
- Lim, M. and L. Young. 2006. Neuropeptidergic regulation of affiliative behaviour and social bonding in animals. *Philosophy Transactions of the Royal Society: Biol. Sci.* 361 (1476): 2187 – 2198
- Lollivier, V.; Guinard, J.; Ollivier, M. and P. Marnet. 2002. Oxytocin and milk removal: two important sources of variation in milk production and milk quality during and between milking. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 173 – 186.

- Lucy, M.; Savio, J., Badinga, L., De La Sota, R. and W. Thatcher. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 3615-3626.
- Lucy, M.; Staples, C.; Michel, F. and W. Thatcher. 1991. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74: 473 – 482.
- Magolski, J. 2012. Genetic markers, cattle disposition, and stress relative to variations in beef tenderness. Doctor of Philosophy Thesis. North Dakota State University of Agriculture and Applied Science. North Dakota, EEUU. 72p.
- Marques de Sá, J. 2007. Survival Analysis. In: Applied Statistics Using SPSS. STATISTIC. MATLAB. Berlin Heidelberg. New York, EEUU. pp. 353-374.
- Martínez, N.; Escobar, A.; López, S.; Combellas, J. and L. Gabaldón. 1998a. Effect of strategic feed supplementation on productive and reproductive performance in dual purpose cows. In (AIEA, ed.): Development of Feed Supplementation Strategic for Improving Ruminant Productivity on Small Holder Farms in Latin America through the Use of Immunoassay Techniques. IAEA. Piracicaba, Brasil. pp. 135-144.
- Martínez, N.; Herrera, P.; Birbe, B. and C. Domínguez. 1998b. Relación entre la condición corporal y la respuesta reproductiva de hembras bovinas de doble propósito. En (C. González-Stagnaro, N. Madrid-Bury y E. Soto Belloso, eds.). Mejora de la Ganadería Mestiza de Doble Propósito. LUZ, CONDES, GIRARZ. pp. 398 – 412.
- Martini, M. 2008. Flexibilidad Cognitiva y Actividad Autonómica. Tesis de Maestría en Psic-Neuro-Immuno-Endocrinología. Universidad de Favaloro. Argentina. 57p.
- McNeilly, A. 1997. Lactation and fertility. *J. Mammary Gland Biol.* 2: 291 – 298
- Menzies, K.; Lefèvre, C.; Macmillan, K. and K. Nicholas. 2009. Insulin regulates milk protein synthesis at multiple levels in the bovine mammary gland. *Func. & Integrat. Genom.* 9 (2): 197 – 217
- Morales, G.; Pino, L.; Sandoval, E.; Florio, J. y D. Jiménez. 2006. Niveles de infestación parasitaria, condición corporal y valores de hematocrito en bovinos resistentes,

resilientes y acumuladores de parásitos en un rebaño Criollo Río Limón. *Zoot. Trop.* 24 (3): 333-346

Morán, J.; Arranz, J.; San Primitivo, F. 2003. Análisis de la variabilidad del gen de la oxitocina ovina en la raza churra. ITEA. *Producción Animal*. España. 24: 444-446.

Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; Beerda, B.; Guémené, D.; Malmkvist, J.; Manteca, X.; Manteuffel, G.; Prunet, P.; van Reenen, C.; Richard, S. and I. Veissier. 2007. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal functions as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol & Behav.* 92: 317–339.

MPPCyTII. 2008. Código de Bioética y Bioseguridad. En: Normas para la utilización de animales en investigación: en experimentación en el laboratorio, obtenidos en sus hábitats, estudios de sus patologías y de su comportamiento natural. 3ra. Edición. Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. p. 33 -35.

Mukasa-Mugerwa, E.; Tegegne, A. and R. Franceschini. 1991. Influence of suckling and continuous cow-calf association on the resumption of post-partum ovarian function in *Bos indicus* cows monitored by plasma progesterone profiles. *Reprod. Nutr. Dev.* 31 (3): 241-247

Narváez, E. 2005. Comportamiento de vacas de doble propósito durante el ordeño y amamantamiento. Tesis Pregrado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. pp. 72.

Narváez, E.; Drescher, K.; Martínez, N. and D. Perozo. 2006a. Calf-cow relation. 2. Milking times during routine milking in crossbred cows. *Revista de lá Faculdade de Ciências Veterinárias*. Universidade de São Paulo. Brasil. 4: 62.

Narváez, E.; Pinto-Santini, L.; Drescher, K.; Martínez, N. and D. Perozo. 2006b. Calf-cow relation. 1. Behaviour during milking machine and suckling in crossbred cows. *Revista de lá Faculdade de Ciências Veterinárias*. Universidad de Sao Paulo. Brasil. 4: 61.

- Nätt, D.; Lindqvist, N.; Stranneheim, H.; Lundeberg, J.; Torjesen, P. and P. Jensen. 2009. Inheritance of Acquired Behaviour Adaptations and Brain Gene Expression in Chickens. PLoS ONE. 4: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006405>
- Negrão, J. and P. Marnet. 2003. Cortisol, adrenalin, noradrenalin and oxytocin release and milk yield during first milking in primiparous ewes. *Small Ruminant Res.* 47: 69–75
- Negrão, J. and P. Marnet. 2006. Milk yield, residual milk, oxytocin and cortisol release during machine milking in Gir, Gir x Holstein and Holstein cows. *Reprod. Nutr. Dev.* 46 : 77-85.
- Neumann, I.; Krömer, S. and O. Bosch. 2005. Effects of psycho-social stress during pregnancy on neuroendocrine and behavioural parameters in lactation depend on the genetically determined stress vulnerability. *Psychoneuroendocrino.* 30: 791–806
- Nissen, E.; Gustavsson, P.; Widström, A. and K. Uvnäs-Moberg. 1998. Oxytocin, prolactin, milk production and their relationship with personality traits in women after vaginal delivery or Cesarean section. *J. Psychosom. Obst. Gyn.* 19: 49-58
- Nowak, R.; Porter, R.; Frédéric, L.; Orgeur, P. and B. Schaal. 2000. Role of mother-young interactions in the survival of offspring in domestic mammals. *Rev. Reprod.* 5: 153 – 163.
- Ordóñez, J. 1998. Competitividad del doble propósito en el trópico latinoamericano. En: mejora de la Ganadería Mestiza de Doble Propósito. Eds. C. González-Stagnaro, N. Madrid-Bury y E. Soto Belloso. Mejora de la ganadería mestiza de Doble Propósito. Astro Data S.A., Maracaibo. pp. 627-641.
- Osawa, T.; Nakao, T.; Moriyoshi, M. and K. Nakada. 1998. Plasma beta-endorphin around parturition and its relationship to cortisol level and resumption of pituitary and ovarian functions in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 52: 27 – 38.
- Palgi, S.; Klein, E. and S. Shamay-Tsoory. 2015. Intranasal administration of oxytocin increases compassion toward women. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 10 (3): 311-317.

- Paranhos da Costa, M.; Albuquerque, L.; Eler J. and J. Silva. 2006. Suckling behaviour of Nelore, Gir and Caracu calves and their crosses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 101:276-287.
- Paranhos da Costa, M.; Schmidek, A. and L. Toledo. 2008. Mother–Offspring Interactions in Zebu Cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (2): 213–216.
- Parker, K.; Kenna, H.; Zeitzer, J.; Keller, J.; Blasey, C.; Amico, J. and A. Schatzberg. 2010. Preliminary evidence that plasma oxytocin levels are elevated in major depression. *Psychiatry Res* 178(2):359-62
- Peláez, F. 1986. Análisis etológico del comportamiento: un ejemplo aplicado al estudio de primates. *Estudios de Psicología. España.* 26: 93 – 105.
- Peninisi, E. 2005. A genomic view of animal behaviour. *Sci.* 307: 30 – 32.
- Pérez, M.; Escobar, S.; Drescher, K.; Martínez, N.; Perozo, D. and M. Tesorero. 2006. Calf - cow relation. 3. Performance during milking and suckling in crossbreed cows. *Revista de la Faculdade de Ciências Veterinárias. Universidade de São Paulo. Brasil.* 4: 63
- Pérez, P.; Sánchez, C. y J. Gallegos. 2001. Anestro postparto y alternativas de manejo del amamantamiento en vacas de doble propósito en trópico. *Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim. INIA. España.* 16: 258 – 270.
- Petrovic, P.; Kalisch, R.; Singer, T. and R. Dolan. 2008. Oxytocin attenuates affective evaluations of conditioned faces and amygdale activity. *J. Neurosci.* 28: 6607-6615.
- Phocas, F.; Boivin, X.; Sapa, J.; Trillat, G.; Boissy, A. and P. Le Neindre. 2006. Genetic correlations between temperament and breeding traits in Limousin heifers. *Anim. Sci.* 82 (6): 805-811
- Piña, Z.; Combellas, J.; Tesorero, M.; Drescher, K. y L. Gabaldón. 2001. Influence of early weaning on yield and fat content of milk from dual purpose cows. *Livest. Res. Rural Develop.* 3 (2): 1 – 5
- Pinto-Santini, L.; Drescher, K.; Ruiz, A.; Pérez, R.; Domínguez, C.; Benezra, M. and N. Martínez. 2009. Reinicio de la actividad ovárica asociado a cambios en los niveles de

glucosa e insulina, debido a la condición corporal al parto y el nivel de alimentación, en vacas doble propósito durante la lactancia temprana. *Interciencia*. 34: 350 – 355.

Pinto-Santini, L.; Martínez, N.; Drescher, K.; Machado, I.; Domínguez, C. y A. Ruiz. 2011. Relación entre balance energético, concentración de metabolitos sanguíneos y expresión hipotalámica del receptor Tipo 1 de Orexina y neuropéptido Y en vacas mestizas durante el postparto. *Rev. Fac. Cienc. Vet. UCV*. 52 (1): 25 -37.

Pinto-Santini, L.; Martínez, N.; Perozo, D.; Drescher, K.; Rossini, M.; Ruiz, A. y C. Domínguez. 2014. Uso de ensilaje de grano húmedo y/o alimento concentrado en la suplementación de vacas mestizas en los Llanos Centrales venezolanos. *Livest. Res. Rural Develop*. 26 (12):

Preston, T. 1976. Estrategias para la Producción de Bovinos en los Trópicos. *Rev. Mund. Zoot*. 21: 11-17.

Pulido, A.; Zarco, L.; Galina, C.; Murcia, C.; Flores, G. and E. Posadas. 1991. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 35:965-975.

Reinhardt, V. and A. Reinhardt. 1975. Dynamics of Social Hierarchy in a Dairy Herd. *Z. Tierpsychol*. 38: 315–323

Roa, N.; Linares, T.; Barrios, D.; Ramírez, M. y R. Tamasaukas. 1997b. Determinación de Progesterona plasmática por el método de ELISA en receptoras de embriones Bovinos. *Rev. Cient. Fac. Cien. V. Universidad del Zulia*. 7 (2): 133 – 138.

Roa, N.; Linares, T.; Díaz, T. y F. Chacín. 2006. Ondas foliculares ováricas en vacas Brahman y Mestizas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) ubicadas en los llanos centrales venezolanos. *Zoot. Trop*. 24 (3): 297- 306

Roa, N.; Linares, T.; Ramírez, M. y R. Tamasaukas. 1997a. Comparación de la Técnica de ELISA vs. RIA en la determinación de Progesterona plasmática sanguínea de Bovinos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*. 1: 412-414.

- Rodgers, R. and H. Irving-Rodgers. 2010. Review: Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reprod.* 139: 309–318
- Ross, H. and L. Young. 2009. Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Front. Neuroendocrin.* 30 (4): 534–547
- Rueda, P. 2012. Qualidade de manejo e temperamento de bovinos: efeitos na eficiência reprodutiva de fêmeas submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. Tese Doutorado em Zootecnia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP. Jaboticabal, Brasil. 87p.
- Ruiz, A.; Domínguez, C.; Martínez, N.; Pinto-Santini, L.; Drescher, K. Pérez, R., Rojas, J. y R. Araneda. 2010. Efecto de la condición corporal y nivel de alimentación sobre la actividad ovárica, involución uterina y expresión del IGF-1 en vacas mestizas durante el posparto. *Interciencia.* 35 (10): 752 – 758.
- Ruiz-Cortes, Z. and M. Olivera-Ángel. 1999. Ovarian follicular dynamics in suckled zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. *Anim. Reprod. Sci.* 54: 211 – 220.
- Rushen, J.; De Passillé, A. and L. Munksgaard. 1999. Fear of people by cows and effects on milk yield, behaviour, and heart rate at milking. *J. Dairy Sci.* 82:720–727
- Saco, Y.; Fina, M.; Giménez, M.; Pato, R.; Piedrafita, J. and A. Bassols. 2008. Evaluation of serum cortisol, metabolic parameters, acute phase proteins and faecal corticosterone as indicators of stress in cows. *Vet. J.* 177 (3): 439–441
- Samuelsson, B. 1996. Effect of milking and feeding routines on milk production, hormone release and behavior in dairy cattle. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultura Science. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Agraria. Sweden.* 6. pp. 52.
- Sánchez-Rodríguez, H.; Vann, R.; Youngblood, R.; Baravikmunsell, E.; Christiansen, D.; Willard, S. and P. Ryan. 2013. Evaluation of pulsatility index and diameter of the jugular vein and superficial body temperature as physiological indices of temperament

in weaned beef calves: Relationship with serum cortisol concentrations, rectal temperature, and sex. *Livest. Sci.* 151: 228-237.

Sapolsky, R.; Romero, L. and A. Munck. 2000. How to do glucocorticoids influence stress responses? Integrating, permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrinol. Rev.* 21: 55 – 89.

Savio, J.; Boland, M.; Hynes, N. and J. Roche. 1990. Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. *J. Reprod Fert.* 88: 569 – 579.

Schams, D.; Mayer, H.; Prokopp, A. and H. Worstorff. 1984. Oxytocin secretion during milking in dairy cows with regard to variation and importance of a threshold level for milk removal. *J. Endocrinol.* 102: 337 - 343.

Schmidt, G. 1971. *Biology of Lactation*. Ed. G.W. Salisbury. San Francisco, EEUU. p. 317.

Shkurko, A. 2012. Role behavior: A neurosociological perspective. *Soc. Sci. Inform.* 51 (3): 338-363.

Silveira, P.; Spoon, R.; Ryan, D. and G. Williams. 1993. Evidence for maternal behavior as a requisite link in suckling – mediated annovulation in cows. *Biol. Reprod.* 49: 1338 – 1346.

Sirvén, M. 2015. *Manejo y bienestar de las vacas lecheras*. Ed. Dunken. Buenos Aires, Argentina. pp.115.

Smith, V. 1959. *Physiology of Lactation*. Iowa State University Press. Ames. Iowa, EEUU. pp. 290.

Smith, V.; Convey, E. and L. Edgerton. 1972. Bovine serum corticoid response to milking and exteroceptive stimuli. *J. Dairy Sci.* 55: 1170–1173.

Stagg, K.; Spicer, L.; Sreenan, J.; Roche, J. and M. Diskin. 1998. Effect of calf isolation on follicular wave, dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval of first ovulation in beef cows fed either of two levels postpartum. *Biol. Reprod.* 59: 777-783.

- Stevenson, J.; Jaeger, J.; Rettmer, I.; Smith, M. and L. Corah. 1997. Luteinizing hormone release and reproductive and reproductive traits in anestrus, estrus-cycling, and ovariectomized cattle after tyrosine supplementation. *J. Anim. Sci.* 75: 2754 – 2761.
- Stock, S. and K. Uvnäs-Moberg. 1988. Increased plasma levels of oxytocin in response to afferent electrical stimulation of the sciatic and vagal nerves and in response to touch and pinch in anaesthetized rats. *Acta Physiol. Scand.* 132: 29–34
- Sutherland, M. and F. Huddart. 2012. The effect of training first-lactation heifers to the milking parlor on the behavioral reactivity to humans and the physiological and behavioral responses to milking and productivity. *J. Dairy Sci.* 95 : 6983 – 6993.
- Sydney, S. y N. Castellón. 1998. *Estadística No Paramétrica Aplicada a las Ciencias de la Conducta*. Ed. Trillas. Méjico. pp. 433.
- Tancin, V.; Kraetzel, W. and D. Schams. 2000a. Effect of morphine and naloxone on the release of oxytocin and on milk ejection in dairy cows. *J. Dairy Res.* 67:13 -20.
- Tancin, V.; Schams, D. and W. Kraetzel. 2000b. Cortisol and ACTH release in dairy cows in response to machine milking after pre-treatment with morphine and naloxone. *J. Dairy Res.* 67: 467 – 474.
- Tesorero, M.; Combellas, J.; Uzcátegui, W. and L. Gabaldón. 2001. Influence of suckling before milking on yield and composition of milk from dual purpose cows with restricted suckling. *LRRD.* 13: (1).
- Thayer, J. and R. Lane. 2002. Perseverative cognition and health: neurovisceral concomitants. *Psychol. Health.* 17: 685–695.
- Thorpe, W. 1982. *Breve historia de la Etología*. Alianza. Buenos Aires, Argentina. pp. 211.
- Tinbergen, N. 1964. *Conducta Social en los Animales*. Hispano Americana. México. pp. 209.
- Toates, F. 1997. The interaction of cognitive and stimulus–response processes in the control of behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22 (1): 59 -83.

- Toribio, R.; Molina, E.; Forsberg, J.; Kindahl, M. and H. Eqvist. 1995. Effects of calf removal at parturition on postpartum ovarian activity in zebu (*Bos indicus*) cows in the humid tropics. *Acta Vet. Scand.* 6: 343-352.
- Trevisi ,E.; Lombardelli, R.; Bionaz, M. and G. Bertoni. 2005. Plasma cortisol level in relation to welfare conditions in dairy farms. *P. Assoc. Anim. Prod. Uppsala, Sweden.* 56: 2: 7.
- Uetake, K.; Morita, S.; Hoshiba, S. and T. Tanaka. 2002. Flight distance of dairy cows and its relationship to daily routine management procedures and productivity. *Anim. Sci. J.* 73: 279–285
- Uvnäs-Moberg, K.; Johansson, B.; Lupoli, B. and K. Svennesten-Sjaunja. 2001. Oxytocin facilitates behavioral, metabolic and physiological adaptations during lactation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 72: 225 – 234.
- Vaccaro, L. and F. Florio. 2002. Herd life, stayability to fourth calving and reasons for disposal of *Bos taurus* x *Bos indicus* cows on dual purpose farms in Venezuela. *Lives. Res. Rural Develop.* 14: <http://www.cipav.org.co/lrrd14/3/Vacc143.htm>
- Vaccaro, L.; Velázquez, E.; Pérez, A. and H. Mejías. 1999. Lactation in Venezuela dual-purpose cows. *J. Anim. Breed. Genet.* 116: 509 - 517
- Vahdat, F.; Hurtgen, J.; Whitmore, H.; Johnston, S. and C. Ketelsen. 1979. Effect of time and temperature on bovine serum and plasma progesterone concentration. *Theriogenology* 12: 371-374. 414
- Val-Laillet, D.; Guesdon, V; von Keyserlingk, M.; de Passillé, A. and J. Rushen. 2009. Allogrooming in cattle: Relationships between social preferences, feeding displacements and social dominance. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 116: 141–149
- Van der Kloot, W. 1968. *Behavior.* Holt, Rinehart and Winston. EEUU. pp. 166.
- Van Reenen, C.; Hopster, H.; Van der Werf, J.; Ángel, B.; Buist, W.; Jones, R.; Blokhuis, H. and S. Korte. 2009. The benzodiazepine brotizolam reduces fear in calves exposed to a novel object test. *Physiol. Behav.* 96: 307 – 314.

- Van Reenen, C.; Van der Werf, J.; Bruckmaier, R.; Hopster, H.; Engel, B.; Noordhuizen, J. and H. Blokhuis. 2002. Individual differences in behavioral and physiological responsiveness of primiparous dairy cows to machine milking. *J Dairy Sci.* 85: 2551-2561.
- Viker, S.; Larson, R.; Kiracofe, G.; Stewart, R. and J. Stevenson. 1993. Prolonged postpartum anovulation in mastectomized cows requires tactile stimulation by the calf. *J Anim. Sci.* 71: 999 – 1003.
- Vilariño, M. 1997. Identification l'aliment par le jeune poulet de chair (*Gallus gallus domesticus*). Tesis Doctoral. L'ecole Nacionales Supericure Agronomique Rennes. France. pp. 1 -175.
- Voisinet, B.; Grandin, T.; Tatum, J.; O'Connor, S. and J. Struthers. 1997. Feedlot cattle with excitable temperaments. Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle. *J. Anim. Sci.* 75:892-896
- Wagenmaker, E.; Breen, K.; Oakley, A.; Tilbrook, A. and F. Karsch. 2009. Psychosocial stress inhibits amplitude of gonadotropin-releasing hormone pulses independent of cortisol action on the Type II glucocorticoid receptor. *Endocrinol.* 150 (2): 762 – 769.
- Waiblinger, S.; Boivin, X.; Pedersen, V.; Tosi, M.; Janczak, A.; Visser, K. and R. Jones. 2006. Assessing the human–animal relationship in farmed species: A critical review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 101: 185–242.
- Waiblinger, S.; Menke, C. and G. Coleman. 2002. The relationship between attitudes, personal characteristics and behaviour of stockperson and subsequent behaviour and production of dairy cattle. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 79: 195 – 219.
- Waiblinger, S.; Menke, C.; Korff, J. and G. Bucher. 2004. Previous handling and gentle interactions affect behaviour and heart rate of dairy cows during a veterinary procedure. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 85: 31 – 42.

- Wakerley, J.; Clarke, G. and A. Summerley. 1994. Milk ejection and its control. In (E. Knobil y J. Neil, eds.): *Physiology of Reproduction*. 2nd Ed. Raven Press. New York. EEUU. p. 1131 – 1177.
- Weis, D. 2004. Interaction between dairy cow physiology and milking technology. Doctoral Thesis. Technische Universität München. Germany. pp. 151.
- Wellnitz, O. and R. Bruckmaier. 2001. Central and peripheral inhibition of milk ejection. *Livest. Prod. Sci.* 70: 135 - 140
- Wilde, C. and M. Peaker. 1990. Autocrine control in milk secretion. *J. Agr. Sci.* 114: 235 - 238.
- Wilde, C.; Addey, C.; Boddy, L. and M. Peaker. 1995. Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem. J.* 305: 51 - 58.
- Williams, G. and M. Griffith. 1995. Sensory and behavioral control of gonadotropin secretion during suckling-mediated anovulation in cows. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 49)*: 463- 475. 1995.
- Williams, G.; Gazal, O.; Guzmán-Vega, G. and R. Stanko. 1996. Mechanism regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 289 – 297.
- Yang, H.; Wang, L.; Han, L. and S. Wang. 2013. Nonsocial Functions of Hypothalamic Oxytocin. *ISRN Neuroscience.* 7: 1-13
- Yavas, Y. and J. Walton. 2000. Postpartum aciclicity in suckled beef cows: a review, *Theriogenology.* 54: 25 -55.

XII. ANEXOS

ANEXO 1

CALIBRACIÓN DE EQUIPO MILKOTESTER®

INTRODUCCIÓN

A pesar de la alta confiabilidad de la técnica de ultrasonido para cuantificar los valores de temperatura, grasa, sólidos no grasos, densidad, proteínas, lactosa, agua añadida, punto de congelación es recomendable la calibración previa de uso con muestras de valores conocidos y extremos (Kaylegian *et al.*, 2006; Kohler *et al.*, 2010; www.milkotester.com). El uso de equipos portátiles de medición de los componentes lácteos mediante la técnica del ultrasonido fue desarrollado debido a la aplicabilidad práctica en condiciones de campo en tiempo real, economicidad y confiabilidad (Baeten *et al.*, 2010) hoy son de uso oficial en países europeos, avalados por toda la comunidad de usuarios (gobiernos, científicos, asociaciones de productores y de industriales). Las pruebas oficiales de otros países, incluyendo Venezuela, resultan altamente costosas en equipos, reactivos y personal especializado para la realización por lo que adicionalmente requieren de laboratorios consolidados, estos generalmente distan de las zonas de producción (Baeten *et al.*, 2010). Así las condiciones de almacenamiento y transporte de la leche se convierten en un eslabón muy importante para afectar la calidad y composición evaluada; en tal sentido, los métodos oficiales no siempre resultan, a pesar de la potencia y exactitud de las metodologías, ajustados al valor de la leche recién ordeñada. Así, se procedió a calibrar equipo analizador de componentes de la leche para cuantificación confiable de los componentes en condiciones de campo y de forma masiva.

METODOLOGÍA

El manual del equipo MilkoTester ® contiene información precisa de los pasos a seguir para la corrección y calibración del equipo. A continuación se detallan.

1. Muestreo. Es necesario considerar que debe disponerse de valores extremos en aquel tipo de leche (vaca, cabra, UTH) a utilizar para la calibración del equipo. Así mismo, es conocido que dentro de los múltiples factores que afectan la composición de la leche existen marcadas diferencias en el contenido de grasa y sólidos de la fracción de leche correspondiente a la cisterna y a aquella contenida en los alvéolos; este fue el criterio para recolectar muestras diferenciadas en su contenido de grasa y sólidos totales (Drescher, 2003). La leche de la cisterna se obtiene al principio del ordeño y la alveolar al final del ordeño a fondo (Bruckmaier y Hilger, 2001). Se procedió a realizar la escogencia y posterior preparación de tres vacas al azar para ser ordeñadas. Esta preparación contempló los rutinarios pasos del ordeño. Se inició con la entrada de la vaca al corral de ordeño, tal como es habitual en la unidad de producción comercial. La vaca fue colocada en su respectivo puesto de ordeño y previa limpieza de los pezones y descarte, por extracción manual de dos chorros de leche del cuarto trasero derecho, se procedió a llenar con la leche correspondiente a la muestra a evaluar. Esta muestra fue recolectada directamente en un envase plástico previamente higienizado y con capacidad para 50 mL. Este procedimiento fue aplicado para la recolección de la fracción de leche correspondiente a la cisterna (CIS) y número de la vaca. Una segunda muestra fue recabada al final del mismo ordeño, sobre la misma vaca y el mismo cuarto. Esta fracción fue identificada como fracción alveolar (ALV).

2. Análisis mediante equipo de ultrasonido.

Se realizaron tres mediciones consecutivas de las muestras tomadas en campo. Los valores fueron registrados en una planilla para tal fin.

3. Análisis en laboratorio por norma COVENIN.

Las muestras de leche fueron trasladadas el mismo día al Laboratorio de Lácteos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela. Las muestras

permanecieron en cava con temperatura aproximada entre 8 – 10°C hasta llegar al mencionado laboratorio y los componentes fueron analizados según la norma COVENIN correspondiente.

4. Corrección y calibración.

Los resultados obtenidos se aprecian en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de la composición de la leche según Milkotester y métodos COVENIN

Muestra	Milkotester					COVENIN				Diferencia			
	Gra	Prot	Snf	St	Sal	Gra	Pro	St	Cen	Gra	Pro	St	Cen
1 ALV	11	2,8	7,6	18,6	0,6	9	4,91	20	0,62	2	-2,11	-1,4	-0,02
2 ALV	7,1	3,6	7,5	14,6	0,6	7	3,84	13,8	0,64	0,1	-0,24	0,8	-0,04
3 CIS	0,8	2,8	7,8	8,6	0,6	0,3	4,09	11,68	0,72	0,5	-1,29	-3,1	-0,12
4 CIS	1	3	8,3	9,3	0,6	1	3,82	10,71	0,7	0	-0,82	-1,4	-0,1

Sobre la base de las diferencias observadas en la Tabla 1 para los componentes evaluados y las recomendaciones del fabricante en cuanto a la necesidad de calibración debido a que éstas superan el rango de variabilidad y no son constantes para las diferentes variables evaluadas, se procedió a aplicar el método señalado en el manual del Milkotester. Se aprecia que el equipo y la norma coinciden en dar a la leche con mayor contenido graso los mayores valores, sin embargo, el Milkotester sobre estimó en 2% dicho contenido. En el caso del valor mínimo de grasa ocurrió exactamente igual, fue sobreestimado. Los valores intermedios, pero en un rango amplio (1 a 7,1 %) resultaron con mínimas diferencias. En proteína la variabilidad resultó mayor, siendo que este componente y de acuerdo a la norma COVENIN siempre fue subestimado por el método de ultrasonido. Desde el punto de vista de valoración de la leche para aptitud industrial esta sería una gran debilidad del equipo en caso de no calibrarse (Kohler *et al.*, 2010).

El procedimiento para la calibración contempló ingresar al sistema “corrección” de leche de “vaca” por cada “componente”. El procedimiento es sencillo ya que se introduce el valor reportado por la norma COVENIN para cada muestra individualizada, inmediatamente se colocada la muestra de leche fresca correspondiente a ese valor se realizan cinco lecturas y se guardar la información mediante el botón ENTER. Este procedimiento se repite con cada muestra y componente que se haya determinado. Finalmente el equipo queda calibrado para los rangos posibles de determinar.

CONCLUSIONES

Es posible calibrar el equipo electrónico para cuantificación por ultrasonido de componentes de la leche de forma sencilla y con ello estimar con alta precisión muestras a nivel de unidades de producción

REFERENCIAS

- Baeten, V.; Fernández, J.; Dehareng, F.; Sinnaeve, G. and P. Dardenne. 2010. Regulatory considerations applying vibrational spectroscopic methods for quality control. In (E. Li-Chan, J. Chalmers and P. Griffiths, eds.): Applications of Vibrational Spectroscopy in food Science. John Wiley. UK. p. 486-595.
- Bruckmaier, R. and M. Hilger. 2001. Milk ejection in dairy cows at different degrees of udder filling. *J. Dairy Res.* 68: 369 -376.
- Drescher, K. 2003. Efecto de dos modalidades de ordeño y oxitocina sobre la producción y composición de la leche en vacas de doble propósito en el trópico. *Revista ALCANCE*. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 67: 1-110.
- Fusch, G.; Rochow, N.; Choi, A.; Fusch, S.; Poeschl, S.; Ubah, O.; Lee, S.; Raja, P. and C. Fusch. 2015. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: How reliable are infrared milk analyzers?. *Clin. Nutr.* 34 (3): 465 – 476.
- Kaylegian, K.; Houghton, G.; Lynch, J.; Fleming, J. and D. Barbano. 2006. Calibration of Infrared Milk Analyzers: Modified Milk Versus Producer Milk. *J. Dairy Sci.* 89:2817–2832.
- Kohler, A.; Afseth, N.; Jorgensen, K. Randby, A.; Martens, H. 2010. Quantity analysis of milk by vibrational spectroscopy. In (E. Li-Chan, J. Chalmers and P. Griffiths, eds.): Applications of Vibrational Spectroscopy in food Science. John Wiley. UK. p. 89 – 108.
- www.milkotester.com. Manual de uso Milkotester. Modelo Master Mini.

ANEXO 2

VALIDACIÓN DEL KIT PARA LA DETERMINACIÓN DE CORTISOL EN HUMANOS Y CERDOS PARA EL USO EN VACUNOS

INTRODUCCIÓN

El kit comercial (ENZO ®) para la determinación de Cortisol por método inmunoenzimático (ELISA) denominado Cortisol EIA kit, Catálogo No. ADI-900-071 esta validado para cuantificación de la hormona en humanos y cerdos en varios distintos tipos de muestras (saliva y orina humana, suero y plasma porcino). El interés validar el kit comercial Cortisol EIA kit, Catálogo No. ADI-900-071 (ENZO ®) (Jacobson, 1998) para su uso en vacunos con fines de investigación viene dado por la posibilidad de valorar la respuesta del eje adenocotitrópico en el mantenimiento de la homeostasis interna ante situaciones de manejo animal que pueden desencadenar efectos neuroendocrinos asociados al estrés. Valores elevados de cortisol han sido reportados en individuos sometidos a tensión emocional (social – cambio de rebaño-, de manejo – transporte, cambio de instalaciones, aplicación de tratamientos médicos-, enfermedad) (Curley *et al.*, 2006; Saco *et al.*, 2008; Burdick *et al.*, 2011). Así, la valoración del cortisol en vacunos sometidos a diferentes prácticas de manejo en las unidades de producción de distinto nivel de intensidad tecnológica, permitirían precisar el impacto sobre el bienestar animal y capacidad de respuesta ante determinadas situaciones. El cortisol, no solo es una respuesta metabólica sino que implica alteraciones fisiológicas ya que impacta el metabolismo de la glucosa y sistema inmunológico, entre otras (Sapolsky *et al.*, 2000). Sin embargo, algunas consideraciones, entre ellas, el ritmo circadiano (Neuffer *et al.*, 2006), es necesaria que sea tomada en cuenta para evitar interpretaciones erróneas. En vacunos ha sido documentada la asociación de situaciones de tensión social, manejo no gentil, estrés, dolor, con elevados valores de cortisol relativos a otros grupos que recibieron el manejo opuesto. Es así como,

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y procesamiento hasta almacenaje

Se recolectaron 254 muestras de sangre de novillas gestantes y vacas de primer parto, a tempranas hora de la mañana (07:00 - 09:00), en la vena coxígea mediante agujas vacutainer y en tubos sin aditivo y con EDTA para obtención de suero y plasma respectivamente. Los tubos fueron colocados a la sombra y de forma de inclinada (30°) para promover la formación del coágulo e inmediatamente después de formado el coágulo (± 10 min), el tubo fue introducido en cava con hielo para disminuir y mantener la temperatura de las muestras entre 8 y 10°C. En el caso de los tubos con EDTA, y posterior a ligera agitación para el mezclado con el aditivo, se colocaron directamente en iguales condiciones de cava de refrigeración (INSAI, 2012). Finalizada la recolección las muestras, y en un lapso inferior a dos horas, éstas fueron centrifugadas (IEC HN-SII®) (Vahdat *et al.*, 1979; Pulido *et al.*, 1991) a 3000 rpm por 20 min (http://orgal.net/uploads_productos/51e5d6494e176906ae9d5bcaed76ba78.pdf). Mediante una pipeta descartable para cada muestra se retiró el sobrenadante, suero o plasma, y se colocaron alícuotas duplicadas para ser congeladas y almacenadas a -20 °C (INSAI, 2012). En el laboratorio de Reproducción del Instituto de Investigaciones Agrícolas del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), las muestras fueron descongeladas, a temperatura ambiente para su análisis.

Determinación del Cortisol en las muestras

Se aplicó rigurosamente el procedimiento que indica el protocolo disponible por el fabricante del kit a validar (Jacobson, 1998). Cada reactivo fue preparado conforme a las directrices especificadas en el instructivo del kit de Cortisol Catálogo No. ADI-900-071. Los procedimientos se realizaron bajo condiciones controladas de campana, temperatura estable y normas de bioseguridad.

El kit utiliza un anticuerpo monoclonal adherido a los pocillos de la placa, éste unirá al Cortisol de las muestras (estándar o desconocida) (antígeno) de forma competitiva (anticuerpo - antígeno) apoyado mediante una molécula de fosfatasa alcalina transportadora del Cortisol covalente. El procedimiento contempla un período de incubación y el lavado de los pozos (Well Wash 4MK 2, Fisher Scientific Thermo ®) se coloca un sustrato (pNpp) indicativo de la intensidad de la reacción por cambio de coloración (amarillo). Al agregar una solución de trisodio-fosfato se detiene la reacción y se procede a determinar la intensidad de la coloración amarillenta (Fotocolorímetro; Labsystem Multiskan 352 ®; 405 nm), siendo esta, inversamente proporcional a la concentración de cortisol en cada estándar colocado o muestra desconocida, así, densidad óptica es utilizada para calcular la concentración de Cortisol.

Se realizó una primera corrida con la curva estándar cuyos siete (7) puntos específicos de concentración conocida (n=7; 1=10.000, 2=5.000, 3=2.500, 4=1250, 5=625, 6=313 y 7=156 pg/mL) fueron preparados a partir del Cortisol concentrado (100.000 pg/mL) suministrado por el kit. Adicionalmente, se colocaron muestras de suero y plasma de dos vacas con presumible valor alto y bajo de acuerdo a resultados de prueba de reactividad al manejo humano (Grandin *et al.*, 1993; Halloway y Johnston, 2003; Hoppe *et al.*, 2010). Asimismo, éstas muestras se colocaron en diferentes diluciones, a saber: 0, 1:1, 1:4, 1:8, 1:10; 1:12; 1:20; 1:50; 1:100, mediante la adición del buffer estándar contenido en el kit (debido a la recomendación del fabricante del kit) y para determinar la mejor de las diluciones a utilizar. El kit también recomienda agregar una gota de un aditivo (steroid displacement reagent) inhibidor de la unión de proteínas indeseables.

Para verificar el funcionamiento óptimo del kit es necesario cuantificar: la Actividad Total (%), Unión no Específica (%) y el Valor Cero (Bo) (%). Estos se obtuvieron mediante el cociente de la densidad óptica de cada uno y el valor para el Blanco. Asimismo, al graficar los

valores de Cortisol de la curva estándar (eje X de las abscisas en función logarítmica) y su porcentaje de unión (eje Y de las ordenadas) se obtuvo una curva cuya regresión logística que quedó definida para cada corrida; se calculó el R^2 de ajuste para garantizar la confiabilidad de la prueba.

Por otro lado, se calculó el índice de Sensibilidad (pg/ml), el cual es indicativo del valor mínimo detectable por el inmunoensayo. Para el mismo, se aplicó:

$$S = (2DS \text{ de } DO_{B0}) / \bar{X} (DO_{B0} - DO_{S7})$$

Siendo S=Sensibilidad, DS=desviación estándar, DO=densidad óptica y $\bar{X} (DO_{B0} - DO_{S7}) =$ diferencia de la densidad óptica entre el valor cero y la densidad óptica del estándar menor de la prueba.

Siempre que un grupo de muestras con valores desconocidos de Cortisol fue procesado se realizó el montaje previo de la curva estándar e igual verificación, regresión logística y cálculo de R^2 y sensibilidad. Controles de calidad altos y bajos fueron incorporados partiendo de los resultados de la primera corrida y con ellos se determinó la Precisión de la prueba. Ésta Precisión se calcula a través de los coeficientes de variación (%) intra ensayo e inter ensayos. Estos cálculos son necesarios debido a la alta influencia del ambiente del laboratorio, manipulación de las muestras y reactivos durante los procedimientos, así como la vida útil prevista en la fecha del kit. Con los valores de Precisión obtenidos se asegura, a los niveles de variación máximos permitidos, que los valores obtenidos en un ensayo sean confiables en relación a si se hubiesen cuantificado en otra corrida en otro momento (Jacobson, 1998; FAO/AIEA, 1999).

Verificado el funcionamiento de kit, material biológico de mejor resultado y mejor dilución se procedió al procesamiento de 254 muestras desconocidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se observan los parámetros considerados para validar la curva estándar de cada corrida y garantizar la funcionalidad del kit para la detección del cortisol y en consecuencia la confiabilidad del mismo (Borromeo *et al.*, 2005). Reactivos, equipos y procedimientos incidieron sobre los resultados esperados.

Cuadro 1. Parámetros de validación del kit para la determinación de cortisol en suero vacuno.

Parámetro	Referencia kit	Curvas			
		1	2	3	4
Actividad Total (%)	3,07	2,38	2,2	2,42	2,2
Unión no Específica (%)	0,03	0,99	1,05	1,02	1,06
Bo/Ta (%)	26,58	29,82	33,55	25,17	33,55
Calidad de ajuste (R^2 -Adj)	1	0,94	0,91	0,97	0,97
Sensibilidad (pg/mL)	56,72	61,16			
Precisión					
CV intra ensayo (%)	≤ 13	11,1	13,51	5,37	8,6
CV inter ensayos (5)	≤ 15	13,2			

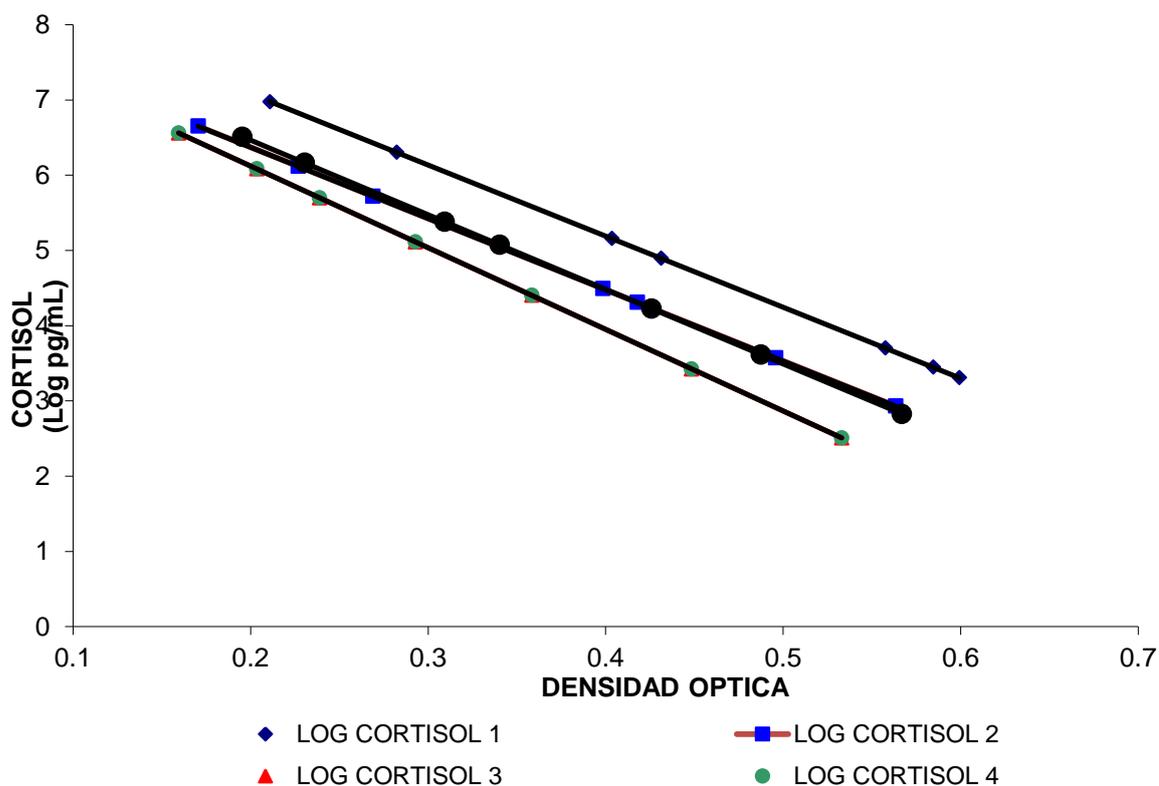
Los resultados obtenidos en el procesamiento de las muestras problema variaron desde el valor mínimo 18 pg/mL (fuera de la curva) de hasta el máximo de 2035 pg/mL, esto puede ser considerado como el intervalo o rango cuantificado en las diferentes corridas (Jacobson, 1998;); el valor promedio general se ubicó en 1034 pg/mL y la desviación estándar de las muestras problema de 532,7 pg/mL. Con esto se aprecia el rango de valores existentes en las muestras problema y la capacidad del kit para la cuantificación de dicho amplio rango de valores. El procesamiento en suero resultó mejor que en plasma debido a que en éste último no parece haber habido unión antígeno – anticuerpo ya que todas las concentraciones estuvieron por debajo del límite de detección independientemente de la dilución aplicada, es decir, indetectables (< 61,16 pg/mL) según la Sensibilidad calculada. Posiblemente, el EDTA presentó interferencia con el Cortisol contenido en la sangre dentro del sedimento, mientras

que no ocurrió así para el caso del suero obtenido sin aditivo en el tubo (Tate y Ward, 2004; Burtis *et al.*, 2012; Burnett *et al.*, 2014). En consecuencia sólo fueron procesadas muestras de suero. En relación a la dilución, el laboratorio fabricante del kit recomienda que ésta sea ≥ 8 (1:8), sin embargo, en el caso del suero bovino los resultados mostraron que la mejor dilución fue 1:1 ya que el porcentaje de recuperación fue el más elevado (Cuadro 2).

Cuadro 2. Proporción de recuperación del Cortisol en función de las diluciones aplicadas y el valor de concentración inicial.

Dilución	Concentración Cortisol (pg/mL)	Proporción de Recuperación (%) en la dilución	Observación
0	319,7		Vaca baja Reactividad ¹
1:1	370,4	115,88	
1:4	268,6	84,03	
1:8	275,5	86,19	
1:10	189,7	59,36	
1:12	213,6	66,83	
1:20	173,4	54,25	
1:50	78,1	24,42	
1:100	105,6	33,05	
0	793,4		
1:1	687,6	86,67	
1:4	286,1	36,07	
1:8	282,2	35,56	
1:10	326,2	41,11	
1:12	333,1	41,98	
1:20	253,3	31,93	
1:50	207,1	26,10	
1:100	140,3	17,69	

Las curvas de regresión resultantes de las corridas de cada una de las curvas estándar se observan en la Figura 1. Estas muestran la importancia de que cada prueba tenga su propia curva, ya que a pesar de la cercanía y tendencia, existe entre ellas un desplazamiento producto de la sensibilidad de cada reactivo a pesar que todos se encontraron dentro de márgenes de tiempo recomendados por el fabricante.



Para la determinación, por interpolación, de las concentraciones de las muestras problema se utilizó su respectiva ecuación de la curva estándar ($y_1 = 8,97078 - 9,44642X$; $y_2 = 8,26702 - 9,46869X$; $y_3 = 8,29218 - 10,85024X$; $y_4 = 8,44979 - 9,91729X$)

CONCLUSIONES

El kit de Cortisol para cuantificación en materiales biológicos de humanos y cerdos resulta válido para uso en suero vacuno en una dilución 1:1 con fines de investigación de acuerdo a los procedimientos y condiciones experimentales de campo y laboratorio.

REFERENCIAS

- Burdick, N.; Carroll, J.; Randel, R.; Willard, S.; Vann, R.; Chase, C.; Lawhon, S.; Hulbert, L. and T. Welsh. 2011. Influence of temperament and transportation on physiological and endocrinological parameters in bulls. *Livest Sci.* 139 (3): 213-221.
- Burnett, T.; Madureira, A.; Silper, B. ; Nadalin, A.; Tahmasbi, A; Veira, D. and R. Cerri.2014. Short communication: Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 97 (12): 7685-7690
- Burtis, C.; Ashwood, E. and D. Bruns. 2012. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* Fifth Ed. Elsevier Health Sciences. 2256 pp
- http://orgal.net/uploads_productos/51e5d6494e176906ae9d5bcaed76ba78.pdf
- FAO/AIEA. 1999. *Animal Production and Health. Joint FAO/AIEA Programme.* Viena, Austria. pp. 17-23.
- INSAI. 2012. 1.1.9. Guía para la Toma, Conservación y Envío de Muestras de Muestras Clínicas. Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral. Ministerio del Poder Popular para la Salud. República Bolivariana de Venezuela. pp. 30
- Jacobson, R. 1998. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 7: 507-526
- Neuffer, L. Kaufmann, C.; Hauser, R. and B. Wechsler. 2006 Milk Cortisol Concentration in Automatic Milking Systems Compared with Auto-Tandem Milking Parlors. *J. Dairy Sci.* 89 (9): 3447–3454
- Saco, Y.; Fina, M.; Giménez, M.; Pato, R.; Piedrafita, J. and A. Bassols. 2008. Evaluation of serum cortisol, metabolic parameters, acute phase proteins and faecal corticosterone as indicators of stress in cows. *Vet. J.* 177 (3): 439–441
- Sapolsky, R.; Romero, L. and A. Munck. 2000. How to do glucocorticoids influence stress responses? Integrating, permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrinol. Rev.* 21: 55 – 89.
- Tate, J. and G. Ward. 2004. Interferences in Immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 25 (2): 105–120.

ANEXO 3

VALIDACIÓN DE KIT ELISA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE OXITOCINA EN LECHE DE VACA

INTRODUCCIÓN

La oxitocina es un neuropéptido de amplia gama de acción en el organismo de los mamíferos. Su producción en la neurohipófisis, núcleos supra óptico y paraventricular, se conoce desde 1953, sin embargo, aún hoy día se siguen dilucidando mecanismos de acción sobre diversidad de tejidos y procesos, bien sea como neurohormona o neurotransmisor, entre ellos: eyección láctea, parto, apareamiento, sociabilidad, vínculo madre cría (Viero *et al.*, 2010).

En el caso de las hembras mamíferas en fase de lactancia la caracterización de su liberación ha sido ampliamente estudiada en humanos, roedores, vacunos de alta habilidad para producción de leche y rumiantes menores. En lapsos muy cortos de tiempo, inferior a 6 min, bajo amamantamiento u ordeño, se liberan cantidades hasta cuatro veces superiores al nivel basal de concentración (Higuchi *et al.*, 1986; Bruckmaier *et al.*, 1993).

En el caso de hembras vacunas en producción de leche su estudio se ha fundamentado en la caracterización de patrones de liberación debido a los efectos de factores estimulantes o inhibidores del mecanismo de la eyección láctea, mecanismo que resulta determinante para la remoción de la mayor cantidad de leche contenida en la glándula mamaria previa síntesis (Bruckmaier y Hilger, 2001; Drescher, 2003; Drescher *et al.*, 2006; 2009). Debido a ello, el logro de la mayor eficiencia en remoción de la leche de la glándula mamaria durante el ordeño representa una práctica crítica para la óptima rentabilidad de la actividad productiva e incluso de la industria de productos lácteos debido a las implicaciones de la remoción total de la leche sobre el contenido de la fracción lipídica.

Así, caracterizar la curva de liberación de oxitocina en vacas lactantes mestizas tropicales podría dilucidar algunas interrogantes vinculadas a las prácticas de manejo idóneas durante el ordeño, lo cual será variable según los diferentes grupos genéticos utilizados para la producción del sistema más difundido en el trópico bajo (Kaskous *et al.*, 2006; Negrão, 2008).

Hasta hace poco los métodos para cuantificación de oxitocina se habían desarrollado para muestras sanguíneas de las cuales se extrae plasma con EDTA y se agrega un componente inhibidor de la destrucción de las proteínas debido al activo mecanismo de proteólisis en sangre (Schams *et al.*, 1984). Seguidamente, se debe realizar una extracción del péptido mediante un laborioso procesamiento de laboratorio (Schams *et al.*, 1984). Una de las implicaciones del método de recolección de muestras de sangre es que se requiere aplicar un procedimiento invasivo para la colocación de un catéter en vena yugular para el retiro de muestras cada minuto con mínima perturbación del animal. Hoy día, en el marco de las estrictas normas de Bienestar Animal promovidas en Europa y EEUU en el marco de la Declaración UNESCO (1978) se ha impulsado el desarrollado de métodos alternativos de cuantificación de fluidos corporales a través de metodologías no invasivas, tal es el caso del desarrollo de técnicas para determinación de oxitocina en leche (Mishra *et al.*, 2013) y más recientemente saliva (Carter *et al.*, 2007). Por lo antes expuesto, este trabajo buscó validar un kit comercial para la cuantificación de oxitocina en leche de vaca en condiciones tropicales con mira a profundizar estudios fisiológicos en condiciones tropicales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 300 muestras de leche en campo provenientes de vacas sanas de un rebaño vacuno en Venezuela sometido a diferentes estrategias de manejo del ordeño (manual, mecánico) y con uso o no de la cría al pie durante el ordeño. Para ello se dispuso de envases estériles de 5 ml de capacidad colocados en cava con geles congelados para su enfriamiento

previo a la toma de muestra. Inmediatamente después de recolectadas las muestras de leche directamente del cuarto trasero derecho de la ubre de la vaca, los envases estériles identificados fueron reintroducidas en la cava para disminuir la temperatura a 4 - 6 °C.

En un lapso no mayor a dos horas post recolección las muestras fueron centrifugadas a 10000 fuerza centrifuga relativa (rcf) (9000 rpm; rotor 10 cm; IEC HN-SII) por 15 min. Mediante una pipeta descartable para cada muestra se atravesó la capa de grasa sobrenadante y se procedió a aspirar y trasvasar la fase líquida bajo dicho sobrenadante (porción intermedia) hacia un nuevo vial para ser congeladas a -20 °C hasta su procesamiento. En el laboratorio, las muestras fueron descongeladas, a temperatura ambiente, y centrifugadas nuevamente a 10000 rcf (6600 rpm; rotor 20 cm) en centrífuga refrigerada (IEC CL31R Multispeed Thermo). Se retiró la porción intermedia para el trasvasado y ulterior determinación de la concentración de oxitocina en muestras de leche de vaca.

Para la determinación cuantitativa de oxitocina se utilizó el kit EIA de oxitocina (ENZO Life Science, ADI-900153®) de inmunoensayo competitivo. El kit utiliza un anticuerpo policlonal de oxitocina para unir, de forma competitiva, la cantidad de oxitocina suministrada por el estándar o la muestra contra una molécula de fosfatasa alcalina transportadora de la oxitocina covalente. Según el desplazamiento de una por otra siguiendo el procedimiento de incubación de los reactivos a 4°C por 24 horas, posterior lavado de los pozos (Well Wash 4MK 2, Fisher Scientific Thermo ®) y colocación de un substrato (pNpp) capaz de tornarse de color amarillo debido a la intensidad de la reacción prevista. Mediante un Fotocolorímetro (Labsystem Multiskan 352 ®; 405 nm) se determinó la intensidad de la coloración amarillenta, siendo esta, inversamente proporcional a la concentración de oxitocina en cada estándar colocado o muestra desconocida, así, densidad óptica es utilizada para calcular la concentración de oxitocina. Según el fabricante la proporción de recuperación en leche

humana es de 95%, por lo cual resulta confiable en relación a los valores de oxitocina detectables.

Las mediciones proporcionales de Actividad Total (%), Unión no Específica (%) y Valor Cero (Bo) (%) se obtienen mediante el cociente de la densidad óptica de cada uno y el valor para el Blanco.

Al graficar los valores de oxitocina (eje X de las abscisas en función logarítmica) y su porcentaje de unión (eje Y de las ordenadas) se obtiene una curva cuya regresión logística queda definida para cada corrida de cada ensayo y a la cual se le calcula matemáticamente el R^2 de ajuste para satisfacer, entre otros, la interpolación de los valores problema o muestras desconocidas.

En el caso de los valores conocidos como Control de Calidad (pg/ml), estos expresan valores que el fabricante determinó bajo sus condiciones de prueba, encontrando que aquellos de cada corrida deben coincidir. Estos se calculan en tres diferentes lugares de la recta (20%, 50 % y 80%) a los fines de garantizar valores a baja, media y alta concentraciones según el lugar de la curva.

El índice de Sensibilidad (pg/ml) indica el valor mínimo detectable por el inmunoensayo. Para su cálculo, se aplica:

$$S = (2DS \text{ de } DO_{Bo}) / \Sigma (DO_{Bo} - DO_{S7})$$

Siendo S=Sensibilidad, DS=desviación estándar, DO=densidad óptica y $\Sigma (DO_{Bo} - DO_{S7})$ = diferencia de la densidad óptica entre el valor cero y la densidad óptica del estándar menor de la prueba.

El parámetro de precisión se mide a través de los coeficientes de variación intra ensayo (%) e inter ensayos (%) debido a la alta influencia del ambiente del laboratorio y la manipulación de los diferentes reactivos en el procedimiento de cada corrida. Así se asegura,

a los niveles de variación máximos permitidos, que los valores obtenidos en un ensayo son tan precisos y confiables como si se hubiesen medido en alguna otra corrida (FAO/AIEA, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados mostraron desplazamiento de la curva estándar tal como se esperaba de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial y las distintas concentraciones de oxitocina según el estándar utilizado (Figura 1).

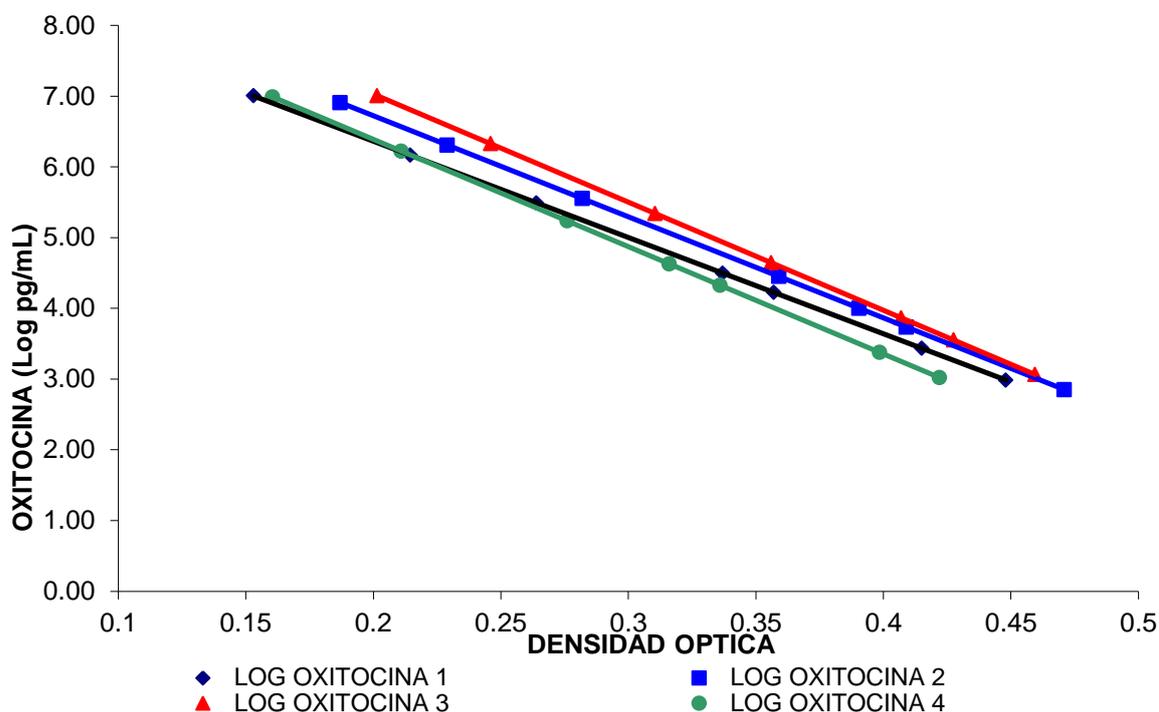


Figura 1. Regresiones para las concentraciones de oxitocina según el desplazamiento de los valores de la curva estándar y su densidad óptica

En el Cuadro 1 se muestran los resultados de las cuatro curvas realizadas de acuerdo a los procedimientos convencionales. Los resultados sobre los parámetros específicos a utilizar en una prueba de validación de un kit diagnóstico, en comparación con la referencia del fabricante para su validación.

En relación a la validación del kit para determinación de oxitocina en leche de vaca todos los parámetros evaluados indican su confiabilidad de uso (Borromeo *et al.*, 2005), lo cual era esperable de acuerdo a la estabilidad molecular del péptido de oxitocina en animales superiores, especificidad del kit (reacción cruzada menor al 0,2%), calidad de los materiales y equipos utilizados.

Cuadro 1. Parámetros considerados para la validación de un kit comercial de determinación de oxitocina en leche de vaca en condiciones tropicales

Parámetro	Referencia kit	Curva			
		1	2	3	4
Actividad Total (%)	9,3	13,3	14,5	11,4	9,5
Unión no Específica (%)	0	1,1	1,2	1,3	1,1
Bo/Ta (%)	5,3	4,1	3,3	4,3	5,2
Calidad de ajuste (R^2 -Adj)	1	0,98	0,97	0,97	0,97
<i>Controles de Calidad</i>					
20 % intercepto (pg/ml)	519	471	548	559	497
50 % intercepto (pg/ml)	123	161	156	128	145
80 % intercepto (pg/ml)	34	26	42	35	23
<i>Sensibilidad (pg/ml)</i>	11,7	13,4			
<i>Precisión</i>					
CV intra ensayo (%)	≤ 13	15,6	8,6	4,3	4,3
CV inter ensayos (5)	≤ 15	13,6			

Los resultados muestran que los valores de oxitocina en leche resultaron similares a aquellos reportados por la literatura y que se encuentran contenidos en muestras de plasma (Tancin *et al.*, 1993; Johansson, 2000; Lupoli *et al.*, 2001; Macuhova *et al.*, 2004). Con lo cual el porcentaje de recuperación que se indica por la casa comercial (95%) es cónsono a la realidad encontrada.

La variabilidad en el contenido de oxitocina en las muestras fue garantizado a través de las distintas practicas de manejo de estímulos durante el ordeño, ya que como señalan Tancin *et al.* (1993) y Bar-Pelled *et al.* (1995) el amamantamiento produce una mayor liberación de la neurohormona por el conjunto de estímulos condicionantes (visuales, olfativos y táctiles) a

que es sometida la hembra lactante (Higuchi *et al.*, 1986; Bruckmaier *et al.*, 1993; Drescher, 2003).

CONCLUSIONES

La determinación de oxitocina en muestras de leche de vaca resultó específica, sensible, precisa y reproducible a través del kit comercial para leche humana; así, este procedimiento puede abrir un horizonte en la investigación tropical acorde a declaraciones mundiales mediante métodos no invasivos.

REFERENCIAS

- Bar Peled, U.; Maltz, E.; Bruckental, I.; Folman, Y.; Kali, J.; Gacitua, H.; Lehrer, R.; Knight, C.; Robinzon, B.; Voet, H. and H. Tagari. 1995. Relationship between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 78: 2726-2736
- Borromeo, V.; Abbate, F.; Berrini, A.; Bartolone, A. and C. Secchi. 2005. Monoclonal antibody capture fluorometric enzyme – linked immunoabsorbent assay for detection of equine growth hormone in plasma. *Vet Res Commun.* 29: 173 – 176.
- Bruckmaier, R.; Shams, D. and J. Blum. 1993. Milk removal in familiar and unfamiliar surroundings concentrations of oxytocin, prolactin, cortisol and β -endorphin. *J Dairy Res.* 60: 449 – 456
- Bruckmaier, R. and M. Hilger. 2001. Milk ejection in dairy cows at different degrees of udder filling. *J Dairy Res.* 68: 369 -376.
- Carter, C.; Pournajafi-Nazarloo, H.; Kramer, K.; Ziegler, T.; White-Traut, R.; Bello, D. and D. Schwertz. 2007. Oxytocin: behavioral associations and potential as a salivary biomarker. *Ann N Y Acad Sci.* 1098:312-22.
- Drescher, K. 2003. Efecto de dos modalidades de ordeño y oxitocina sobre la producción y composición de la leche en vacas de doble propósito en el trópico. *Revista ALCANCE* 63. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. p. 110.
- Drescher, K. ; Saddy, J. y W. Uzcátegui. 2009. Evaluación de la cantidad de leche vendible y total bajo diferentes modalidades de amamantamiento restringido en vacas doble propósito. *Zoot Trop.* 27: 39-47.
- Drescher, K.; Martínez, N.; Perozo, D.; Saddy, J. y W. Uzcátegui. 2006. Is the calf presence at milking a stimulating stressing factor in crossbred cattle in the tropics? *Rev Fac Cienc Vet. Universidad de Sao Paulo. Brasil.* p. 39.
- FAO/AIEA. 1999. Animal Production and Health. Joint FAO/AIEA Programme. Austria. p. 17-23.

- Higuchi, T.; Tadokoro, Y.; Honda, K. and H. Negoro. 1986. Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol.* 110: 251–256
- Johansson, B. 2000. Effect of milking and feeding routines on milk production, hormone release and behavior in dairy cattle. Tesis Doctoral. Swedish University of Agriculture Science. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Agraria.* 211. pp. 47.
- Kaskous, S.; Weiss, D.; Massri, Y.; Al-Daker, A.; Nouh, A. and R. Bruckmaier. 2006. Oxytocin release and lactation performance in Syrian Shami cattle milked with and without suckling. *J Dairy Res.* 73: 28-32.
- Lupoli, B.; Johansson, B.; Uvnäs-Moberg, K. and K. Svennersten-Sjaunja. 2001. Effect of suckling on the release of oxytocin, prolactin, cortisol, gastrin, cholecystokinin, somatostatin and insulin in dairy cows and their calves. *J Dairy Res.* 68:175-87.
- Macuhova, J.; Tancin, V. and R. Bruckmaier. 2004. Effects of Oxytocin Administration on Oxytocin Release and Milk Ejection. *J Dairy Sci.* 87:1236–1244
- Mishra, M.; Ali, S. and M. Das. 2013. A New Extraction Method for the Determination of Oxytocin in Milk by Enzyme Immune Assay or High-Performance Liquid Chromatography: Validation by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Food Anal Methods* 6: 1308-1319
- Negrão, J. 2008. Hormone release and behavior during suckling and milking in Gir, Gir x Holstein, and Holstein cows. *J Anim Sci.* 86: 21-26.
- Schams, D.; Mayer, H.; Prokopp, A. and H. Worstorff. 1984. Oxytocin secretion during milking in dairy cows with regard to the variation and importance of a threshold level for milk removal. *J Endocrinol.* 102: 337 -343.
- Tancin, V.; Harcek, L.; Broucek, J.; Uhrincat, M. and S. Mihina. 1993. Changes in oxytocin and cortisol levels in primiparous cows after changing from 21 days of suckling calves to machine milking. *Vet Med (Praha).* 38: 449-58.
- UNESCO. 1978. Declaración Universal de los Derechos Animales. Organización de las Naciones Unidas. Viena-Austria.
- Viero, C.; Shibuya, I.; Kitamura, N.; Verkhatsky, A.; Fujihara, H.; Katoh, H.; Ueta, Y.; Zingg, H.; Chvatal, A.; Sykova, E. and G. Dayanithi. 2010. Oxytocin: Crossing the Bridge between Basic Science and Pharmacotherapy. *CNS Neurosci Ther.* 16: 138-156

ANEXO 4

VALIDACIÓN DE KIT ELISA DE PROGESTERONA EN SUERO HUMANO PARA USO EN VACUNOS

INTRODUCCIÓN

La determinación precisa del estado reproductivo en la hembra vacuna, así como la evaluación del pronto del reinicio de la actividad ovárica postparto son aspectos de interés en una ganadería bajo controles de producción. El seguimiento diario de los signos reproductivos que indican al personal técnico de una unidad de producción con vacunos debe ser sistemático y rutinario, al menos, dos veces al día todos los días, con sus correspondientes registros y procesamiento a los fines de planificar la óptima entrada a servicio de la hembra y cálculos de índices. Este procedimiento de determinación visual humana no siempre resulta preciso o efectivo además que pueden omitirse los denominados celos silentes. Es por ello, que se han desarrollado métodos automatizados (podómetros) o de cuantificación de progesterona en leche o sangre que determinan con alta confiabilidad parámetros relacionados al proceso reproductivo.

La capacitación del personal de la unidad de producción para la toma de una muestra semanal (un día fijo) de sangre de cada vaca en ordeño puede generar información confiable y valiosa para la toma de decisiones oportunas, siempre que esta sea procesada en un laboratorio cercano, confiable y expedito, adicional al registro y verificación diaria de conductas animales asociadas al celo.

La progesterona es una hormona esteroidea secretada por el cuerpo lúteo del ovario, estructura que aparece posterior a la ovulación de la hembra; su concentración es mínima el día del estro y se incrementa paulatinamente hasta ser máxima desde el día 11 aproximadamente hasta el 18 aproximadamente. Así, su determinación es signo claro de actividad funcional del ovario (Munro y Stabenfeldt, 1984). De permanecer altos los valores,

transcurrido el día 21 postcelo y haber sido aplicada previamente inseminación artificial u observada la monta natura, no habría duda de preñez en la hembra. Los cambios en los valores de concentración de la progesterona pueden ser detectados tanto en plasma y leche, siendo más complicado el proceso en leche y más elevados los valores debido al carácter lipofílico de los esteroides (Simersky *et al.*, 2007).

Existe una amplia distribución de pruebas inmunoenzimáticas para detección de progesterona en suero o plasma humano, mas en vacunos no son abundantes. Desde finales de la década de 1980 las técnicas basadas en reacciones inmunoenzimáticas (ELISA) han sido las más ampliamente utilizadas debido a su bajo potencial de contaminación y menor riesgo y costo (Roa *et al.*, 1997), en relación a otras de alta precisión como el radioinmunoanálisis (RIA) (Munro y Stabenfeldt, 1984; Ochoa, 2012) pero altamente correlacionadas (Roa *et al.*, 1997). Debido a la estabilidad química de la progesterona es posible su medición a través de kits comerciales para humanos, sin embargo, su validación con material biológico de otras especies, en este caso vacunos, siempre debe ser realizada previa a cualquier determinación e interpretación confiable; este fue el objetivo del presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y material biológico

Se colectaron muestras de sangre de vacas, adultas y sanas, mediante aguja y tubo para vacío a nivel de los vasos sanguíneos coccígeos. Las vacas utilizadas para el muestreo fueron seleccionadas específicamente por: vaca con menos de 72 horas de transcurrido el parto (RP) y otra en el último mes de gestación (GE), en este caso garantizado por el tiempo de la inseminación previo.

Se obtuvo suero por coagulación en reposo del tubo sin aditivo, a la sombra y con inclinación de 30°. Seguido a la formación del coágulo los tubos fueron refrigerados en cava con hielo durante 30 min, para su centrifugación (IEC HN-SII) a 2600 rpm por 25 min. El suero se trasvasó con pipeta desechable y por duplicado hacia viales de 1,5 mL; las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis en el Laboratorio.

Procedimiento

Para verificar el funcionamiento adecuado del Kit comercial DS-EIA Steroid-Progesterone de DSI ® de determinación de concentración de progesterona en suero humano mediante ensayo inmunoenzimático en microplaca y todos sus componentes, se montó una prueba inicial utilizando por triplicado cada estándar comercial (C0, C1, C2, C3, C4, C5) (N=18) para la construcción de la curva respectiva (CE) y un control progesterona en suero (CS), propio del kit, al final de la curva estándar (N = 3). Así este primer protocolo incluyó 21 muestras en total.

Nuevamente, se procedió a utilizar el Kit comercial DS-EIA Steroid-Progesterone de DSI ®. Se evaluaron las siguientes muestras por triplicado: cada estándar comercial (C0, C1, C2, C3, C4, C5) (N=18), control progesterona en suero (CSi) (N = 3), muestras de suero puro de vaca recién parida (RP) (N = 3) y dilución 1: 1 de cada estándar con suero RP (N = 18), suero sin diluir de vaca gestante (GE) (N = 3) y dilución 1:1 de cada estándar (C0...C5) con suero de GE (N = 18). Se repitió CSf (N = 3) al final de la muestras. Así el protocolo incluyó 66 muestras en total. El control de progesterona en suero (CS) es propio del Kit y permite la cuantificación de la variación intraensayo, por ello fue colocado al final de la curva estándar equivalente al inicio de las muestras desconocidas y al final de todas las muestras desconocidas.

Se utilizó agua destilada de alta pureza según los parámetros de conductividad eléctrica ($5,5 \times 10^{-6}$ Siemens/m) y pH (6,9) verificados para preparación de solución de lavado y requeridos por el Kit. Adicionalmente, se aplicaron cada una de las especificaciones del manual el fabricante en cuanto al procedimiento a seguir, además del uso de pipeta multicanal y lavador automático de pozos (Well Wash 4MK 2, Fisher Scientific Thermo ®) para minimizar interferencia diferencial del tiempo entre los reactivos y cada muestra.

La cantidad de progesterona que se detecta en la muestra es inversamente proporcional a la unión entre ella y el conjugado enzimático colocado en los micropozos recubiertos internamente con anticuerpo antiprogesterona (específico para la molécula). El kit ofrece un rango de medición de 0 a 100 nmol/L equivalente a 0 – 31 ng/mL respectivamente. El límite mínimo de detección es de 0,5 nmol/L según el fabricante y tampoco existe reacción cruzada con otras hormonas esteroideas.

La lectura de la densidad óptica (DO) de cada muestra en la placa se realizó en un fotocolorímetro Multiskan Labsystem 352® con un filtro de 405 nm de Absorbancia.

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados mediante la Prueba de Correlación para determinar el grado de asociación entre el valor de la CE y la DO cuantificada. El análisis de regresión lineal verificó el grado de predicción de las concentraciones de P₄ de cada vaca según su estado fisiológico (postparto reciente o gestante).

Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos para cada muestra fueron promediados para realizar el gráfico correspondiente y hallar la ecuación de regresión lineal (Linealidad) que expresase la concentración de progesterona según la DO obtenida. Para hallar los valores de concentración de las muestras desconocidas se interpolaron los valores en la ecuación de regresión obtenida para la curva estándar respectiva. El Kit garantiza la medición en nmoles/L

por lo que para comparar con valores de la literatura los mismos fueron transformados a ng/mL según la equivalencia en la que 1 ng P₄/mL es igual a 3,18 nmol/L o 1 nmol/L equivale a 0,3145 ng/mL de P₄; esto debido al peso molecular de la hormona en estudio.

Se calcularon los coeficientes de variación intra e interensayo para determinar la Precisión o Reproducibilidad de la corrida de muestras, éstos deben ser menores a 15 y 10 (%) en el caso de la intra e interensayo respectivamente (Roa *et al.*, 1997; FAO/AIEA, 1999; Borromeo *et al.*, 2005).

Para comparar estadísticamente el Paralelismo de las curvas obtenidas: CE, dilución 1:1 con RP y dilución 1:1 con GE se aplicó un análisis de varianza para comparar la homogeneidad de pendientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 muestra los resultados para a concentración de progesterona en la curva estándar y en las muestras de la vaca RP y GE solas o según las diluciones aplicadas para la prueba de paralelismo respectiva. El rango de valor mínimo y máximo para las muestras evaluadas estuvo entre 0,38 nmoles/L y 87,86 nmoles/L respectivamente.

El paralelismo entre las curvas de concentración de progesterona estándares de kit comercial (CE) y su dilución 1:1 con suero de vaca en último mes gestación (GE) o en postparto reciente (RP) se aprecian en la Figura 1. Conjuntamente, se muestran las ecuaciones de predicción y su valor de R². En el nivel más alto de concentración encontrada y esperada para la dilución con GE se aprecia que el valor es prácticamente el mismo

Cuadro 1. Valores de concentración de progesterona (nmoles/L y ng/L) para la curva estándar del kit y según la mezcla con suero de vaca recién parida (RP) o gestante (GE)

Muestra	Concentración (nmoles/L)	Concentración (ng/mL)
Estándar C0	0,29	0,09
Estándar C1	1,58	0,50
Estándar C2	8,77	2,76
Estándar C3	26,59	8,36
Estándar C4	56,93	17,90
Estándar C5	89,58	28,17
Control Suero	30,69	9,65
Recién parida (RP)	0,38	0,12
RP + C0	0,39	0,12
RP + C1	1,16	0,36
RP + C2	5,42	1,70
RP + C3	22,62	7,11
RP + C4	43,68	13,75
RP + C5	78,20	24,59
Gestante (GE)	59,03	18,56
GE + C0	16,45	5,17
GE + C1	20,35	6,40
GE + C2	34,83	10,95
GE + C3	52,16	16,40
GE + C4	73,49	23,11
GE + C5	87,86	27,63
Control Suero	36,80	11,57

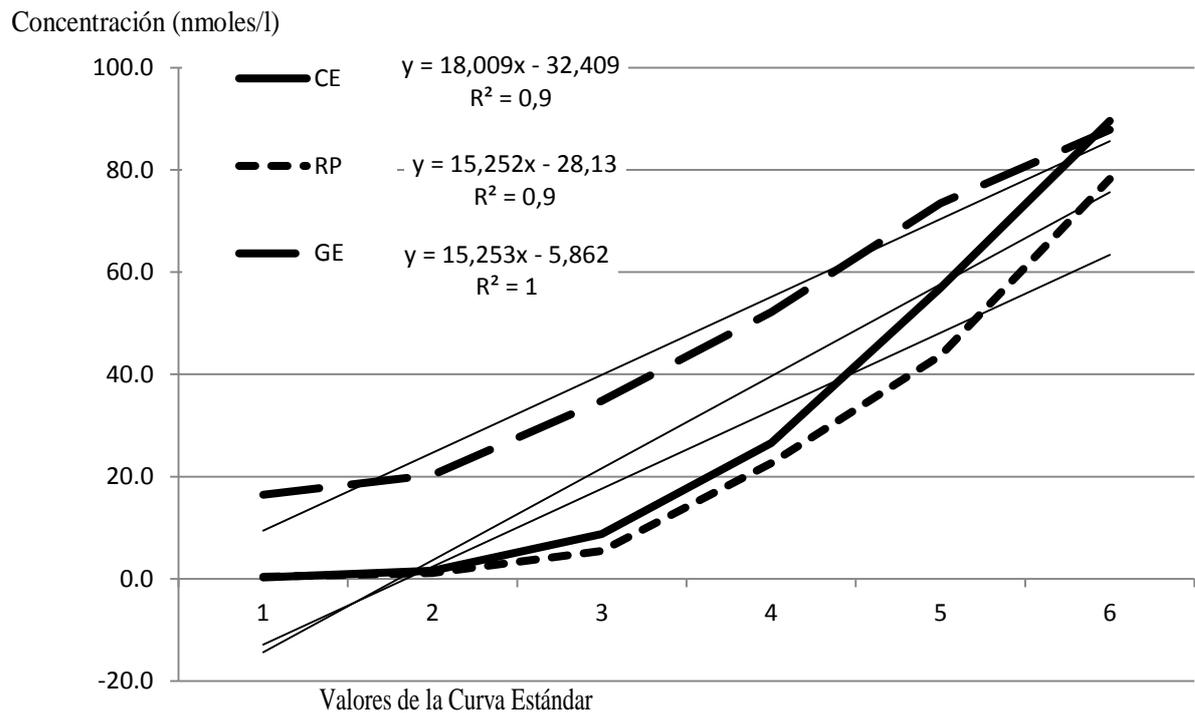


Figura 1. Concentración según cada muestra del estándar comercial (CE) y con dilución 1:1 en suero de vaca recién parida (RP) o gestante (G) y curva de regresión lineal

La prueba de paralelismo con suero de vaca RP y de vaca GE arrojó un desplazamiento de la curva cónsono con el suero diluyente aplicado, es decir, aquella vaca con valores mínimos de progesterona circulante debido a la reciente destrucción del cuerpo lúteo y ausencia de ciclicidad ovárica (RP, postparto reciente) sirvió de diluyente hacia menores valores de concentración de los estándares comerciales suministrados, debido a ello desplazó hacia valores inferiores a aquellos originales de la casa comercial. En el caso del paralelismo observado en las muestras de la dilución 1:1 con suero de vaca de esperables altos niveles de progesterona en sangre debido a cuerpo lúteo funcional y producción de progesterona placentaria (GE) los valores fueron marcadamente superiores a los de la CE.

El acercamiento de la CE y la curva de RP a bajos niveles de concentración al igual que CE con GE a altos valores se deben a imposibilidad de detección por el kit. El valor más bajo

observado fue similar al reportado por Roa *et al.* (1997) quien muestreó vacas en el día del celo que se espera sea similar al valor encontrado en el suero de la vaca RP.

Al comparar estadísticamente las pendientes de las curvas de regresión no se encontraron diferencias ($P > 0,05$) por lo que las tres curvas resultaron iguales.

La reproducibilidad se midió a través del coeficiente de variación intraensayo e interensayo. En ambos casos se utilizó una muestra denominada Control Suero suministrada por el fabricante del Kit comercial. La variabilidad intraensayo resultó, en promedio, de 14,6% (11,5 y 5,4 % para cada una de las corridas respectivamente) y el valor del coeficiente de variación interensayos resultó de 6,5 %. Dado que la tolerancia máxima es de 15% y 10 % respectivamente, ambos estuvieron ajustados a los rangos máximos permisibles (Roa *et al.*, 1997; FAO/AIEA, 1999; Borromeo *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Es posible cuantificar progesterona en suero bovino a través de una prueba de inmunoenzimática diseñada para humanos con valores de variabilidad dentro de lo aceptable para pruebas de referencia, no diagnósticas. La utilidad práctica de la cuantificación de progesterona circulante en los sistemas de producción que aplican seguimiento y control de variables reproductivas permite mejorar la eficiencia del manejo reproductivo y detectar posibles fallas a nivel neuroendocrino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borromeo, V.; Abbate, F.; Berrini, A.; Bartolone, A. and C. Secchi. 2005. Monoclonal antibody capture fluorometric enzyme – linked immunoabsorbent assay for detection of equine growth hormone in plasma. *Vet Res Comm.* 29: 173 – 176.
- FAO/AIEA. 1999. Animal Production and Health. Joint FAO/AIEA Programme. p. 17-23.
- Munro, C. and Stabenfeldt, G. 1984. Development of a microlitre plate enzyme immunoassay for determination of progesterone. *J Endocrin.* 101: 41 – 49.

- Ochoa, R. 2012. Técnicas Inmunoenzimáticas Para Ensayos Clínicos De Vacunas Y Estudios Inmunoepidemiológicos. Finlay. La Habana, Cuba. pp.
- Roa, N.; Linares, T., de Rolo, M. y R. Tamasaukas. 1997. Comparación de la técnica de ELISA vs RIA en la determinación de Progesterona plasmática sanguínea de bovinos. Arch Latinoam Prod Anim. 5: 412 - 414.
- Simersky, R.; Swaczynova, J.; Morris, M.; Franek, M. and M. Stranad. 2007. Development of an ELISA-based kit for the on-farm determination of progesterone in milk. Vet Med. 52: 19 – 28.