

INFORME PROYECTO: Validación del polimorfismo de IGF-I para la predicción de la fertilidad de la vaca lechera en sistemas de producción de leche uruguayos

Equipo técnico: Dra. Ana Meikle¹, Ing Gabriel Rovere², Ing Mariana Carriquiry², Lic. Franciso Peñagaricano², Ing. Fernando Sotelo³, Lic. Paula Nicolini¹, Dr. Daniel Cavestany⁴,
Facultades de ¹Veterinaria, ²Agronomía, ³Mejoramiento Lechero, ⁴INIA

OBJETIVO GENERAL

Validar la asociación de un polimorfismo del factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I) con el largo del anestro posparto y otras variables reproductivas de interés en ganado lechero.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Iniciar la creación de un banco de DNA
2. Determinar las frecuencias de las variantes del gen de IGF-I en el rodeo seleccionado.
3. Validar a nivel poblacional este marcador molecular (variantes del gen IGF-I) como predictor de anestro posparto e índices reproductivos de repercusión económica: intervalo parto primer servicio, intervalo parto concepción, porcentaje de animales preñados a los 100 días posparto.
4. Estudiar la asociación de este marcador molecular con caracteres de interés comercial (producción de sólidos).
5. Estimar la asociación entre medidas endocrinas (progesterona en leche) y tradicionales del anestro posparto (Intervalo parto-primer servicio, Intervalo parto-concepción).

MATERIALES Y METODOS

Selección de Tambos y Vacas

Se seleccionaron 7 tambos para realizar el muestreo: 4 localizados en la región Litoral Norte, 2 en el Departamento de Florida y uno en San José. La selección de los tambos colaboradores se realizó sobre tambos que contando con una base histórica de registros en el INML cumplieran con:

- a) su ubicación geográfica permitiera la planificación de circuitos de control factibles a los recursos humanos y económicos disponibles,
- b) que contaran con un tamaño mínimo de rodeo que permitiera contar con grupos de vacas, pariendo en el período, mayores a 10 animales por lactancia,
- c) aceptaran realizar un manejo reproductivo convencional, utilización de inseminación artificial únicamente; diagnóstico de gestación no más allá de los 70 días post-inseminación, SIN tratamientos hormonales para promover el reinicio de la ciclicidad de las vacas antes de los 90 días posparto. Cumplidos los criterios anteriores se procuró considerar tambos con manejos genéticos y sistemas de producción diferentes. En la Tabla I se describen las características generales de los tambos. En el Anexo I se describe con mayor detalle las características de los tambos en el quinquenio 2005 – 2009.

Tabla I. Valores de vaca masa y en ordeño; litros por vaca y producción total diaria promedio correspondiente al año 2009 (Fuente: INML)

Tambo	Vaca Mása	Vaca Ordeño	Prom. lt/VO	Prod. Diaria
1	982	946	14.9	14092
2	681	609	20.2	12289
3	724	577	16.9	9770
4	378	236	15.4	3623
5	355	300	16.8	5036
6	597	557	20.9	11660
7	1116	974	21.1	20592

Se obtuvieron muestras de sangre de un total de **1338** vacas Holando de 1, 2 y 3 partos únicamente, con partos de otoño 2009; con información genealógica completa hasta tres generaciones. Los animales analizados son hijas de 175 padres provenientes de distintos centros de mejora internacionales (USA; CAN, NZL y NDL) y de cabañas nacionales. Dado que en animales con genealogía completa en la raza Holando, los animales con

consanguinidad cero son poco frecuentes, se aceptaron aquellos con una consanguinidad menor o igual al 2 %. Los antecedentes revisados señalan que a estos niveles de consanguinidad los efectos de la depresión sobre las características analizadas en este informe son negligibles (Wall et al. 2005).

Identificación de los animales y toma de Registros

A todos los animales muestreados se les colocó una banda identificatoria al momento del parto, adicional a su caravana, para facilitar su visualización en la sala de ordeño y así reducir la probabilidad de errores de muestreos. Se registró la condición corporal (BCS) desde 30 días previos al parto hasta 120 días pos-parto, con una frecuencia de al menos una vez cada 30 días. Se utilizó la escala de 5 puntos de Edmonson et al. (1989) (1=flaca, 5= gorda), considerándose subdivisiones de hasta 0,25 puntos dentro de las clases originales. Cabe señalar que se presentaron dificultades en la evaluación de la condición preparto, debido a que el manejo animal preparto no facilita el registro de la condición; los técnicos a cargo nos solicitaron no estresar los animales antes del parto, es decir, no pasarlos por el tubo y la observación se hizo en varias ocasiones a campo abierto. Para minimizar variaciones, todas las observaciones en los 7 tambos las realizó un mismo observador desde 1 mes pre parto hasta el cuarto mes de lactancia¹. Se tomaron registros de escore de locomoción con una frecuencia de una vez por mes y en dos ocasiones. Se revisaron los registros sanitarios del tambo. Los datos productivos y reproductivos fueron aportados por el Instituto Nacional para el Mejoramiento Lechero.

Muestreo de leche y determinación de progesterona

A cada vaca se le tomaron dos muestras de leche por semana entre los 10 y 90 días pos parto. Se realizó la determinación de progesterona en todas las muestras de leche hasta los 60 días posparto (acorde a Petterson y col. 2007 y Royal y col. 2002). Si el animal continuaba en anestro a los 60 días posparto se determinó la concentración de progesterona en todas las muestras hasta los 90 días posparto. Esta modificación de la propuesta internacional se basa en que en varios experimentos realizados previamente en Uruguay (Meikle y col. 2004, 2006, Adrien y col. 2008) un porcentaje importante de animales – especialmente primíparas- no ovulaban durante los primeros 60 días posparto. Las muestras de leche fueron centrifugadas y luego se realizó el radioinmunoensayo en las muestras. Se realizaron 87 ensayos de radioinmunoanálisis (aproximadamente 300 tubos por ensayo) con un total aproximado de 26.100 tubos analizados (incluye muestras, curvas estándares y controles). Las muestras de leche no analizadas de los animales que mostraron actividad ovárica dentro de los 60 días posparto fueron almacenadas junto a las ya analizadas a -20 °C.

Determinación de polimorfismos (SNPs) de IGF-1 mediante PCR en tiempo real.

Se extrajo ADN y se obtuvieron **1338** muestras de ADN de buena calidad (realización de soluciones de almacenamiento y de trabajo). Se determinó el genotipo para IGF-I por PCR en tiempo real - HRM (primera vez que se utilizó esta metodología en nuestro país). En la Figura 1 se muestra como 3 genotipos diferentes del gen bovino IGF-I son discriminados por el equipo. La fluorescencia se ha normalizado a un genotipo (AA, línea de base), uno de los genotipos (AB) se encuentra por encima del genotipo normalizado, mientras que el otro genotipo (BB) se encuentra por debajo. En la tabla incluida en la Figura 1, se observa el porcentaje de confianza (confidence) con la que el equipo determina el genotipo de diferentes muestras.

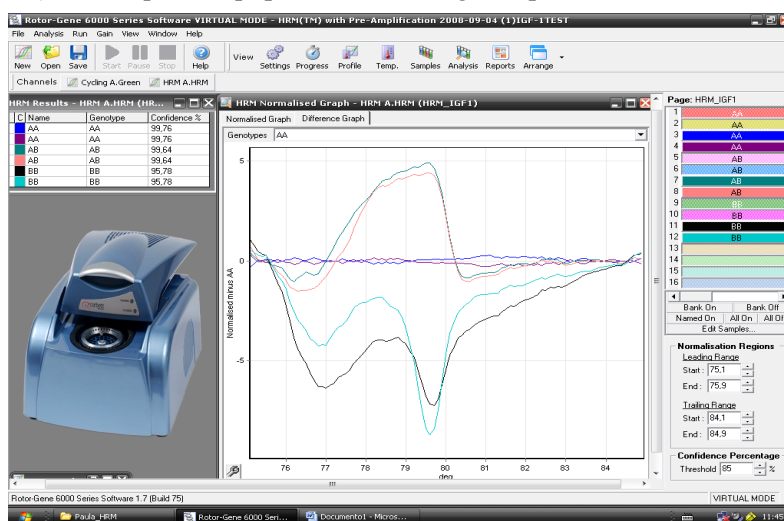


Figura 1. Gráfico de las fluorescencias normalizadas al genotipo AA del gen IGF-1

¹Esto incrementó los costos de transporte, la idea original era que lo realizaran los becarios responsables del muestreo de leche.

En la puesta a punto, el equipo identificó todas las muestras control correctamente: estas muestras habían sido genotipadas previamente por el método de la detección del polimorfismo del largo del fragmento de restricción (RFLP), que implica la amplificación del fragmento del gen en cuestión, la escisión por una enzima de restricción y la observación de los diferentes fragmentos obtenidos (correspondientes a los diferentes genotipos) en un gel de agarosa.

Modelos estadísticos analizados

El cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas para el gen IGF1, así como la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg y la prueba de homogeneidad en la distribución de las frecuencias génicas entre tambos se realizó aplicando el programa POPGENE 32 v1.31 (Yeh y col. 1999). Los análisis estadísticos se realizaron todos en forma paralela con el procedimiento PROC MIXED, de SAS, versión, 9.1 y en con el paquete LME4 de R, versión 2.11.1. En las tablas y figuras se presentan los promedios corregidos y los errores estandares pooleados. Se consideró significativo cuando $P < 0.05$. Las diferencias entre tambos, categorías, genotipos, períodos o interacciones se analizaron con el Test de Tukey-Kramer.

En la Tabla II se presenta las clases del efecto combinado del número de lactancia, edad al parto e intervalo inter-parto previo.

Tabla II. Clasificación realizada en base al número de lactancia (L), la edad al parto (para primíparas) y el intervalo interparto (IIP, múltiparas). Se indica el número de animales (n) en cada categoría:

LACTANCIA (L)	EDAD (meses)	IIP (días)	CATEGORIA (n)
1	1 (20-28)	1 (sin)	I (n=123)
	2 (28-35)		II (n=210)
	3 (> 35)		III (n=88)
subtotal			421
2	4	$2 \leq 380$	IV (n=104)
		$3 > 380 \leq 540$	V (n=119)
		$4 > 540$	VI (n=50)
subtotal			273
3	5	$2 \leq 380$	VII (n=67)
		$3 > 380 \leq 540$	VIII (n=61)
		$4 > 540$	IX (n=62)
subtotal			190
TOTAL			884

Los siguientes criterios fueron adoptados para definir el reinicio de la actividad ovárica:

- Se consideró una muestra luteal (presencia de tejido luteal activo que secreta progesterona) cuando las concentraciones de progesterona en leche descremada fueron iguales o superiores a 1 nmol/L.
- Se consideró reinicio a la ciclicidad ovárica el día en el cual se registró la primera muestra luteal luego del parto siempre y cuando esta fuera acompañada de una segunda muestra luteal y consecutiva con concentraciones iguales o superiores a 1 nmol/L.

- En los animales que no presentaron niveles luteales de progesterona a los 90 días pos-parto se tomó la última muestra como dato de reinicio calificando este tipo de registro de forma diferencial. Esta definición de reinicio, determinado por el investigador, se basó en trabajos previos (Meikle y col. 2004).

Para considerar el nivel de producción de leche en los modelos analizados se optó por generar un efecto clasificatorio de tres clases. Para eso se calcularon los percentiles 33 y 66 para Leche acumulada 100 días (L100) en cada tambo, para todo el rodeo, para partos ocurridos entre los meses de febrero y junio de 2009. Cada vaca fue clasificada en una de tres clases acorde a su L100. La información de L100 para todos los animales, así como, los animales considerados en el cálculo para cada tambo (todos los animales y no solo las vacas seleccionadas para este ensayo) fue provista por el INML.

Se analizaron las siguientes variables con los modelos mixtos que se describen a continuación, se mantuvieron interacciones solo cuando estas presentaron un valor $P < 0.15$:

1) *Leche acumulada a 100 días de lactancia, (L100)* acorde a:

$$L100_{ijklm} = T_i + LEI_j + G_k + b_1(CC_p) + b_2(DCC_{45d-p}) + P_m + e_{ijklm}$$

Donde:

- T_i = Efecto fijo del tambo, 7 niveles.
- LEI_j = Efecto fijo combinado del numero de lactancia, edad al parto e intervalo entre parto previo en la lactancias correspondiente, 9 niveles.
- G_k = Efecto fijo del genotipo para IGF-I, 3 niveles
- CC_p = Efecto fijo de la condición corporal al parto
- DCC_{45d-p} = Efecto fijo de la variación de condición corporal entre el parto y 45 días pos-parto.
- P_m = Efecto aleatorio del padre de la vaca, varió entre 160 y 170 niveles
- b_1, b_2, b_3 = coeficientes de regresión lineales fijos
- e_{ijklmn} = error aleatorio asociado a cada observación

2) *Condición Corporal (CC)*

La CC se analizó por un procedimiento mixto que incluyó en el modelo:

$$CC_{ijklm} = T_i + LEI_j + G_k + Per_l + LEI*Per_l + Gen*Per + NP_l + P_m + e_{ijklm}$$

Donde:

- Per = Efecto fijo del período respecto del parto, 6 niveles.
- NP_l = efecto fijo de nivel de producción de leche definido anteriormente, 3 niveles.
- Dos interacciones fueron menores a $P < 0.15$ y se mantuvieron en el modelo:
- $LEI*Per_l$ = Interacción entre categoría y período respecto del parto
- $Gen*Per$ = Interacción entre genotipo y periodo respecto del parto.

3) *Variables endocrinas asociadas a la determinación de progesterona*

- a) Reinicio de la ciclicidad ovárica o Longitud del Anestro (logaritmo natural), definido como el intervalo de tiempo entre el parto y la primera muestra con concentraciones luteales de progesterona

$$Anestro_{ijklmn} = T_i + LEI_j + G_k + b_1(CC_p) + b_2(DCC_{45d-p}) + NP_l + P_m + e_{ijklmn}$$

Donde,

- NP_l = Efecto fijo del nivel de producción de leche, 3 niveles
- DCC_{xxd-p} = Efecto fijo de la variación de condición corporal entre el parto y la condición corporal pos-parto al día al cual se calculo el logit, o sea, cuando se estimó la regresión logística para 30 días pos-parto, la variación de la condición corporal fue calculada entre el parto y el día 30 pos-parto y así, sucesivamente, para 45, 60, 75 y 90 días pos-parto.

- b) Probabilidad de reinicio $ijklmn = T_i + LEI_j + G_k + b_1(CC_p) + b_2(DCC_{xxd-p}) + NP_l + P_m + e_{ijklmn}$

Se analizó la probabilidad de reinicio (PR), donde $PR = \text{Logit}(P(i)/1-P(i))$, estudiándola a diferentes días posparto 30, 45, 60, 75 y 90 días.

- c) Proporción de muestras luteales (positivas a progesterona) en el total de muestras de la vaca a 60 días pos-parto, PML60

$$PML60_{ijklmn} = T_i + LEI_j + G_k + b_1(CC_p) + b_2(DCC_{45d-p}) + NP_l + P_m + e_{ijklmn}$$

d) Concentración promedio de progesterona a 60 días pos-parto (CP4), definida como la suma de la concentración de todas las muestras dividido el total de muestras de la vaca hasta 60 días pos-parto.

$$CP4_{ijklmn} = T_i + LEI_j + G_k + b_1(CC_p) + b_2(DCC_{45d-p}) + NP_1 + P_m + e_{ijklmn}$$

e) Concentración promedio de progesterona de las muestras luteales a 60 días pos-parto (CLP4), definida como la suma de la concentración de P4 de las muestras luteales dividido el total de muestras luteales de la vaca hasta los 60 días pos-parto.

$$CLP4_{ijklmn} = T_i + LEI_j + G_k + b_1(CC_p) + b_2(DCC_{45d-p}) + NP_1 + P_m + e_{ijklmn}$$

4) Índices de fertilidad

a) Probabilidad de preñez a los 100 días posparto: Logit ($P(i)/1-P(i)$) de preñez a 100 días pos-parto, asumiendo una gestación fija de 283 días

$$PP100d_{ijklmn} = T_i + LEI_j + G_k + b_1(CC_p) + b_2(DCC_{60d-p}) + NP_1 + b_3 PML60 + P_m + e_{ijklmn}$$

Se señala que se incluye en el modelo la proporción de muestras luteales en los 60 días posparto (PML60).

b) Intervalo parto primer servicio (IP1S)

$$IP1S_{ijklmn} = T_i + LEI_j + G_k + b_1(CC_p) + b_2(DCC_{45d-p}) + NP_1 + b_3 PML60 + NP_1 * LEI_j + P_m + e_{ijklmn}$$

Una interacción fue menor a $P < 0.15$ y se mantuvo en el modelo:
 $NP_1 * LEI_j$: interacción categoría animal y nivel de producción de leche

c) Intervalo parto concepción (IPC) en los primeros 100 días posparto

$$IPC_{ijklmn} = T_i + LEI_j + G_k + b_1(CC_p) + b_2(DCC_{45d-p}) + NP_1 + b_3 PML60 + LEI_j * G_k + P_m + e_{ijklmn}$$

Una interacción fue menor a $P < 0.15$ y se mantuvo en el modelo:
 $LEI_j * G_k$: interacción categoría animal y genotipo

RESULTADOS

1) Frecuencias genotípicas de IGF-1 para cada tambo y vacas consideradas en el ensayo

En la tabla III se describen las genotípicas de IGF-I del rodeo analizado. En todos los tambos el genotipo AB fue el más frecuente, seguido por AA y por último por BB. La mayoría de los tambos (6/7) está en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$) para el gen IGF1, excepto el tambo 3 ($p = 0.04$), explicándose este desvío por un exceso de heterocigotos. No se hallaron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas de IGF1 entre los tambos 1, 4, 5, 6 y 7 ($p = 0.88$), los cuales pueden ser considerados como una misma población que se diferencia del tambo 3 ($p = 0.035$) y muestra una tendencia a diferenciarse del tambo 2 ($p = 0.056$). Asimismo, existe una marcada diferenciación entre los tambos 2 y 3 ($p = 0.00034$). Esto denota la presencia de algún grado de estructuración genética entre estos 3 grupos para el gen IGF1.

Tabla III. Número de animales por tambo y genotipo de IGF-1 (porcentaje entre paréntesis)

Tambo	AA	AB	BB	Sin genotipear	Total
1 (Paysandú)	114 (36%)	151 (47.6%)	52 (16.4%)	14	331
2(Paysandú)	56 (28%)	103 (51.5%)	41 (20.5%)	3	203
3 (Paysandú)	77 (40.7%)	97 (51.3%)	15 (8%)	2	191
4 (Paysandú)	39 (39%)	42 (42 %)	19 (19%)	8	108
5 (Florida)	36 (31.9%)	56 (49.6%)	21 (18.5%)	0	113
6 (Florida)	58 (34.5%)	86 (51.2%)	24 (14.3%)	0	168
7 (San José)	85 (38%)	103 (46 %)	36 (16%)	0	224
TOTAL	465 (35.3%)	638 (48.7%)	208 (16%)	27	1338

En tabla IV se presenta el período de partos considerado para cada tambo.

Tabla IV. Período de partos considerado en cada tambo colaborador

Tambo	1	2	3	4	5	6	7
Inicio	16/02/09	25/02/09	17/02/09	23/02/09	25/02/09	11/02/09	01/02/09
Fin	30/04/09	18/06/09	01/06/09	09/07/09	26/06/09	23/06/09	25/03/09

En la Tabla V se detallan el número de animales genotipados y los que finalmente quedaron incluidos en el ensayo. Se observa como algunos tambos presentan un bajo porcentaje de animales considerados finalmente dentro del ensayo. El tambo 1 solicitó no incluir partos posteriores al ultimo día de abril (partos marzo/abril) por lo que los partos de Mayo y posteriores no pudieron incluirse. El tambo 7 resultó ser un tambo comercial complejo para ser realizar muestreos de leche dos veces por semana y cumplir con el protocolo convenido. Por dicho motivo, el seguimiento de este tambo se abandonó en abril y aproximadamente el 50 % de los animales muestreados posee datos solo hasta 60 días posparto.

Tabla V. Número de animales con y sin longitud del anestro determinado por tambo.

TAMBOS	1	2	3	4	5	6	7	TOTALES
No vacas genotipadas	317	200	189	100	113	168	224	1311
No vacas con anestro (inc 90 dpp)	151	166	182	90	88	105	42	824
No vacas con anestro (inc 60 dpp)	151	171	187	100	96	110	84	899
No vacas con registros clínicos	66	63	129	67	61	sin datos	6	331
No vacas fuera ensayo	166	34	46	43	25	63	182	559
DENTRO DEL ENSAYO %	47.6	85.5	82.0	75.2	85.0	65.5	37.5	65.0

2) Comentarios Generales

En la tabla VI se muestran los valores P para los efectos fijos para cada variable. El tambo, la categoría, la condición corporal al parto y los cambios en la condición corporal afectaron la mayoría de las variables de respuesta. El genotipo tendió a afectar el intervalo parto primer servicio y la proporción de muestras luteales. El nivel de producción de leche afectó la condición corporal.

Tabla VI. Número de observaciones (n) para cada variable y valor P de los efectos fijos: tambo, Genotipo (Gen), categoría animal (Categ), condición corporal al parto (CCp), Cambios en la condición corporal (Δ CC), nivel productivo (NP), proporción de muestras luteales (PML). Se incluye la correlación (Corr) entre predichos y observados de los modelos.

	n	Tambo	Gen	Categ	CCp	Δ CC	NP	PML	Corr
Leche 100 días	778	***	NS	***	NS	**	-----	-----	0.829
Cond. Corporal ^o	3243	***	NS	NS	-----	-----	*	-----	0.530
Longitud Anestro	741	***	NS	***	***	***	NS	-----	0.608
Probabilidad de reinicio									
30 días	799	***	NS	***	***	***	**		
45 días	778	***	NS	**	***	***	0.16	-----	
60 días	776	***	NS	**	***	***	NS		
75 días	742	***	NS	**	***	***	NS		
90 días	676	***	NS	**	***	***	0.06		
Proporción de muestras luteales sobre totales	778	***	0.119	**	***	***	0.17	-----	0.637
Concentración P4	778	***	NS	NS	***	***	NS	-----	0.634
Concentración P4 muestras luteales ^o	778	***	NS	NS	***	***	0.102	-----	0.514
Probabilidad preñez 100 d	736	**	NS	**	***	***	NS	***	

Intervalo parto primer servicio [®]	711	***	0.073	0.063	***	**	NS	***	0.549
Intervalo parto concepción 120 días [□]	264	***	0.085	***	***	**	NS	*	0.673

*=P<0.05; **=P<0.01; ***=P<0.001

[◇] En el análisis de la condición corporal se encontró una interacción entre categoría y período P<0.01 y entre genotipo y período de P=0.15.

[∅] En el análisis de la concentración de progesterona en muestras luteales se encontró una interacción entre el nivel de producción y la categoría animal de P=0.08.

[®] En el análisis del parto primer servicio, se encontró una interacción entre nivel de producción y categoría animal de P=0.06.

[□] En el análisis del intervalo parto concepción, se encontró una interacción entre el genotipo y categoría animal de P=0.106 (esta no se analizó debido al bajo número de animales BB para algunas categorías).

3) Producción de leche acumulada en los 100 días posparto

El rango de producción en los primeros 100 días de lactancia de los tambos estudiados fueron de 1452±68 a 2818±47 litros. No se encontró un efecto del genotipo, ni interacciones. En la figura 2 se muestra la producción en las diferentes categorías animales consideradas. Vacas de primer parto de mayor edad produjeron más leche que las más jóvenes. Vacas de segunda y tercera lactancia con intervalos inter-partos mayores a 380 días presentaron una mayor producción de leche que vacas con intervalos inter-partos cortos. La BCS al parto no fue significativa, pero la pérdida de un punto en la condición corporal estimó un efecto de más 208 litros en los primeros 100 días posparto (P=0.0071).

Figura 2: Producción de leche acumulada a 100 días en vacas primíparas (L1) de diferentes edades; y en vacas de dos (L2) y tres (L3) partos con distintos intervalos entre partos (IIP).

Las 3 categorías realizadas acorde a la producción de leche acumulada en 100 días para cada tambo fueron (X y rango): Alta (2681 L, 1457 a 4827 L, n=249), Media (2243 L, 1166 a 3337 L, n= 265) y Baja (1738, 510 a 2869, n=264).

4) Condición Corporal

De forma descriptiva se muestra en la Figura 3, la evolución de BCS en cada tambo. Exceptuando el tambo 7, el resto presentó la típica evolución de BCS: pérdida de condición corporal alrededor del parto. Exceptuando los tambos 1 y 6, los tambos presentan una baja BCS al parto.

Figura 3: Evolución de la condición corporal en los tambos.

La condición corporal en el parto fue menor en las vacas multíparas con intervalos cortos (IIP<380) que el resto de las categorías, incluidas las primíparas. Las vacas primíparas más jóvenes presentaron una menor condición corporal al parto y a los 30 días posparto que las primíparas más viejas (ver asteriscos en Fig 4 panel superior). Las vacas multíparas con intervalos interpartos cortos (IIP<380) a pesar de presentar una menor condición corporal previo al parto, presentaron un mejor estado a los 4 meses posparto que el resto de las multíparas (Fig 4 panel superior, asteriscos).

Figura 4: Evolución de la condición corporal (CC) en vacas primíparas (L1) de diferentes edades; y en vacas de dos (L2) y tres (L3) partos con distintos intervalos entre partos (IIP). Asteriscos, $P<0.05$.

El genotipo AA presentó una menor condición al parto que el genotipo AB y BB ($P<0.05$), mientras que el genotipo BB tendió a presentar una peor condición que el genotipo AB a los tres y cuatro meses posparto ($P=0.08$).

Figura 5: Evolución de la condición corporal (CC) acorde a los genotipos AA, AB y BB.

5) Variables endocrinas asociadas a la determinación de progesterona

A) Longitud del anestro

En la Figura 6 se muestra la frecuencia de la longitud del anestro cada 10 días luego del parto. La última barra que se observa en el gráfico (>90 días) representa aquellos animales que se encontraban en anestro a los 90 días posparto.

Figura 6. Distribución de frecuencias para el comienzo de la actividad luteal (días).

De forma descriptiva se muestra en la Figura 7, la longitud del anestro acorde al número de lactancia en cada tambo analizado. El anestro en algunos tambos, es el descrito como fisiológico, 30 a 40 días (Lucy y col. 2003). En los tambos que presentan anestros más cortos, las vacas primíparas tienen un anestro de duración similar a vacas multíparas, mientras que en los otros, las primíparas presentan un anestro más prolongado (Figura 7).

Figura 7. Longitud del anestro (días) en lactancias de un (L1), dos (L2) o tres (L3) partos en los 7 tambos.

La categoría animal fue significativa: la edad en las vacas primíparas tendió a afectar la duración del anestro, las más jóvenes con anestros más largos. En el caso de vacas multíparas el intervalo interpartos previo resultó significativo presentando menores longitudes de anestro aquellos animales con intervalos entre-partos más cortos (Figura 8).

Figura 8. Longitud del anestro posparto acorde en vacas primíparas (L1) de diferentes edades; y en vacas de dos (L2) y tres (L3) partos con diferentes intervalos entre partos (IIP). a vs b vs c, $P < 0.05$. x vs y, $P = 0.066$.

B) Probabilidad de Reinicio de la Ciclicidad Ovárica

En el análisis de regresión logística de la probabilidad de reinicio a la ciclicidad ovárica no se observó efecto del genotipo. Se observaron efectos significativos del tambo y categoría animal ($P < 0.0001$ para ambos). La CC al parto y la variación de la CC al punto estimado fue significativa para todos los días posparto estudiados.

Figura 9. Probabilidad de reinicio en los diferentes tambos.

La probabilidad de reinicio fue afectada por la categoría (Figura 10), las diferencias mas marcadas se observaron en la probabilidad de reinicio de las primíparas más jóvenes que fue menor a los 45, 60 y 75 días posparto. En multíparas de tres partos, las vacas con IIP más largos presentaron una menor probabilidad de reinicio a los 75 y 90 días posparto que las vacas con IIP más cortos.

Figura 10. Probabilidad de reinicio a la ciclicidad ovárica en vacas primíparas (L1) de diferentes edades (panel superior); y en vacas de dos (L2, panel medio) y tres (L3, panel inferior) partos con diferentes intervalos entre partos (IIP) asteriscos $P < 0.05$.

Además la probabilidad fue afectada por el nivel de producción de leche. A los 30 días luego del parto, vacas con un alto nivel de producción presentaron una menor probabilidad de reinicio de la ciclicidad que las de a medio nivel de producción, no diferenciándose ninguna de estas con las de bajo nivel de producción.

C) Número de muestras luteales/totales y concentración de progesterona en los primeros 60 días posparto

Esta variable estuvo afectada por tambo, la categoría animal, la condición corporal al parto y los cambios de condición corporal. El efecto del genotipo presentó una $P=0.11$, presentando el genotipo AB mayor número de muestras luteales/totales que el genotipo AA ($P=0.03$). El nivel de producción de leche presentó un valor $P=0.17$; los análisis de Tukey mostraron que vacas mas productoras tendieron a presentar menor proporción de muestras luteales sobre totales que los vacas con producción media ($P=0.089$) o baja ($P=0.115$).

La concentración de progesterona promedio de todas las muestras de leche en los 60 días fue afectada por el tambo, la BCS al parto y las variaciones de BCS ($P<0.0001$). La categoría animal, el genotipo y el nivel de producción de leche no afectaron la concentración de progesterona promedio.

La concentración de progesterona promedio en muestras luteales en los 60 días fue afectada por el tambo, la BCS al parto y las variaciones de BCS, pero la categoría animal y el genotipo no la afectaron. La interacción entre la categoría animal y el nivel de producción presento un valor de $P=0.08$: las vacas primíparas de > 35 meses, con menor nivel de producción presentaron menor concentración de progesterona que las de producción media y mayor. De forma similar, en animales de dos partos con IIP cortos y de baja producción tendieron ($P=0.07$) a menores concentraciones de progesterona que los de producción media. En cambio, en animales de dos partos con IIP largos, los animales de alta producción presentaron menor concentración de progesterona que los de media producción.

IV) Índices de Fertilidad

a) Probabilidad de preñez 100 días posparto

La condición corporal al parto (ver tabla VII), la variación de la BCS, el numero de muestras luteales/totales, tambo y categoría animal afectaron la probabilidad de preñez en los primeros 100 días posparto. El genotipo no afectó la probabilidad de preñez ($P=0.21$), en la comparación el genotipo AA tendió ($P=0.107$) a presentar una menor probabilidad de preñez que el genotipo BB. El nivel de producción no afectó la probabilidad de preñez.

Tabla VII. Porcentaje de preñez en los primeros 100 días posparto acorde a la condición corporal al parto.

CC al parto	2.25	2.5	2.75	3	3.25
Porcentaje de preñez en primeros 100 dpp	4 %	14.3%	16.3%	22%	42.7 %
Número animales	49	217	203	141	126

La categoría animal afectó la probabilidad de preñez. Las vacas de dos y tres partos con intervalos entre partos largos (IIP > 540 días) presentaron menores probabilidades de preñez en los primeros 100 días que animales con intervalo entre parto cortos (IIP <380 días) o medianos (IIP $>380<540$ días).

Figura 11. Probabilidad de preñez en vacas primíparas (L1) de diferentes edades; y en vacas de dos (L2) y tres (L3) partos con diferentes intervalos entre partos (IIP). a vs b vs c, $P<0.05$.

b) Intervalo parto primer servicio

El IPS estuvo afectados por el tambo, la BCS al parto, las variaciones de la BCS, y el número de muestras luteales/totales. El aumento del porcentaje de muestras luteales respecto a las totales en los primeros 60 días posparto impactó sobre el IPS, el aumento de fracción de 0 a 1 de muestras luteales/totales implicó una disminución del IPS de 67 días.

El genotipo tendió a afectar el IPS ($P=0.07$), las vacas BB presentaron ($P=0.02$) o tendieron ($P=0.06$) a presentar un menor período que las AA y las AB respectivamente (Figura 12).

Figura 12. Intervalos parto primer servicio. a vs b, $P<0.05$, x vs y $P=0.06$

La categoría animal tendió a afectar el IPS ($P=0.06$). Las vacas de tres partos con intervalos más cortos presentaron IPS más cortos que el resto de las categorías (Figura 13).

Figura 13. Intervalo parto primer servicio en vacas primíparas (L1) de diferentes edades; y en vacas de dos (L2) y tres (L3) partos con diferentes intervalos entre partos (IIP). a vs b vs c, $P<0.05$.

Se encontró una interacción entre la categoría animal y el nivel productivo ($P=0.06$); las vacas primíparas mas jóvenes (L1 20-28 meses) con menor nivel de producción presentaron intervalos parto primer servicio mas cortos que las de medio nivel de producción (94 vs 126 días resp). Lo mismo ocurrió con animales de dos partos con intervalos entre partos cortos (L2 IIP <380 días, 105 vs 124 días resp). Sin embargo, en vacas de dos partos con IIP entre 380 y 540 días fueron las vacas de menor producción las que presentaron un intervalo primer servicio mas largo que las de nivel productivo medio o alto (122 vs 107 y 99 días resp).

Intervalo parto concepción en los primeros 100 días

El intervalo parto concepción tendió a estar afectado por el genotipo ($P=0.08$), presentando las vacas BB un intervalo mas corto que las AA, pero no diferente que las AB (96.7 ± 6 , 103 ± 3 y 112 ± 4 días para BB, AB y AA respectivamente). El aumento del porcentaje de muestras luteales respecto a las totales en los primeros 60 días posparto implicó una disminución del IPC de 21 días. La categoría afectó el IPC, siendo en vacas de dos partos con IIP >380 días y < 540, menor que las de IIP > 540 días. En vacas de tres partos, las vacas con IIP > 540 días presentaron un IPC mas largo que las de IIP < 380 días.

Figura 14. Intervalo parto concepción en vacas primíparas (L1) de diferentes edades; y en vacas de dos (L2) y tres (L3) partos con diferentes intervalos entre partos (IIP). a vs b vs c, $P<0.05$.

RESUMEN

Tambo:

Considerando ambientes extremos, los tambos que presentaron baja producción de leche, presentaron menor BCS promedio, longitudes de anestro más largas y en general peores índices reproductivos. Se destaca el tambo 5 que si bien tiene una menor producción de leche y una larga longitud de anestro y presenta índices reproductivos muy buenos.

Categoría:

Afectó casi todas las variables, exceptuando la concentración de progesterona.

Las vacas primíparas más jóvenes presentaron los anestros más largos consistentes con el menor BCS encontrado al parto y mes posparto. Sin embargo, tendieron a presentar IPS más cortas que el resto de las primíparas, pero se debe tener en cuenta que ya a los 60 días posparto no se encontraron diferencias en BCS y que esta categoría fue la que produjo menos leche en los primeros 100 dpp.

Las vacas multíparas con intervalos partos más cortos presentaron anestros más cortos, y produjeron menos leche que las vacas con IIP medios o largos. Vacas multíparas (2 y 3 partos) con IIP cortos, presentaron mayores probabilidades de preñez e IPC más cortos que las de IIP largos, sugiriendo que la fertilidad es un evento “repetible”. Este patrón también se observó en IPS para vacas de 3 partos, pero no se observaron diferencias en vacas de dos partos. Más aun, en vacas con IIP cortos, la paridad afectó el IPS ya que las de dos partos presentaron intervalos más largos, se puede sugerir que los animales de 2 partos aun están en desarrollo pudiendo esto afectar alguna de estas variables.

Genotipo:

El genotipo aislado tendió a afectar el intervalo parto primer servicio: las vacas BB presentaron o tendieron a presentar un menor período que las AA y las AB respectivamente. Para intervalo parto concepción solo las BB tendieron a presentar un menor período que las AA. El intervalo parto concepción tendió a estar afectado en el mismo sentido. Estos datos son consistentes con la comparación Tukey encontrada en la menor probabilidad de preñez en el genotipo AA respecto del genotipo BB.

Condición corporal y cambios en la condición corporal:

Afectaron casi todas las variables de interés reproductivo, aspecto ya conocido.

REFERENCIAS

- Adrien ML, Mattiauda, DA, Artegoitia, V; Carriquiry, M; Bentancur, O; Meikle, A. Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of postpartum ovarian cyclicity and metabolic parameters. 2011. Animal in press.
- Edmonson, A.J., Lean, L.J., Weaver, L.D., Farver T and Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. J Dairy Sci. 72: 68-78.
- Meikle, A., Kulcsar, M., Chilliard, Y., Febel, H., Delavaud, C., Cavestany, D. (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. Reproduction. 127, 727–37.
- Petersson KJ, Berglund B, Strandberg E, Gustafsson H, Flint AP, Woolliams JA, Royal MD. Genetic analysis of postpartum measures of luteal activity in dairy cows. J Dairy Sci. 2007, 90(1):427-34
- Royal, M.D., Flint, A.P.F. & Woolliams, J.A. 2002. Genetic and phenotypic relationships among endocrine and traditional fertility traits and production traits in Holstein-Friesian dairy cows. Journal of Dairy Science 85, 958-967.
- Wall E, Brotherstone S, Kearney JF, Woolliams, JA, Coffey MP. 2005. Impact of Nonadditive genetics effects in the estimation of breeding values for fertility and correlated traits. J Dairy Sci 88, 376-385.

Wathes, D., Cheng, Z., Bourne, N., Taylor, V., Coffey, M., Brotherstone, S. (2007a). Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domestic Animal Endocrinology*. 33, 203–225.