

Efecto del genotipo IGF-I sobre la producción de leche y la endocrinología metabólica en el período de transición en vacas lecheras en condiciones pastoriles

Effect of IGF-I genotype on milk production and the metabolic endocrinology in the transition period in dairy cows in pastoral conditions

Nicolini, P¹; Chilibroste, P²; Laborde, D³; Meikle A^{1*}

Recibido: 30/01/2013
Aprobado: 18/02/2013

RESUMEN

El presente trabajo investigó el efecto del polimorfismo AF017143 del gen IGF-I sobre los perfiles metabólicos y endocrinos durante el período de transición y la producción de leche en vacas lecheras en condiciones pastoriles. Se tomaron muestras de sangre durante el período -20 a +40 días respecto al parto a 32 vacas primíparas. Los datos se analizaron por un análisis de medidas repetidas en el tiempo incluyendo el genotipo de IGF-I, período respecto al parto e interacción entre ambos. Las frecuencias de los alelos A y B fueron 0,56 y 0,44, respectivamente. Las vacas del genotipo AA produjeron más leche ($P < 0,05$) que las vacas AB y BB ($20,3 \pm 0,7$ vs $18,2 \pm 0,8$ y $17,2 \pm 1,2$ L/día,

SUMMARY

The present study investigated the effect of IGF-I AF017143 polymorphism on metabolic and endocrine profiles during the transition period and on milk production in dairy cows under grazing conditions. Blood samples were taken during a period of -20 to +40 days from calving from 32 dairy primiparous cows. Data was analyzed by a repeated measures analysis with a mixed model including IGF-I genotype, days regarding calving and interactions. Allelic frequencies were 0.56 for A and 0.44 for B. Cows with AA genotype produced more milk ($P < 0.05$) than cows with AB or BB genotypes (20.3 ± 0.7 vs. 18.2 ± 0.8 and 17.2 ± 1.2 L/day), that did not differ. Protein and fat percentage

¹Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, A. Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: paula.nicolini@gmail.com. ²Departamento de Ciencia Animal. Producción y utilización de Forrajes. Estación Experimental Mario A. Cassinoni. Ruta 3, km 363, Paysandú, CP 60000, Uruguay. Correo electrónico: pchili@adinet.com.uy.

³Profesión liberal. Correo electrónico: dlaborde@adinet.com.uy

*Autor para correspondencia: Ana Meikle. Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, A. Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: anamei@adinet.com.uy

respectivamente) que no difirieron entre si. Los porcentajes de proteína y grasa en leche no fueron afectados por el genotipo. Las concentraciones de insulina e IGF-I, ácidos grasos no esterificados (NEFA), colesterol y albúmina no fueron afectadas por genotipo, pero fueron afectadas por el período respecto del parto con concentraciones bajas en el preparto o parto, con excepción de los NEFA que disminuyeron a lo largo del ensayo. El genotipo afectó las concentraciones de b-hidroxibutirato (BHB, $P<0,01$) y proteínas plasmáticas totales ($P=0,062$), las vacas AB presentaron mayores concentraciones de BHB y menores de proteínas respecto de las AA y BB ($0,88\pm0,11$ vs $0,57\pm0,09$ y $0,46\pm0,07$ mM; $71,7\pm0,8$ vs $73,8\pm1,0$ y $74,6\pm0,9$ g/L, respectivamente). Este estudio muestra que el polimorfismo AF017143 del gen IGF-I puede afectar la producción y el metabolismo en vacas primíparas en pastoreo controlado.

PALABRAS CLAVE:

Polimorfismos, IGF-I, vaca lechera, producción de leche

INTRODUCCIÓN

La transición del estado preñada no lactante al no preñado lactante (3 semanas pre y posparto, Drackley, 1999) es un período de cambios dramáticos para la vaca, la cual debe adaptar su metabolismo a las fuertes exigencias que le demanda la producción.

in milk were not affected by genotype. Insulin, IGF-I, cholesterol, albumin and non-esterified fatty acids (NEFA) concentrations were not affected by genotype, but were affected by days related to calving as low concentrations of these variables were found around calving, except for NEFA concentrations that decreased throughout the experiment. The genotype affected b-hydroxybutirate (BHB, $P<0.01$) and total plasmatic proteins ($P=0.062$) concentrations; AB cows had greater BHB and lower protein concentrations than AA and BB cows (0.88 ± 0.11 vs. 0.57 ± 0.09 and 0.46 ± 0.07 mM; 71.7 ± 0.8 vs. 73.8 ± 1.0 and 74.6 ± 0.9 g/L, respectively). This study shows that IGF-I AF017143 polymorphism may affect milk production and metabolism in primiparous cows under grazing conditions.

KEYWORDS:

Polymorphisms, IGF-I, dairy cow

A la alta demanda metabólica por producción de leche se le suma la disminución (~ 30%) del consumo previo al parto (Grummer, 1995) que promueve la movilización de reservas corporales, es decir, el balance energético negativo (BEN). Esta lipomovilización se visualiza en los niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y β -hidroxibutirato (BHB) que aumentan en el periparto (Chilliard y col., 1998; Cavestany y col., 2005).

Los cambios en el metabolismo de los tejidos/órganos del cuerpo necesarios para apoyar una función fisiológica específica (homeorresis, Bauman y Currie, 1980), aseguran la uniformidad del flujo de nutrientes en apoyo de la lactancia. Esta partición de nutrientes es comandada por señales hormonales. La hormona homeorrética responsable de la síntesis y persistencia de la lactación es la hormona del crecimiento (GH), que por un mecanismo de desacople con su mediador hepático, el factor de crecimiento similar a la insulina - I (IGF-I), regula la partición de nutrientes favoreciendo la lactogénesis (Lucy y col., 2009); las concentraciones de GH aumentan y las de IGF-I disminuyen en el posparto temprano (Rhoads y col., 2004), estimulando así el catabolismo de los tejidos periféricos. La insulina modula este desacople ya que sensibiliza al hígado a la acción de la GH (Rhoads y col., 2004) y es una hormona anabólica que promueve el uso de glucosa por los tejidos periféricos (Bauman y Currie, 1980).

El IGF-I regula el metabolismo y la producción de leche, por lo tanto ha sido considerado un gen candidato para la identificación de marcadores moleculares potencialmente asociados con caracteres fenotípicos de interés comercial. Se ha descrito un polimorfismo (T, alelo A, por C, alelo B) en la regi-

ón promotora del gen IGF-I (AF017143, Ge y col., 1997). Existen escasos reportes respecto de la relación de éste polimorfismo y producción de leche. Hines y col. (1998) no encontraron ninguna asociación, mientras que Siadkowska y col. (2006) reportaron que vacas con el genotipo AB producen más leche corregida por grasa (FCM) que las vacas AA o BB. Recientemente nuestro grupo reportó una tendencia a mayor FCM en vacas multíparas AB respecto vacas AA, pero esto no se observó en las vacas primíparas (Ruprechter y col., 2011). Estudios que investiguen las bases fisiológicas de las diferencias en producción son aún más escasos. En bovinos en crecimiento, se reportaron concentraciones más bajas o más altas de IGF-I en genotipos BB respecto AA (Ge y col., 2001; Maj y col., 2008, respectivamente). En vacas lecheras durante el período de transición, Ruprechter y col. (2011) reportaron que el genotipo BB presentó menores concentraciones de NEFA y BHB y concentraciones más altas de insulina (mejor estado energético) que los otros genotipos en vacas primíparas, pero esto no se asoció con diferencias en producción. Además, esto no ocurrió en multíparas donde se reportó un mayor desacople de IGF-I en los genotipos BB y AB respecto del AA (Ruprechter y col., 2011). Como este polimorfismo se localiza en la región promotora del gen IGF-I, es probable que existan diferentes respuestas en la expresión de éste dependiendo del estado fisiológico o nutricional del animal. Esto es especialmente relevante para situa-

ciones de producción en pastoreo controlado, ya que el consumo de materia seca es usualmente más bajo que en sistemas de confinamiento (Kolver y Muller, 1998), razón por la cual se ha sugerido que los animales no logran expresar su potencial productivo, seguramente en respuesta al desacople entre requerimientos-oferta de nutrientes y ambiente productivo (Chilibroste y col., 2012).

El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto del polimorfismo AF017143 del gen IGF-I sobre los parámetros productivos, metabólicos y endocrinos durante el período de transición en vacas lecheras primíparas en condiciones pastoriles de producción de leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

El protocolo experimental fue aprobado y realizado de acuerdo a las pautas de experimentación animal de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República.

El experimento se realizó en un predio comercial del departamento de Flores, Uruguay. Se utilizó un total de 32 vacas primíparas de un rodeo de vacas Holando Americano (HA, n=9), Holando Neocelandés (HNZ, n=4), Sueca Roja (SR, n=9) y cruce Jersey x HA

(JxHA, n=10). Desde los 60 días preparto y durante toda la lactancia las vacas tuvieron el mismo manejo y asignación nutricional. La dieta preparto consistió en: 6 kg de materia seca (MS)/vaca/día de ensilaje de sorgo planta entera, 1 kg MS/vaca/día de sorgo grano húmedo, 2 kg MS/vaca/día de expeller de girasol, 0,1 kg MS/vaca/día de urea y 0,3 kg MS/vaca/día de una sal comercial preparto. Durante el posparto se manejaron mediante un sistema de pastoreo rotativo de franja diaria, asignando en promedio 12,7 kg MS/vaca/día de una pastura de raigrás (*Lolium perenne*) con disponibilidad promedio de 1679,3 kg MS/ha y una asignación de 13,08 kg/vaca/día de MS de un pastoreo de alfalfa (*Medicago sativa*) por día con disponibilidad promedio de 1232,9 kg MS/ha. Fueron suplementadas con concentrado de sorgo y trigo de grano húmedo 2,15 kg MS/vaca/día. El concentrado, se ofreció en comederos colectivos, luego del ordeño de la tarde. Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día (6:00 AM y 4:00 PM) y las producciones de cada ordeño fueron registradas. La duración media de la lactancia fue 280 ± 24 días. Se determinó la producción y composición de leche (grasa, proteína) mensual. La composición se determinó a partir de muestras de leche individuales tomadas en el ordeño de la mañana y de la tarde. Los análisis se realizaron en el laboratorio COLAVECO, Colonia, Uruguay, mediante el método de absorción de radiación infrarroja para leche fluida (estándar IDF 141C:2000).

Muestreo de sangre, extracción de ADN y genotipado

Para la determinación de hormonas y metabolitos, se extrajo sangre por venopunción coxígea en tubos heparinizados desde un mes preparto hasta los 40 días luego del parto. La sangre se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos y se refrigeró el plasma a -20 °C.

Para la extracción de ADN se extrajo sangre en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) con anticoagulante (K₂EDTA), por venopunción coxígea. Las muestras de sangre fueron almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento, realizándose la extracción de ADN genómico de acuerdo al procedimiento descrito por Montgomery y Sise (1990). La calidad y cantidad de ADN se evaluó en un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 UV-vis (Nano-Drop Technologies, Inc., Wilmington, DE). Las vacas fueron genotipadas para el polimorfismo AF017143 ubicado en la región promotora del gen bovino IGF-1 (512-bp 5' del primer codón del primer exón, GeneBank Accession No. AF017143, Ge y col., 1997). El genotipado se realizó en un termociclador Rotor Gene™ 6000 (Corbett Research Limited, Sydney, Australia), mediante la técnica de PCR en tiempo real con SYBR® Green I y análisis HRM (Rotor-Gene™ 6000 software v.1.7, Build 75), de acuerdo a lo descrito por Trujillo y col. (2012).

Determinaciones hormonales y de metabolitos

Las determinaciones hormonales y de metabolitos se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria de Uruguay.

La concentración de insulina fue determinada en un solo ensayo inmunorradiométrico (IRMA) usando un kit comercial (Diasource, Bruselas, Belgium). La sensibilidad del ensayo fue de 2,1 mIU/mL. El CV intraensayo para el control 1 (19 mIU/mL) y control 2 (61,6 IU/mL) fue de 6,7 % y 9,1 %. La determinación de la concentración de IGF-I se realizó por medidas radioinmunométricas con un kit comercial (IGF1 RIACT Cis Bio International, GIF Sur Yvette Cedex, France). La sensibilidad del ensayo fue 0,7 ng/mL. Todas las muestras se corrieron en un ensayo y el coeficiente de variación dentro del ensayo para el Control 1 (74 ng/mL) y para el Control 2 (535 ng/mL) fue 5,7% y 9,7%, respectivamente.

Las concentraciones plasmáticas de BHB y NEFA se determinaron mediante espectrofotometría empleando los kits para D-3-Hydroxybutyrate (Kat. RB 1007) y NEFA (Kat. FA 115, Randox Laboratories Ltd, Ardmore, UK). La concentración de proteína plasmática total, albúmina y colesterol se determinaron mediante kits comerciales (Weiner Lab. Kit Bs As, Argentina). El coeficiente de variación dentro y entre ensayos estuvo vamente.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas, así como el equilibrio Hardy-Weinberg fueron analizados utilizando el programa PopGene32 v1.31 (Yeh y col., 1999). Las variables productivas, hormonas y metabolitos se evaluaron mediante un modelo mixto, usando un análisis de medidas repetidas en el tiempo (PROC MIXED. Statistical Analysis System; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2009). El modelo estadístico incluyó el genotipo de IGF-I (AA, AB, BB), el período respecto al parto (cada 20 y 60 días para metabolitos/hormonas y variables productivas, respectivamente) e interacciones entre ambos. Como efecto aleatorio se consideró el biotipo (HA, HNZ, JxHA, RS) anidada dentro de genotipo. Se utilizó la estructura de covarianza autorregresiva de primer orden y los grados de libertad se ajustaron por el método de Kenward-Rogers. Se analizaron diferencias entre grupos por el tests de medias de mínimos cuadrados. Se consideró significativo cuando $P \leq 0,05$ y tendencia cuando $P > 0,05$ y $P < 0,1$.

RESULTADOS

Las frecuencias de los alelos A y B fueron 0,56 y 0,44, respectivamente. Las frecuencias genotípicas para la totalidad del rodeo correspondieron a 0,375 (12/32), 0,375 (12/32) y 0,25 (8/32), para los genotipos AA, AB y BB, respectivamente. No se

observaron desvíos del equilibrio Hardy-Weinberg ($P = 0,15$) para la muestra.

La producción de leche estuvo afectada por el genotipo ($P=0,04$) y por el período posparto ($P<0,0001$), pero no hubo interacción entre ambos. Las vacas del genotipo AA produjeron más leche ($P<0,05$) que las vacas AB y BB ($20,3 \pm 0,7$ vs $18,2 \pm 0,8$ y $17,2 \pm 1,2$ L/día) que no difirieron entre si. La máxima producción de leche se observó a los 90 días posparto y luego la producción fue disminuyendo hacia el final de la lactancia (Figura 1A). El porcentaje de proteína y grasa en leche no fueron afectados por el genotipo, el período afectó el porcentaje de grasa en leche ($P<0,001$) ya que éste aumentó hacia el final de la lactancia. Similares resultados a los de producción de leche se encontraron para kg de grasa y proteína: ambos fueron afectados por el genotipo ($P<0,03$ y $P=0,05$, respectivamente). Las vacas AA produjeron más kg de grasa por día que las AB ($0,65$ vs $0,54$ kg/día, $P<0,01$), pero no fueron diferentes de las BB ($0,58$ kg/día). En términos de kg de proteína, las vacas AA produjeron más que las BB y AB, respectivamente ($0,64$ vs $0,58$ y $0,54$ kg/día, respectivamente, $P<0,05$).

Las concentraciones de insulina fueron afectadas por el período ($P=0,02$); las concentraciones de insulina fueron mayores a los 20 y 40 días posparto respecto de las concentraciones preparto (Figura

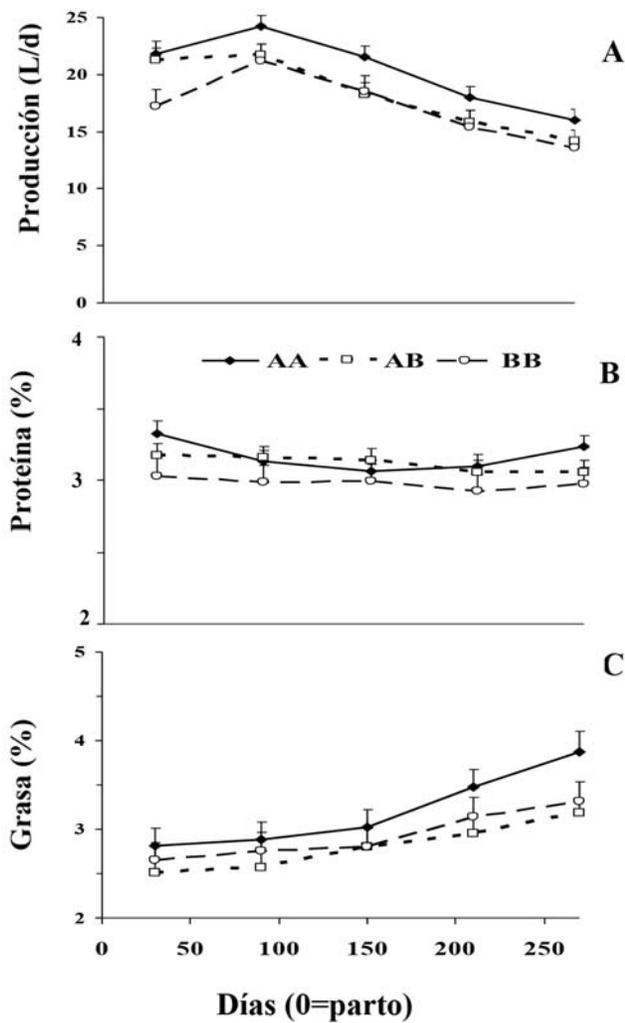


Figura 1. A) Producción de leche, B) porcentaje de proteína en leche y C) porcentaje de grasa en leche durante la lactancia de vacas con genotipos de IGF-I AA, AB y BB.

2A). Se observó un aumento en las concentraciones de insulina del parto a los 20 días posparto en los genotipos AB y BB; el genotipo AA mantuvo las concentraciones durante el período. No hubo efecto del genotipo.

El período respecto al parto tendió a afectar las concentraciones de IGF-I ($P=0,08$), pero no hubo

efecto del genotipo. Las concentraciones de IGF-I disminuyeron desde el parto respecto al parto ($P<0,01$) y tendieron a aumentar hacia el día 40 posparto ($P<0,10$, Figura 2B).

Las concentraciones de NEFA fueron afectadas por el período respecto al parto ($P<0,001$), ya

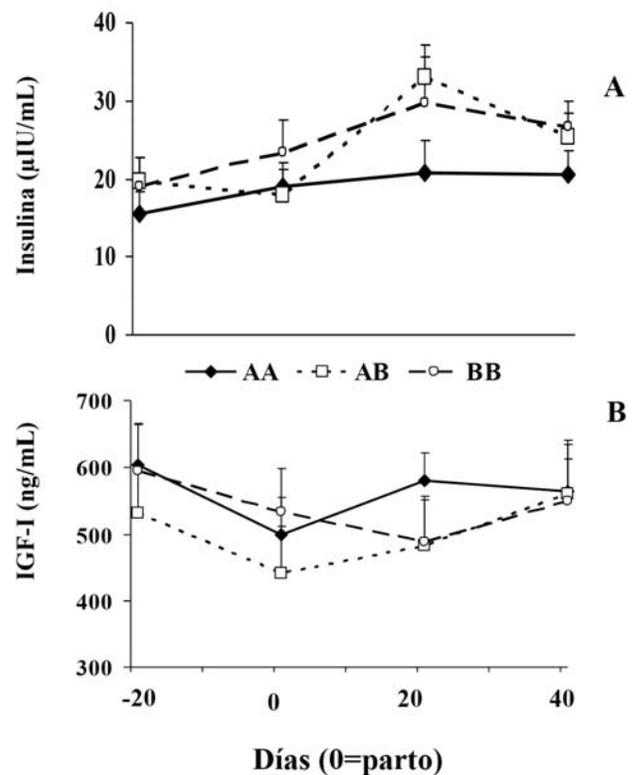


Figura 2. A) Concentración de insulina e B) IGF- en vacas con genotipos IGF-I AA, AB y BB durante el período de transición.

que disminuyeron del parto al posparto y se mantuvieron bajas hasta el final del ensayo (Figura 3A).

El genotipo afectó las concentraciones de BHB ($P<0,01$) (Figura 3B); las vacas AB presentaron

mayores concentraciones de BHB respecto de las AA y BB ($0,88 \pm 0,11$ vs $0,57 \pm 0,09$ y $0,46 \pm 0,07$ mM, respectivamente). El período afectó las concentraciones de BHB ($P < 0,0001$), éstas aumentaron del pre al parto.

Las concentraciones de colesterol fueron afectadas por el período respecto del parto ($P < 0,001$): disminuyeron al parto y aumentaron nuevamente al día 20 posparto; el día 40 posparto los niveles de colesterol fueron mayores que los preparto (Figura 4A). Las concentraciones de proteínas totales tendieron a ser afectadas por el genotipo ($P = 0,06$), ya

que el genotipo AB presentó menores concentraciones que el AA y BB ($71,7 \pm 0,8$ vs $73,8 \pm 1,0$ y $74,6 \pm 0,9$ g/L, respectivamente $P < 0,05$). El período también afectó las concentraciones de proteínas ($P = 0,056$); las concentraciones aumentaron del pre al parto (Figura 4B). Las concentraciones de albúmina fueron

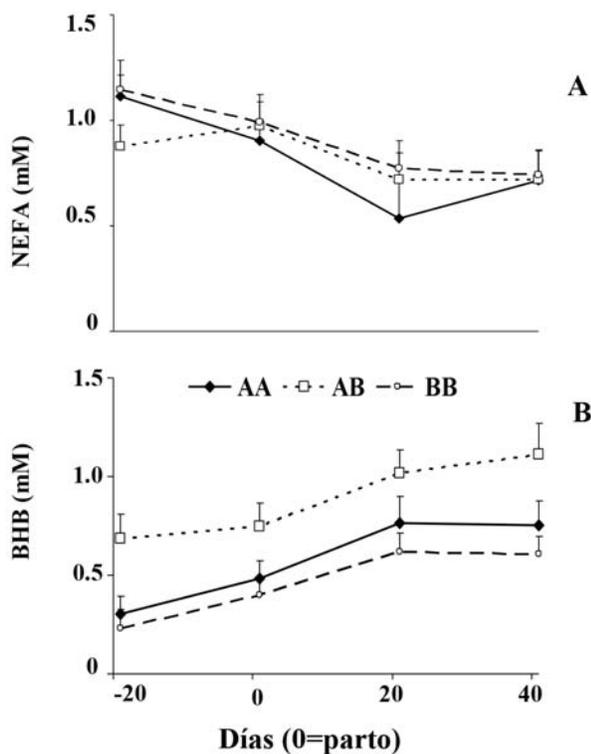


Figura 3. A) Concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y B) b-hidroxibutirato (BHB) en vacas con genotipos IGF-I AA, AB y BB durante el período de transición.

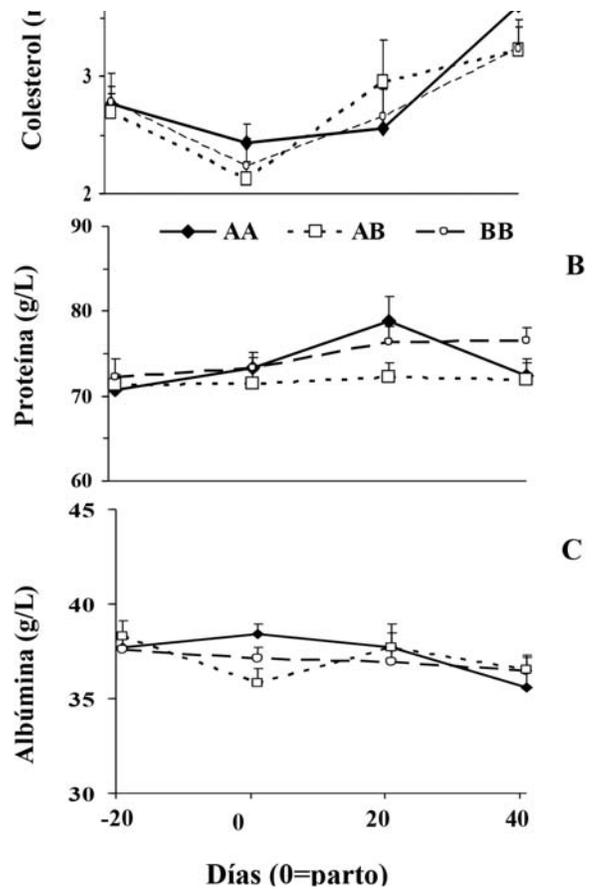


Figura 4. A) Concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y B) b-hidroxibutirato (BHB) en vacas con genotipos IGF-I AA, AB y BB durante el período de transición.

afectadas por el período ($P = 0,05$): fueron menores al día 40 posparto respecto del preparto (Figura 4C). No fueron afectadas por el genotipo ni por la interacción.

DISCUSIÓN

Las frecuencias genotípicas (0,375, 0,375 y 0,25 para AA, AB y BB, respectivamente) y alélicas (0,56 para A y 0,44 para B, respectivamente) fueron similares a las reportadas por la bibliografía internacional; frecuencias de 0,55, 0,56 y 0,52 para el alelo A; 0,45, 0,44 y 0,48 para el alelo B, fueron reportadas en ganado Holstein por Hines y col. (1998), Li y col. (2004) y Siadkowska y col. (2006). En otros rodeos lecheros nacionales, Rupprechter y col. (2011) reportaron una frecuencia de 0,60 y 0,40 para los alelos A y B respectivamente.

En el presente trabajo, el polimorfismo AF017143 de IGF-I afectó la producción de leche, siendo las vacas del genotipo AA las que presentaron mayor producción de leche, no encontrándose efectos en los porcentajes de proteína y grasa. Estos datos no están de acuerdo con Hines y col. (1998) que no encontraron ninguna asociación entre las variantes de IGF-I y producción de leche. Por otro lado, Siadkowska y col. (2006) reportaron que el genotipo AB tendió a ser superior a los genotipos AA y BB sobre leche corregida por grasa y sólidos totales. Sin embargo, nuestros datos son consistentes con Bonakdar y col. (2010), quienes reportaron que el genotipo AA produjo más leche respecto del genotipo BB sin ser ninguno de éstos diferente del genotipo AB. En ese trabajo se encontró que el genotipo AB presentó mayor porcentaje de proteína y grasa en leche, lo que no concuerda con

la falta de efecto de genotipo en estas variables en el presente estudio. Si bien estos trabajos fueron realizados en condiciones de estabulación, recientemente nuestro grupo de investigación (Rupprechter y col., 2011) reportó resultados contradictorios en dos rodeos comerciales sobre pastoreo controlado: se encontró una tendencia a mayor FCM en vacas multíparas AB respecto vacas AA, pero esto no se observó en las primíparas. Se podría considerar que aspectos medioambientales (esencialmente nutrición) y/o estado de desarrollo podría modificar la regulación de la expresión de IGF-I (el polimorfismo se localiza en la región promotora del gen) y así afectar diferencialmente el metabolismo y la lactancia. Esto confirma la relevancia de que el uso de marcadores moleculares para asistir la selección genética para producción y composición de leche debe estar validado en diferentes condiciones de producción y durante el ciclo productivo del animal.

A pesar las diferencias encontradas en producción de leche, no se observó efecto del polimorfismo sobre las concentraciones de IGF-I en acuerdo con reportes previos en situaciones estabuladas de producción (Bonakdar y col., 2010) y pastoreo (Rupprechter y col., 2011). Sin embargo, la falta de efecto sobre las concentraciones de insulina en este trabajo contrasta con estudios previos realizados por nuestro grupo en vacas primíparas, donde se

reportó que vacas BB presentaban concentraciones de insulina más altas respecto a los genotipos AA y AB (Rupprether y col., (2011). Se debe notar que los muestreos de sangre fueron diferentes en ambos estudios, ya que el presente estudio se concentra en el período de transición, mientras que nuestro estudio previo tiene determinaciones al mes y dos meses posparto (Rupprether y col., 2011).

Las concentraciones de BHB en las vacas BB fueron menores (Rupprether y col., 2011), lo que coincide con el presente estudio (genotipos AA y BB con menores concentraciones que genotipo AB). Las mayores concentraciones de BHB en las vacas AB detectadas en este trabajo, son consistentes con las menores concentraciones de proteínas totales, lo que podría indicar un peor estado energético. Este peor estado metabólico es consistente con la menor producción de leche de vacas AB respecto a vacas AA. Sin embargo, aunque las vacas AB presentan concentraciones mayores de BHB y menores de proteínas plasmáticas que las vacas BB, tienen similar producción de leche. Por lo tanto, esto podría reflejar que las vacas AB presentan una peor adaptación metabólica al inicio de la lactancia (incluyendo un déficit en el incremento del consumo posparto).

Las menores concentraciones de IGF-I e insulina alrededor del parto han sido previamente reportadas (Meikle y col., 2004), e implican una adaptación

metabólica para sostener las demandas de la lactancia favoreciendo la partición de nutrientes hacia la glándula mamaria (Wathes y col., 2007). Bajos niveles de insulina e IGF-I estimulan la lipólisis y favorecen la gluconeogénesis (Chilliard y col., 1998). Los niveles más altos de NEFA y más bajos de colesterol al parto son consistentemente reportados por trabajos previos (Cavestany y col., 2005, 2009; Pereira y col., 2010; Adrien y col., 2012) y se asocian al déficit energético. El aumento de BHB a los 20 y 40 días posparto es consistente con el aumento previo de NEFA y coincide con la curva de lactancia.

CONCLUSIONES

En este estudio el polimorfismo AF017143 de IGF-I afectó la producción y el metabolismo en vacas primíparas en pastoreo controlado. Las vacas AA produjeron mas leche, mientras que las vacas AB presentaron mayores concentraciones plasmáticas de BHB y menores de proteínas durante el periparto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adrien ML, Mattiauda DA, Artegoitia V, Carriquiry M, Motta G, Bentancur O, Meikle A. (2012). Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal*. 6(2):292-299.
2. Bauman DE, Currie WB. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci* 63:1514-1529.
3. Bonakdar E, Rahmani HR, Edriss MA, Sayed Tabatabaei BE. (2010). IGF-I gene polymorphism, but not its blood concentration, is associated with milk fat and protein in Holstein dairy cows. *Genet Mol Res*:31,9(3):1726-1734.
4. Cavestany D, Blanc JE, Kulcsar M, Uriarte G, Chilibroste P, Meikle A, Febel H, Ferraris A, Krall E. (2005). Studies of the transition cow under and pasture-based milk production system: metabolic profiles. *J Vet Med A*. 52:1-7.
5. Cavestany D, Kulcsár M, Crespi D, Chilliard Y, La Manna A, Balogh O, Keresztes M, Delavaud C, Huszenicza G, Meikle A. (2009). Effect of prepartum energetic supplementation on productive and reproductive characteristics, and metabolic and hormonal profiles in dairy cows under grazing conditions. *Reprod Dom Anim* 44: 663–671.
6. Chilibroste P, Soca P, Mattiauda D. (2012). Estrategias de alimentación en Sistemas de Producción de Leche de base pastoril. In: Pasturas -Hacia una ganadería competitiva y sustentable- Jornada técnica-Unidad Integrada Balcarce-IN-TA-Balcarce-Argentina: 91-100.
7. Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M. (1998). Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev* 38:131–52.
8. Drackley JK. (1999). Biology of dairy cow during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci*. 82: 2259-2273.
9. Ge W, Davis M, Hines H, Irvin K, Simmen R. (2001). Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *J Anim Sci*. 79: 1757–1762.
10. Ge W, Davis ME, Hines HC. (1997). Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF1 gene. *Anim Genet* 28:155-156.
11. Grummer RR. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci* 73: 2820-2833.
12. Hines HC, Ge W, Zhao Q, Davis ME. (1998). Association of genetic markers in growth hormone and insulin – like growth factor I loci with lactation traits in Holstein. *Anim Genet* 29:69 (Resumen).
13. Kolver ES, Muller LD. (1998). Performance and Nutrient Intake of High Producing Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration. *J Dairy Sci* 81:1403-1411.
14. Li C, Basarab J, Snelling WM, Benkel B, Murdoch B, Hansen C, Moore SS. (2004). Assessment of positional candidate genes myf5 and IGF1 for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos Taurus*. *J Anim Sci* 82:1-7.

15. Lucy MC, Verkerk GA, Whyte BE, Macdonald KA, Burton L, Cursons RT, Roche JR, Holmes CW. (2009). Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. *J Dairy Sci*: 92:526–539.
16. Maj A, Snochowski M, Siadkowska E, Rowinska B, Lisowski P, Robakowska-Hyzorek D, Oprzadek J, Grochowska R, Kochman K, Zwierzchowski L. (2008). Polymorphism in genes of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF1) and its association with both the IGF1 expression in liver and its level in blood in Polish Holstein-Friesian cattle. *Neuro Endocrinol Lett* 29(6): 981-989.
17. Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilibroste P. (2004). Effects of Parity and Body Condition Score at Calving on Endocrine and Reproductive Parameters of the Dairy Cow under Grazing Conditions. *Reproduction* 127: 727-737.
18. Montgomery GW, Sise A. (1990). Extraction of DNA from sheep White blood cells. *N Z J Agric Res* 33: 437–441.
19. Pereira I, Laborde D, Carriquiry M, López-Villalobos N, Meikle A. (2010). Blood metabolic profiles in Uruguayan Holstein and Uruguayan Holstein x New Zealand Holstein-Friesian dairy cows. *Proc New Zeal Soc Anim Prod* 70: 311-315.
20. Rhoads RP, Kim JW, Leury BJ, Baumgard LH, Segole N, Frank SJ, Bauman DE, Boisclair YR. (2004). Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *J Nutr* 134:1020–1027.
21. Rupprechter G, Carriquiry M, Ramos J, Pereira I, Meikle A. (2011). Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotropic axis genes *Acta Veterinaria Scandinavica* 53:35-41.
22. Trujillo AI, Peñagaricano F, Grignola MP, Nicolini P, Casal AC, Espasandín A, Naya H, Carriquiry M, Chilibroste P. (2012). Using high resolution melting analysis to identify variation of NPY, LEP and IGF-1 genes in Angus cattle. *Livestock Science* <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2012.03.004>.
23. Siadkowska E, Zwierzchowski L, Oprzadek J, Strzalkowska N, Bagnicka E, Kryzyzewski J. (2006). Effect of polymorphism in IGF-I gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Anim Sci* 24:225-237.
24. Wathes D, Bourne N, Cheng Z, Mann G, Taylor V, Coffey M. (2007). Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *J Dairy Sci* 90:1310–1325.
25. Yeh CF, Yang R, Boyle T. (1999). PopGene version 1.31. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. [<http://www.alberta.ca/~fyeh/>].