



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**USO DE ESPECTROS DE INFRARROJO MEDIO EN LECHE DE GANADO
HOLSTEIN PARA LA CONFIRMACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE PREÑEZ**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA

YOBANI GIRÓN RUIZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. SERGIO IVÁN ROMÁN PONCE

INIFAP-FMVZ

COMITÉ TUTOR

DRA. ADRIANA GARCÍA RUIZ

INIFAP-FMVZ

DR. FELIPE DE JESÚS RUIZ LÓPEZ

INIFAP-FESC

INVITADO

DR. JOSÉ LUIS ROMANO MUÑOZ

INIFAP-FESC

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Enero, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio I. Román Ponce, por invitarme a realizar la maestría y confiar en mí, le agradezco su apoyo profesional durante todo este proceso y, sobre todo, sus consejos y palabras de motivación.

Al Dr. Felipe de Jesús Ruiz López, por brindarme sus conocimientos en clase y por guiarme en este proceso, gracias por su confianza y paciencia.

Al Dr. Hugo O. Toledo Alvarado, por enseñarme, apoyarme y guiarme en el manejo de los datos de esta tesis, gracias por su paciencia y confianza.

A la Dra. Adriana García y Dr. José Luis Romano, por guiarme con sus enseñanzas y comentarios, así como las revisiones oportunas realizadas a esta tesis de maestría, gracias por su paciencia.

Al Dr. Moisés Montaña y Al Dr. Vicente E. Vega, les agradezco su apoyo, amistad y confianza que tienen en mí.

A todos ustedes, les agradezco infinitamente su amistad, para mí, son un verdadero ejemplo de personas y profesionales.

A Leticia Diaz, por su paciencia y apoyo en los trámites necesarios durante este proceso y a todos mis amigos/compañeros quienes me brindaron su valiosa amistad en el CENID FyMA.

A las instituciones que fueron parte de este grato proceso:

- Universidad Nacional Autónoma De México. Facultad De Estudios Superiores Cuautitlán
- Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (INIFAP)
- Asociación Holstein de México
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

RESUMEN

El uso de la espectroscopia de infrarrojo por Transformadas de Fourier, a nivel mundial, es el método rutinario aprobado por el *International Committee for Animal Recording* (ICAR) para la determinación de la grasa, lactosa, proteína y sólidos en la leche. El cual ha demostrado potencial en la asociación y predicción de características indirectamente relacionadas con la composición de la leche mediante cambios en su perfil bioquímico. Por lo cual, el objetivo del presente estudio fue evaluar la utilidad de espectros de infrarrojo medio en la identificación y monitoreo de la preñez en vacas productoras de leche. La información utilizada fue proporcionada por la Asociación Holstein de México, A. C. (AHM), la cual consistió de 77,389 espectros distribuidos en ocho unidades de producción. El espectro cubrió 935 ondas, entre los 937 a 4000 cm^{-1} . Fueron ajustados dos modelos lineales generalizados con un enfoque Bayesiano, con el objeto de evaluar la posibilidad de predecir el estado reproductivo de la vaca a partir de la información contenida en los espectros. El Modelo 1 incluyó únicamente los efectos de las 935 ondas del espectro como variables independientes. El Modelo 2 incluyó a los efectos hato-estación, número parto, días en lactación, producción de leche al momento del muestreo en adición a la información de los espectros del modelo anterior. La evaluación se realizó a través de una validación cruzada con 10 repeticiones, calculando la sensibilidad, especificidad y obteniendo las áreas bajo la curva (AUC) de la Característica Operativa del Receptor (ROC, por sus siglas en inglés) y Recuperación de Precisión (PR, por sus siglas en inglés). La sensibilidad y especificidad para el primer modelo fueron 0.99 y 0.39, respectivamente; las AUC para la ROC fueron de 0.65 y 0.82 para la PR. En el segundo modelo, los resultados muestran una mejora al adicionar efectos a los espectros, con una sensibilidad y especificidad de 0.94 y 0.70, respectivamente; las AUC para la ROC fue de 0.77 y 0.86 para la PR correspondiente; la inclusión de efectos sugeriría una remodelación constante, haciendo menos eficiente el proceso. En conclusión, el uso exclusivo de los espectros mostró una utilidad limitada para el diagnóstico de gestación; por lo cual, es necesario, continuar con investigaciones más detalladas en los modelos o

buscar estrategias que nos permitan mejorar la precisión. Además, pudiera utilizarse como una herramienta para monitorear la gestación y advertir de posibles abortos fetales.

Palabras clave: Composición de la leche, espectros, gestación, monitoreo.

ABSTRACT

The use of Fourier Transform infrared spectroscopy, worldwide, is the routine method approved by the International Committee for Animal Recording (ICAR) for the determination of fat, lactose, protein and solids in milk. Which has shown potential in the association and prediction of characteristics indirectly related to the composition of milk through changes in its biochemical profile. The objective of the present study was to evaluate the utility of mid-infrared spectra in the identification and monitoring of pregnancy in dairy cows. The information used was provided by the Holstein Association of Mexico, A.C., which consisted of 77,389 spectra registers distributed in eight production units. The spectrum covered 935 wave numbers, between 937 to 4000 cm^{-1} . Two generalized linear models were adjusted with a Bayesian approach, in order to evaluate the possibility of predicting the reproductive status of the cow from the information contained in the spectra. Model 1 included only the effects of the 935 spectrum wave numbers as independent variables. Model 2 included the effects of herd-season, calving number, days in lactation, milk production at the time of sampling, in addition to the spectral information from the previous model. The evaluation was carried out through a cross-validation with 10 repetitions, calculating the sensitivity, specificity and obtaining the AUC-ROC and AUC-PR. The sensitivity and specificity for the first model were 0.99 and 0.39, respectively; the AUC for the ROC was 0.65 and 0.82 for the PR. In the second model, the results show an improvement when adding effects to the spectra, with a sensitivity and specificity of 0.94 and 0.70, respectively; the AUC for the ROC was 0.77 and 0.86 for the corresponding RP; In conclusion, the exclusive use of spectra showed limited usefulness for pregnancy diagnosis; Therefore, it is necessary to continue with more detailed investigations in the models or to look for strategies that allow us to improve the precision. In addition, it could be used as a tool to monitor pregnancy and warn of possible fetal abortions.

Key words: Milk composition, spectra, pregnancy, verification.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIÓN.....	39
REFERENCIAS.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de las áreas pertenecientes al agua (zonas de alta variabilidad) en el espectro de la leche. (Fuente: Grelet <i>et al.</i> , 2015).	13
Figura 2 . Espectro de leche entera sin áreas de agua y ondas específicas para lactosa, proteínas y lípidos. (Fuente: Grelet <i>et al.</i> , 2015).....	15
Figura 3. Distribución de las probabilidades obtenidas por el Modelo 1 en relación a la gestación de las vacas, representado en un diagrama de caja y bigotes (0= No gestante y 1= Gestante).....	27
Figura 4. Distribución de las probabilidades obtenidas por el Modelo 2 en relación a la gestación de las vacas, representado en un diagrama de caja y bigotes (0= No gestante y 1= Gestante).....	28
Figura 5. Curvas ROC obtenidas utilizando 10 repeticiones en las validaciones cruzadas del Modelo 1.....	30
Figura 6. Curvas ROC obtenidas utilizando 10 repeticiones en las validaciones cruzadas del Modelo 2.....	30
Figura 7. Curvas PR obtenidas utilizando 10 repeticiones en las validaciones cruzadas del Modelo 1.....	31
Figura 8. Curvas PR obtenidas utilizando 10 repeticiones en las validaciones cruzadas del Modelo 2.....	32
Figura 9. Valores absolutos del promedio e intervalos de confianza de los coeficientes de regresión de cada número de onda del espectro, obtenidos en el Modelo 1.....	33
Figura 10. Valores absolutos del promedio e intervalos de confianza de los coeficientes de regresión de cada número de onda del espectro, obtenidos en el Modelo 2.....	34

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de la leche entera de bovino.....	12
Cuadro 2. Matriz de confusión para el cálculo de la sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión.	24
Cuadro 3. Estadísticas descriptivas de variables productivas y reproductivas útiles para el desarrollo del modelo.....	26
Cuadro 4. Conteo de los resultados predichos de los Modelos 1 y Modelo 2 del estado reproductivo de las vacas gestantes y no gestantes.	29

INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción lechera, la eficiencia reproductiva (ER) es un elemento de suma importancia debido al alto impacto en la rentabilidad del hato, puesto que la preñez es un requisito indispensable para que una vaca inicie la producción de leche (Balhara *et al.*, 2013, Mariscal *et al.*, 2016). Existen varias formas de evaluar la ER en las vacas de acuerdo a la información disponible en los hatos. Algunos parámetros reproductivos de importancia son: edad al primer parto, intervalo parto - primer celo, intervalo parto - primer servicio, número de servicios por concepción, días abiertos e intervalo entre partos (Mariscal *et al.*, 2016; Wondossen *et al.*, 2018).

De manera más puntual, un estudio realizado por De Vries (2006) sobre el impacto económico de los días abiertos, menciona que el costo promedio por día abierto por vaca por año varió de \$3.19 a \$5.41 USD cuando el promedio de días abiertos aumentó de 112 a 166. Aunque los mismos autores mencionan que estos costos son muy variables por depender de la disponibilidad de vaquillas de reemplazo, del número promedio de lactación del hato, del nivel de producción de leche e intervalo entre parto, así como de la magnitud de los días abiertos, ya que en este periodo los animales tienen más problemas de salud y un mayor riesgo de desecho (Groenendaal *et al.*, 2004; Pinedo y De Vries, 2010), los altos costos calculados justifican la adopción y generación de estrategias para disminuir los días abiertos y la tasa de desecho de hembras no preñadas.

En los últimos años, el interés por las herramientas que miden o predicen de manera rutinaria y precisa las características productivas de los animales, está creciendo rápidamente (De Marchi *et al.*, 2014; Crowe *et al.*, 2018). Como ejemplo, el uso de la espectroscopia de infrarrojo medio por Transformadas de Fourier (FT-MIR, siglas en inglés) ha aumentado en popularidad en la última década, y ha sido ampliamente usada para predecir la composición de la leche y otros rasgos novedosos que son difíciles o caros de medir directamente. Estudios citados por De Marchi *et al.* (2014), han mencionado el potencial en el uso de los espectros resultantes del análisis de

la leche a través de FT-MIR como herramienta de medición de otras características de la leche, como son: composición de los ácidos grasos, composición proteica, composición mineral, acidez y cuerpos cetónicos, entre otros. A su vez, otros estudios han utilizado la composición de la leche para predecir el estado fisiológico de las vacas de forma indirecta, tales como el estado energético corporal (McParland *et al.*, 2015), eficiencia alimenticia (McParland and Berry, 2016), laminitis (Mineur *et al.*, 2017), emisiones de metano (Vanlierde *et al.*, 2013) y la gestación (Lainé *et al.*, 2013, 2017; Toledo *et al.*, 2018a, 2018b).

Todos estos estudios se basan en que cambios en el perfil bioquímico de la leche que pueden ser usados como indicadores del estado fisiológico de las vacas (Bastin *et al.*, 2016). Es así como variaciones en la composición de la leche provocadas por el estado reproductivo de la vaca se han detectado en algunas regiones del espectro mediante el uso de FT-MIR (Toledo *et al.*, 2018a, 2018b).

Lo anterior, abre la posibilidad de que los análisis de muestras de leche procesadas dentro del control de producción lechero sean utilizados para confirmar o respaldar los diagnósticos tempranos de preñez y así permitir que los productores cuenten con una herramienta de manejo reproductivo de las vacas que haga posible la reducción de los días abiertos, mismo que se verá reflejado como una mejora en la rentabilidad del hato.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia de la producción de leche de bovino en México

En México, el sector lechero es considerado la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria de alimentos. Lo anterior, debido a que contribuye con aproximadamente el 9.5% del Producto Interno Bruto Agroindustrial (SE, 2012; FIRA, 2019). En el 2019, la producción fue de 12, 275, 865 miles de litros de leche fluida, los cuales equivalen cerca de \$80.77 mil millones de pesos, mismos que corresponde al 17.6% del valor total de la producción pecuaria (SIAP, 2018, 2019). El incremento en la producción de leche en relación al año 2018 fue del 2.0% y para el año 2019 el incremento fue del 2.3%, sin embargo, a pesar del crecimiento gradual en la producción, la oferta nacional no ha sido capaz de responder a la creciente demanda de la leche y sus derivados, cubriendo estas necesidades con importaciones que van de 20 a 30% de la producción nacional en los últimos años, situación que ha llevado a nuestro país a ocupar el 5° lugar en importación de leche fluida y el 1° en la importación de leche polvo con 3.5 y 11.2% del total de las importaciones globales, respectivamente (Robledo, 2018; SIAP, 2018).

Los sistemas de producción de leche de bovino en México son heterogéneos desde el punto de vista tecnológico, agroecológico y socioeconómico (FINRURAL, 2009; Robledo, 2018). El nivel de producción en los bovinos lecheros tiene estrecha relación con diversos factores, entre los que destacan la raza, la alimentación, las condiciones ambientales, las instalaciones, y en general, con la ubicación geográfica en la cual se desarrolla el sistema de producción (Loera y Banda, 2017).

Se pueden diferenciar tres sistemas con relación a lo anterior: 1) Intensivo, que comprende algunas principales regiones: la Comarca Lagunera (ésta está en Durango y Coahuila), Bajío (Guanajuato, Michoacán, Querétaro y parte de Jalisco), Chihuahua, Puebla-Tlaxcala y México-Hidalgo (Amendola, 2002); 2) Familiar, todo el Altiplano Central (Altos de Jalisco son los más representativos de este sistema)

y, 3) Doble propósito, presente en las regiones tropicales (Núñez *et al.*, 2009; Camacho *et al.*, 2017).

Sistemas de producción lechera en México

Intensivo. Se localiza principalmente en las grandes cuencas lecheras del altiplano y en el norte del país, en donde el clima va desde templado subhúmedo y húmedo hasta semiárido y árido (Amendola, 2002). Los hatos se caracterizan por tener entre 100 a 3000 cabezas (entre 300 y 400 comúnmente) de ganado Holstein que alojan en espacios reducidos (Amendola, 2002; Rojo *et al.*, 2009). La alimentación se basa en concentrados y forrajes cortados a través de dietas integrales. Por lo cual, se emplean extensas áreas para la producción de alimento animal (forraje y granos) principalmente alfalfa (*Medicago sativa*), granos tales como maíz (*Zea mays*) y sorgo (*Sorghum bicolor*) y subproductos, los cuales son cortados, cosechados y ofrecidos a los animales en comederos. Las instalaciones y el equipo son especializados, como ordeñadoras mecánicas, tanques enfriadores de leche. La producción de leche es alrededor de 8000 Kg/vaca/año, este sistema contribuye aproximadamente con el 51% de la producción nacional, y su canal de comercialización son principalmente empresas pasteurizadoras (Núñez *et al.*, 2009).

Familiar. Se localiza principalmente en las regiones semiáridas y templadas. Entre sus características destaca que aprovechan los recursos de las familias rurales como mano de obra y residuos de las cosechas de sus parcelas agrícolas, así como el pastoreo de tierras de agostadero. El ganado es principalmente de la raza Holstein mantenido en semiestabulación y el tamaño de hato varía entre 3 a 30 animales (Amendola, 2002; Rojo *et al.*, 2009). El método reproductivo más utilizado es la monta directa, aunque ocasionalmente algunos productores recurren a la inseminación artificial. La alimentación puede contemplar cultivos forrajeros de temporal, como son maíz (*Zea mays*), avena (*Avena sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), entre otros, y esporádicamente ensilados de cultivos forrajeros, la suplementación con concentrados es poco utilizada (Vera *et al.*, 2009). La ordeña

puede ser manual o mecánica. La producción de leche es de alrededor de 3000 Kg/vaca/año. Este sistema aporta aproximadamente el 30% de la producción de leche nacional, la cual regularmente se destina para el autoconsumo familiar o a intermediarios. (Núñez *et al.*, 2009; Guarneros *et al.*, 2012).

Doble propósito. Se localiza principalmente en las áreas tropicales ubicadas en las costas del Golfo y el Pacífico, el objetivo de este sistema es producir simultáneamente leche y becerros destetados (Amendola, 2002; Román *et al.*, 2009). Entre sus características destacan el tamaño pequeño o mediano de las explotaciones, los cuales van de 30 a 40 animales (Rojo *et al.*, 2009; Arriaga *et al.*, 2013). El pastoreo se realiza en praderas de gramíneas tropicales nativas o introducidas con ganado de cruces de Cebú con Pardo Suizo o Holstein. El nivel de tecnología es bajo, lo cual se ve reflejado con el limitado o nulo uso de suplementos, el uso como método reproductivo es la monta directa y por ende baja implementación de la inseminación artificial. La producción de leche es alrededor de 700 Kg/vaca/año, aportando aproximadamente el 19% de la producción nacional. La leche producida se comercializa, directamente con el consumidor o a intermediarios; misma que representa alrededor del 50% de los ingresos totales de la unidad de producción (Núñez *et al.*, 2009; Román *et al.*, 2009). Sin embargo, esta proporción de ingresos puede variar debido a las fluctuaciones en el precio de la leche; mismo que permite al productor a modificar la proporción de vacas en ordeño conforme a las condiciones del mercado (Amendola, 2002).

La productividad, competitividad y sustentabilidad en la producción de leche dependen del sistema de producción. Como se menciona anteriormente, las diferencias entre estos sistemas son muy evidentes, sin embargo, comparten algunos problemas entre ellos, entre los que se destaca la baja ER. En el caso del Sistema Intensivo, el problema se asocia a altos niveles de producción, estrés calórico y enfermedades infecciosas, mientras que, tanto en el Sistema Familiar como en el Doble Propósito, la baja ER se atribuye principalmente a la limitada

disponibilidad y baja calidad del alimento que no cubre los requerimientos nutricionales de los animales (Núñez *et al.*, 2009; Román *et al.*, 2009).

Eficiencia reproductiva del ganado lechero

La ER es un indicador del logro biológico íntegro de toda la actividad reproductiva, misma que representa el efecto de todos los factores involucrados tales como: el celo, la ovulación, la concepción, la sobrevivencia embrionaria, la gestación y el parto (Cavestany, 2005). La ER del hato es uno de los aspectos más importantes de la producción de ganado lechero, ya que tiene un alto impacto en los costos de producción (Mariscal *et al.*, 2016).

Algunos parámetros que permiten determinar la ER son la edad al parto, los días al primer servicio, los días abiertos, el intervalo entre partos, el número de servicios por concepción, la tasa de concepción, la tasa de detección de estros y la tasa de preñez (De Vries, 2006; Wondossen *et al.*, 2018). Estos indicadores dependen de la tasa de presentación de estros y el porcentaje de servicios por concepción, mismos que como consecuencia afectan la tasa de desecho (Lane *et al.*, 2013). De la misma manera la presentación de estros se relaciona con el intervalo entre partos y la concepción (Crowe *et al.*, 2018). Sin embargo, la presentación de estros comúnmente se ve limitada por una baja detección, misma que puede variar entre 50 y 92% en los hatos. Esta detección de estros es utilizada en primera instancia como un indicador del estado reproductivo en vacas que regresan a ciclar de 18 a 32 días después de la inseminación, siendo una forma fácil y de bajo costo para identificar a las vacas que no gestaron después del servicio (Hernández, 2009).

Un diagnóstico temprano y preciso de la preñez es un criterio deseable para un adecuado manejo reproductivo en las vacas. El diagnóstico temprano de la preñez es crucial para acortar el intervalo entre partos, mismo que hace posible identificar a las vacas no gestantes con el objetivo de implementar en forma temprana las alternativas en el manejo reproductivo para lograr la gestación (Purohit, 2010; Commun *et al.*, 2016). En la actualidad, ningún método directo o indirecto de

diagnóstico de gestación califica como el método ideal en bovinos, debido a las limitaciones que presenta cada uno de ellos, agravando aún más el problema de la ER (Balhara *et al.*, 2013).

Métodos de diagnóstico de gestación

Métodos Directos

Por definición, los métodos directos para el diagnóstico temprano de gestación implican el manejo de los tejidos y/o fluidos asociados al producto embrionario, ya sea manual o mediante instrumentación electrónica (Fricke *et al.*, 2016).

Palpación transrectal. Es el método directo más antiguo y utilizado para el diagnóstico temprano de gestación en vacas lecheras (Fricke *et al.*, 2016). Aunque tradicionalmente se realiza entre los 40 y 60 días posteriores al último servicio. En algunos casos este método puede ser aplicado con alta precisión por personas altamente capacitadas a partir del día 30 posterior a la inseminación artificial; en esta etapa de la gestación es posible identificar la vesícula amniótica o el deslizamiento de la membrana corioalantoidea o ambas (Hernández, 2009; Pohler *et al.*, 2016). Sin embargo, utilizar este método en etapas tempranas de gestación ha causado controversia debido al incremento en la mortalidad embrionaria iatrogénica inducida, por lo que técnicos y productores deben estar conscientes de los posibles efectos negativos asociados con este método (Pohler *et al.*, 2016).

Ultrasonografía. Es una técnica mínimamente invasiva, precisa y eficiente para el diagnóstico temprano de gestación en donde los latidos cardíacos fetales se detectan fácilmente después del día 25 gestación, y se puede identificar la vesícula amniótica. De la misma manera, el ultrasonido permite realizar exámenes morfológicos uterinos, mediciones de embriones (longitud de la grupa de la corona), conocer la etapa de la gestación, el sexo fetal y la función ovárica (Hernández, 2009; Purohit, 2010; Pohler *et al.*, 2016). La ecografía transrectal requiere instrumentos específicos que, aunque los precios han descendido siguen siendo costosos, y su

correcta operación debe de ser llevada a cabo por técnicos capacitados (Commun *et al.*, 2016).

Este método de diagnóstico presenta una sensibilidad del 97.7% y una especificidad del 87.7%, cuando se realiza entre el día 26 y 33 después de la inseminación (Balhara *et al.*, 2013). La precisión de la ultrasonografía es limitada antes de estos días; así mismo depende de la experiencia del técnico y la definición de criterios claros para diferencias entre los diagnósticos positivos y negativos, lo anterior es de gran importancia para obtener resultados exitosos (Pohler *et al.*, 2016).

Métodos Indirectos

Los métodos indirectos para el diagnóstico de gestación se basan en medidas cualitativas o cuantitativas de hormonas o sustancias específicas del embrión o feto presentes en los fluidos corporales maternos, lo anterior como indicadores indirectos de la presencia de una gestación viable (Crowe *et al.*, 2018).

Progesterona (P_4). Es el progestágeno biológicamente más activo en el ganado bovino, mismo que es producido y secretado por el cuerpo lúteo durante el ciclo estral y la placenta durante la gestación (Fricke *et al.*, 2016). La cuantificación de la progesterona se lleva a cabo en sangre o leche utilizando métodos de radioinmunoensayo (RIA) o de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) en un laboratorio (Pohler *et al.*, 2016). Desafortunadamente, el muestreo secuencial de sangre o leche para la determinación de progesterona no es práctico en establos lecheros comerciales, aunado a sus costos no lo hacen una práctica rentable para su implementación rutinaria (Fricke *et al.*, 2016).

Sulfato de estrona (SE_1). SE_1 es un producto esteroide conjugado de estrona (E_1), presente en los placentomas bovinos y es la principal E_1 presente en los fluidos fetales (alantoideo y amniótico). Además, puede estar en cantidades medibles detectables en el plasma periférico materno de vacas a partir del día 52 hasta el fin de la gestación (Balhara *et al.*, 2013). Sin embargo, los niveles de SE_1 en fluidos corporales maternos, tales como leche y plasma sanguíneo el nivel de SE_1 se puede

utilizar como criterio para confirmar la gestación después de 110 días de inseminación artificial (Purohit, 2010). No obstante, el SE₁ no es un biomarcador ideal de la gestación, ya que los perfiles tanto en plasma como en leche están influenciados por muchos otros factores, como son la composición genética, el peso, número de partos, el medio ambiente, entre otros (Balhara *et al.*, 2013).

Glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG, siglas en inglés). Son productos secretores de las células trofoblásticas mono y binucleadas en los placentomas bovinos (Balhara *et al.*, 2013). Se han aislado a partir de extractos de membrana fetal bovina dos proteínas específicas de la gestación (PSP) A y B. La PSP-A se identificó como una a-fetoproteína y se descubrió que la PSP-B era específica de la placenta (Purohit, 2010). La medición de PAG es un método viable para determinar el estado de gestación en vacas lecheras, ya que persiste desde el primer día de gestación hasta el parto (Commun *et al.*, 2016). Sin embargo, la precisión de la detección de PAG solo es buena después de los días 32 a 40 (Crowe *et al.* 2018). Así mismo, debido a la posible muerte embrionaria, todas las vacas preñadas deben volver a analizarse 74 días después de la inseminación o más tarde, cuando los niveles de PAG en plasma y leche en vacas gestantes hayan retornado desde su punto más bajo. Incluso, esta inspección debería ser aplicada en aquellos métodos realizados tempranamente.

Futuras tecnologías para el diagnóstico de gestación

Un enfoque novedoso para el diagnóstico temprano de gestación en las vacas lecheras sería monitorear una sustancia u hormona específica de la gestación, secretada en la leche en cantidades suficientes, para ser detectadas por algún tipo de sensor instalado en los equipos de ordeño. Similar a los sensores instalados en los equipos automatizados de ordeño que permiten medir el flujo de leche por cuarto aprobados por el ICAR (2018).

Fricke *et al.* (2016) mencionan que una prueba de preñez temprana ideal para vacas lecheras cumpliría los siguientes criterios:

- Alta sensibilidad (es decir, identificar correctamente vacas gestantes)
- Alta especificidad (es decir, identificar correctamente vacas no gestantes)
- Económico
- Fácil de realizar en condiciones de campo
- Capacidad para determinar el estado reproductivo en el momento en que se realiza la prueba

Un atributo final de una prueba ideal de preñez temprana sería la capacidad de determinar el estado reproductivo sin la necesidad de manipular a la vaca para realizar la prueba. Los métodos descritos con anterioridad requieren de manejo individual de las vacas para realizar el diagnóstico, por lo que se espera que los desarrollos tecnológicos futuros cumplan con los criterios antes mencionados para el diagnóstico temprano de la preñez.

Espectroscopia de infrarrojo medio

La espectroscopia de infrarrojo medio por Transformadas de Fourier (FT-MIR, siglas en inglés) es una herramienta de análisis químico que proporciona información sobre enlaces químicos y, por lo tanto, grupos funcionales presentes en una muestra, la información generada se denomina espectro. A medida que la radiación infrarroja (IR) pasa a la muestra, se absorben en longitudes de onda específicas debido a diversos movimientos vibratorios de los enlaces químicos, como estiramiento, contracción y flexión, y los picos espectrales se derivan de la absorción de los cambios energéticos vibratorios en la región IR (Stuart, 2004; Burgula *et al.*, 2007; Mondragón, 2017). La mayoría de las aplicaciones analíticas se encuentran en la región media, que se extiende de 500 a 4000 cm^{-1} (20 a 2.5 μm) (Derrik, 1999; Stuart, 2004).

Esta nueva herramienta ha aumentado en popularidad en la última década, debido a sus características que proporcionan mejores resultados con respecto a los métodos de análisis tradicionales. Aunado a que requieren poco o nulo pretratamiento de las muestras, no es invasivo, el espectro es obtenido de forma

rápida y automática (Grelet *et al.*, 2015; Karoui, 2017). Adicionalmente, los espectros son de fácil almacenamiento, y particularmente los datos contenidos dentro el espectro son muy complejos dado que pueden reflejar tanto la estructura física y molecular (Bittante y Cecchinato, 2013).

En la producción de leche, de acuerdo a los procedimientos establecidos por el manual del ICAR (2018), la espectroscopia FTIR, a nivel mundial es el método rutinario para la determinación de la grasa, lactosa, proteína y sólidos en la leche. Mismo que funciona como parte de los sistemas de pago en algunos países (De Marchi *et al.*, 2014; Bastin *et al.*, 2016).

Por otra parte, mediante el uso de FT-MIR, se han desarrollado nuevas aplicaciones utilizando el espectro completo de la muestra, demostrando que las predicciones basadas en espectros directos son mucho más globales, sensibles y precisas que las basadas en componentes lácteos cuando se predicen a partir de FT-MIR (Grelet *et al.*, 2015). Estas nuevas aplicaciones presentan además la ventaja que las muestras individuales de leche de vaca sujetas a análisis FT-MIR lo hacen como parte del control lechero para determinar los principales componentes de la misma (grasa y proteína principalmente) y, por lo tanto, el costo de la predicción de estos nuevos rasgos no es significativo (Visentin *et al.*, 2015).

Determinación de los componentes de la leche mediante FT-MIR

Los componentes de la leche se vinculan con bandas características en los espectros FT-MIR (Figura 2), debido a su composición química y enlaces químicos que absorben la luz en números de onda específicos. Debido a lo anterior se sabe que la leche de vaca está compuesta aproximadamente de 86 a 88% de agua, 3 a 6% de grasa, 3 a 4% de proteína, 4.5 a 5.2% de lactosa y 0.7% de minerales, que regularmente determinan su calidad. En total tiene de 11 a 14% de sólidos totales (Núñez *et al.*, 2009; Guetouache *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Composición de la leche entera de bovino

Componente	Entera (%)
Agua	88.32
Proteína	3.22
Lactosa	4.52
Ceniza	0.69
Lípidos	3.25
Ácidos grasos del total de lípidos (%)	
Total, saturado	64.90
Total, mono insaturado	28.30
Total, poli insaturado	6.80

(Fuente: Jenkins y McGuire, 2006)

Agua. El agua es el nutriente requerido en la cantidad más alta, es controlada por la cantidad de lactosa sintetizada por las células secretoras de la glándula mamaria (Guetouache *et al.*, 2014). Su función principal es la de dispersante y vehículo, en la cual los glóbulos grasos y demás componentes de mayor tamaño se encuentran emulsionados o suspendidos. Las sustancias proteicas se encuentran formando un coloide, mientras que la lactosa y las sales se hallan en forma de solución verdadera (Agudelo y Bedoya, 2005; Grădinaru *et al.*, 2015). En contraste con lo anterior, el agua puede ser un problema para la técnica de FT-MIR, debido a que sus picos amplios e intensos en el espectro pueden enmascarar a los solutos disueltos (Smith, 2011). Los picos asociados con la molécula del agua en el espectro se ubican en dos áreas: 3200-3600 cm^{-1} , relacionado con la una vibración de estiramiento del enlace O-H (pico más intenso y ancho) y 1650 cm^{-1} , relacionado con una vibración de estiramiento del enlace H-O-H (pico menos intenso), estas áreas generalmente son conocidas como áreas de ruido (Smith, 2011; Mondragón, 2017).

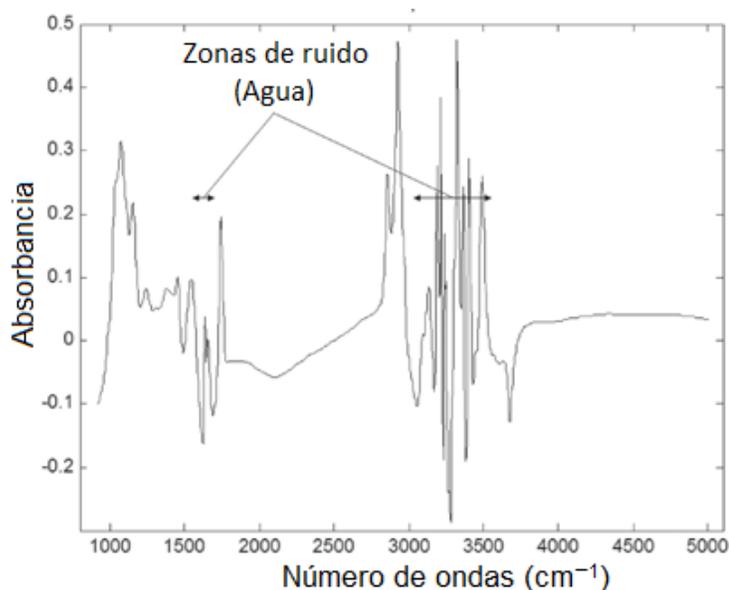


Figura 1. Ubicación de las áreas pertenecientes al agua (zonas con alta variabilidad) en el espectro de la leche. (Fuente: Grelet *et al.*, 2015).

Carbohidratos. La lactosa es el principal carbohidrato casi exclusivo de la leche y otros azúcares están presentes en bajas cantidades como son la glucosa y galactosa. Los carbohidratos son considerados como los segundos componentes en importancia de la leche (Grădinaru *et al.*, 2015). Su concentración varía ligeramente en la leche (4.5 a 5.2 g / 100 g); ya que, a diferencia de la concentración de grasa, la concentración de la lactosa no se puede modificar mediante la alimentación (Guetouache *et al.*, 2014). En las ondas de FT-MIR, la lactosa induce una respuesta de alrededor de $1,045\text{ cm}^{-1}$ con vibración de estiramiento de C–O de las funciones de alcoholes, $1,076\text{ cm}^{-1}$ con vibración de estiramiento de C – O, C – C y C – H, y $1,157$ y $1,250\text{ cm}^{-1}$ con C – O – C éter estiramiento (Smith, 2011, Grelet *et al.*, 2015).

Lípidos. Incluyen ácidos grasos de longitud de cadena y grado de saturación variables. Estos lípidos se derivan casi por igual de la absorción de ácidos grasos preformados circulantes y de la síntesis de ácidos grasos *de novo* en la glándula mamaria (Bauman *et al.*, 2006). La grasa en la leche se encuentra conformada aproximadamente por 98% de triglicéridos, los cuales se sintetizan a partir de más

de 400 ácidos grasos diferentes. El 2% restante de lípidos polares (fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol), y por pequeñas cantidades de ácidos grasos libres (AGL), mono, di y triglicéridos (Lindmark, 2008; Angulo *et al.*, 2009). En términos generales, la grasa láctea está compuesta aproximadamente por 70 % de ácidos grasos saturados, 26 % de ácidos grasos monoinsaturados, y 4 % de ácidos grasos poliinsaturados. Cerca del 11 % de los ácidos grasos saturados son de cadena carbonada corta. Los tres ácidos grasos más abundantes en la fracción lipídica de la leche, son el palmítico C16:0, el mirístico C14:0, y el esteárico C18:0 (Angulo *et al.*, 2009; García *et al.*, 2014). Las cadenas grasas aparecen alrededor de 1,390 y 1,454 cm^{-1} con flexión C–H de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$, y alrededor de 2,862 y 2,927 cm^{-1} con estiramiento C – H de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$. La grasa también aparece alrededor de 1,743 cm^{-1} debido al estiramiento del éster C=O (Smith, 2011, Grelet *et al.*, 2015).

Proteína. La caseína es la proteína más abundante, además de ser la más característica de la leche por no encontrarse en otros alimentos, existen tres tipos de caseínas (α , β y *Kapa caseína*). En la leche también se encuentran otras proteínas como la alfa lacto-albúmina y la beta lacto-globulina (Agudelo y Bedoya, 2005). La caseína tiene un alto valor biológico y, por lo tanto, es una buena fuente de aminoácidos esenciales. Además, es un factor de gran importancia dentro de la industrialización láctea, ya que influye de manera directa sobre el rendimiento y la aptitud tecnológica de la leche (García *et al.*, 2014). Las fracciones de nitrógeno de la leche se pueden dividir en caseína, proteína sérica y Nitrógeno No Proteico (NNP). La caseína comprende aproximadamente el 78% del nitrógeno en la leche, proteína sérica el 17% y el NNP es aproximadamente el 5% (Jenkins y McGuire, 2006; Tripathi, 2014). Las proteínas aparecen alrededor de 1,550 cm^{-1} con picos de estiramiento C–N y N–N. (Smith, 2011, Grelet *et al.*, 2015).

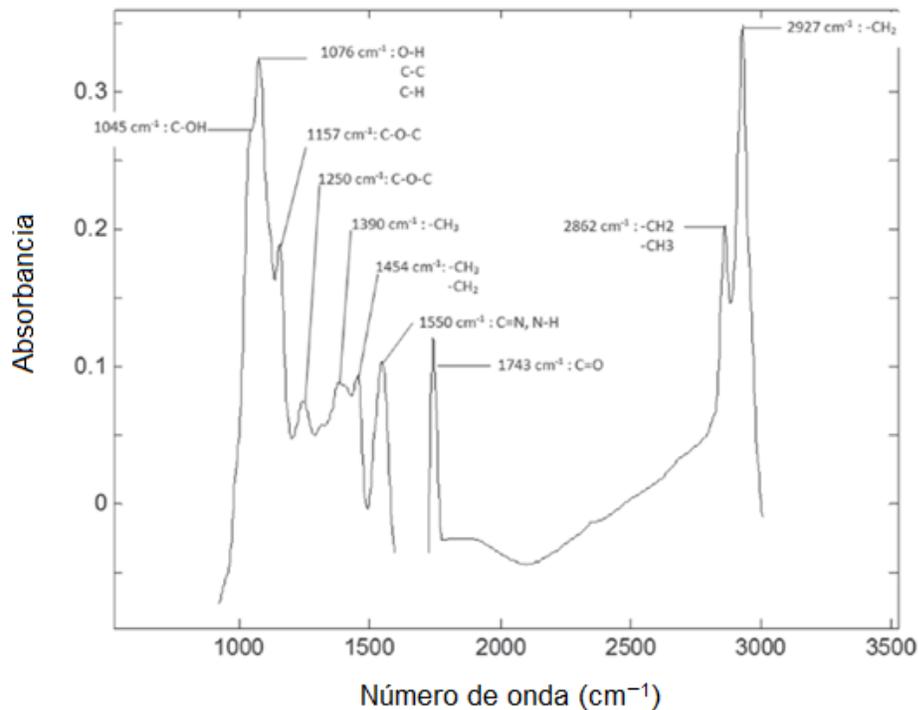


Figura 2 . Espectro de leche entera sin áreas de agua y con ondas específicas para lactosa, proteínas y lípidos. (Fuente: Grelet *et al.*, 2015).

Vitaminas y Minerales. La leche contiene vitaminas como la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, carotenos, nicotinamida, biotina y ácido fólico. Su concentración está sujeta a variaciones debido a la época del año y a la alimentación. Los minerales, desempeñan un papel importante en la organización estructural de las micelas de caseína. La leche de vaca contiene minerales tales como el sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso, hierro, cobalto, cobre, fósforo, fluoruros y yoduros. Además, se reconoce la presencia de otros minerales en cantidades vestigiales, como el aluminio, molibdeno y plata (Agudelo y Bedoya, 2005; Guetouache *et al.*, 2014).

Factores que afectan la composición de la leche

Existe una amplia variedad de factores que pueden afectar la producción y composición de la leche en el ganado lechero. Estos factores pueden dividirse en

endógenos, tales como: raza y potencial genético, etapa de lactación, nivel hormonal o sexo del feto. En cuanto a los factores exógenos, éstos se relacionan con el medio ambiente. Por ejemplo: estación del año, factores climáticos, manejo nutricional, aspectos de manejo o de prácticas de ordeño (Tripathi, 2014; Park, 2016; Barreiro *et al.*, 2017).

Los factores exógenos son los más estudiados, especialmente las modificaciones nutricionales de la dieta, porque ofrecen un medio para mejorar la producción de leche y realizar cambios rápidos en su composición, sobre todo en la grasa, y porque su impacto económico es muy importante (Sutton, 1989; Samková, *et al.*, 2012). Sin embargo, la relación entre los componentes de la leche y factores como la condición fisiológica del animal (salud, ciclo estral, preñez, edad, entre otros) se han estudiado poco (principalmente la preñez) aunque es posible que pueda tener un impacto significativo en la composición de la leche bovina (Laine, *et al.*, 2017; Toledo *et al.*, 2018b).

Efecto de la preñez en la composición de la leche

La preñez puede tener un impacto importante en la composición de la leche bovina, dado que es un estado fisiológico con una demanda elevada de energía y nutrientes (Bauman y Bruce, 1980); El efecto de la preñez en la producción de leche, proteína y grasa se ha visto reflejado en una disminución al comienzo de la gestación, así como una disminución significativa en las etapas posteriores; particularmente a partir de los meses 4 o 5 de gestación, cuando una cantidad considerable de nutrientes disponibles en la sangre de la vaca se destina al mantenimiento y crecimiento del feto (Coulon *et al.*, 1995; Olori *et al.*, 1997; Bohmanova *et al.*, 2009). Además, se menciona que existe una involución de la glándula mamaria relacionada con la preñez atribuido a los cambios hormonales, lo cual se ve reflejado en una disminución de la producción láctea (Akers, 2006).

En este sentido, Loker *et al.*, (2009), observaron una disminución en la producción de la leche a partir de los 120 días de gestación en vacas Ayrshire, Jersey, Pardo

Suizo y Guernsey, similar a lo que mencionan Bohmanova *et al.*, (2009) en vacas de la raza Holstein. En cambio, Penasa *et al.*, (2016) indicaron que la producción de leche de vacas no gestantes no difirió con respecto a las vacas gestantes en los días de gestación antes mencionado. Bohmanova *et al.* (2008), detectaron que el efecto negativo de la preñez sobre la producción de leche se hizo evidente al final de la lactación, con una disminución en la producción de leche (0.8 kg / vaca por día).

Similar a la producción de leche, la disminución en la producción de grasa fue observable a partir de los 120 días como lo mencionan Loker *et al.*, (2009). Sin embargo, Roche (2003) y Bohmanova *et al.*, (2009) observaron una disminución significativa a partir de los 150 días. Este efecto en la grasa de la leche puede observarse en una disminución aproximada de 0.06 Kg/vaca por día, como lo muestran Bohmanova *et al.*, (2008); En relación a la proteína de la leche, el posible efecto de la preñez fue más variable respecto a los días de gestación, en donde se observaron a partir del día 60 como lo menciona Loker *et al.*, (2009), 120 días observado por Bohmanova *et al.*, (2009) y 168 días por Roche (2003), con una disminución en la producción de proteína de 0.04 kg / vaca por día estimada por Bohmanova *et al.* (2008).

Los estudios mencionados anteriormente, han indicado un incremento significativo en el contenido de grasa, proteína y sólidos totales de la leche en vacas gestantes en la etapa final de la gestación, en relación a vacas no gestantes.

JUSTIFICACIÓN

Algunos ganaderos del sistema intensivo han optado por realizar la determinación de los componentes de la leche de manera sistemática e individual, principalmente para evaluar las dietas formuladas en los establos, así como también establecer grupos de vacas con diferentes niveles de producción y seleccionar animales para el mejoramiento genético del hato. La determinación de los componentes de la leche se realiza mediante un espectrofotómetro de infrarrojo medio por transformadas de Fourier, lo que genera información espectral que hace posible cuantificar los componentes de la leche, tales como grasa, proteína, lactosa, entre otros. Estudios recientes demuestran que esta información tiene el potencial de predecir otras características, las cuales agregarían valor al proceso de determinación de componentes de leche, dado que la predicción de nuevas características no representaría un costo adicional para el productor. Tal es el caso de la confirmación de la gestación en vacas, en donde los métodos de rutina requieren de un manejo adicional de los animales, aunado a esto, dichos métodos son costosos y tienen una eficiencia cuestionable. Derivado de lo anterior, el uso de la información espectral puede ser útil para monitorear el estado reproductivo de las vacas, con la finalidad de asistir a los ganaderos en la toma de decisiones en el manejo reproductivo. Esto, ya ha sido realizado en otros países en donde se han tenido resultados favorables relacionando los componentes de la leche con el ciclo estral y gestación de las vacas. Sin embargo, la utilización de la información espectral para monitorear el estado reproductivo no es claro y requiere ser ajustada para cada población.

HIPÓTESIS

Los espectros infrarrojos generados a partir de los análisis de los componentes de la leche dentro de los programas de control de producción aportan información para monitorear la gestación en las vacas.

OBJETIVOS

General

Evaluar la utilidad de espectros de infrarrojo medio en la identificación de la preñez en vacas productoras de leche.

Específicos

- Identificar los factores que podrían afectar la relación de la información espectral y el estado reproductivo de la vaca.
- Evaluar la factibilidad de monitorear la preñez a través de los espectros de infrarrojo medio provenientes de muestras de leche en ganado Holstein.

MATERIAL Y MÉTODOS

La información para la realización del presente estudio fue proporcionada por la Asociación Holstein de México, A.C. (AHM). A partir de esta información, se seleccionaron registros productivos y reproductivos de ocho hatos, que cuando menos tuvieran seis registros anuales (espectros) de análisis de componentes de la leche por año calendario entre 2010 y 2017.

Edición de los datos

La información obtenida de los animales con el propósito de identificarlos correctamente en las diferentes bases de datos y así crear una base de datos única fue: Identificación, establo y fecha de nacimiento.

Información productiva. Consistió de número de lactación, fecha de toma de muestra, días en lactación a la fecha de muestreo, producción de leche al momento de la toma de muestra y fecha de análisis de la muestra de leche.

Se eliminó la información de aquellos animales que no contaran con identificación única en el hato o donde ésta fuera errónea y se descartó información de animales cuyos padres o madres no pertenecieran a la raza Holstein, con el objetivo de contar únicamente con información de animales de esta raza para los análisis.

Información reproductiva. Consistió en la fecha de parto, fecha de último servicio, días abiertos, diagnóstico de gestación e intervalo entre partos (**IP**). En esta base de datos se requirió que las vacas tuvieran información como mínimo de dos partos consecutivos, con la finalidad de poder asignar la fecha de concepción (que fue posteriormente avalada con información de servicios y confirmaciones de gestación) e identificar fehacientemente el estado reproductivo al que correspondieron los espectros disponibles.

Se eliminó información de animales donde no se pudo calcular el IP. La información de animales con intervalos entre partos superiores a 718 días (la media más tres desviaciones estándar) fueron eliminadas, con el propósito de eliminar la mayor

proporción de información que pudiera ser errónea. Adicionalmente, se descartó la información de los animales con información reproductiva inconsistente (p. ej. días abiertos iguales a cero, o iguales o mayores al intervalo entre partos).

La fecha probable de concepción para cada vaca se determinó substrayendo de la fecha de siguiente parto el período normal de gestación en bovinos lecheros (282 d) y contrastando esta fecha con el último servicio registrado. Si esta última fecha indicaba un período de gestación menor a 317 días, se consideraba la fecha de último servicio como fecha probable de gestación.

Información del espectro de la leche. Las muestras de leche fueron procesadas por un espectrofotómetro (Combiscope FTIR 400 Delta) en el Laboratorio de Calidad de Leche de la AHM, de la cual se obtuvo la información espectral antes y después de la fecha probable de gestación. El espectro comprende de las absorbancias obtenidas en la región media del infrarrojo con 935 lecturas en longitudes de onda entre 4000 y 397 cm^{-1} o correspondientes a 2 μm a 25 μm .

La edición realizada a base de datos de los espectros consistió en un análisis de componentes principales sobre los espectros junto con el cálculo de las distancias de Mahalanobis como lo explican Toledo *et al.*, (2018a). Las muestras con un nivel de probabilidad ≤ 0.01 fueron consideradas como valores extremos y fueron eliminadas de la base de datos.

Se definió como espectros pertenecientes a vacas gestantes a aquellos que se obtuvieron en fecha posterior a la fecha de concepción y espectros pertenecientes a vacas no gestantes a los obtenidos antes de la misma fecha.

Para evaluar el posible efecto ambiental relacionado con la época del año, se crearon dos grupos con base en la fecha del muestreo. El primer grupo consistió en fechas de análisis de junio a noviembre y el segundo de diciembre a mayo.

Finalmente, la base de datos final se constituyó de 77,389 espectros correspondientes a 11,989 vacas, de los cuales 56,001 espectros correspondieron

a vacas gestantes y 21,388 a vacas no gestantes. La edición y preparación de la base de datos se realizaron en el software R (R Core Team, 2018).

Análisis de la información

Para el análisis del estado reproductivo, vacas gestantes y vacas no gestantes (1 o 0, respectivamente) se evaluaron dos modelos lineales generalizados con una función enlace *probit*. Con el objeto de evaluar la posibilidad de predecir el estado reproductivo de la vaca a partir de la información contenida en los espectros, se ajustó un modelo (**Modelo 1**) que incluyó únicamente los efectos de las 935 longitudes de onda del espectro como variables independientes. Adicionalmente, para evaluar el posible efecto de hato-estación, número parto, días en lactación, producción de leche al momento del muestreo sobre la eficiencia del modelo anterior, se ajustó otro modelo (**Modelo 2**) que incluyó a los efectos antes mencionados en adición a la información de los espectros.

Ambos modelos fueron ajustados utilizando la misma ecuación:

$$\Pr (y_i = 1 | x_{ij}) = \beta_0 + \sum_{j=1}^p \beta_j x_{ij} + \varepsilon_i$$

Donde:

$\Pr (y_i = 1 | x_{ij})$ = Es la probabilidad de que una vaca i esté gestante dado el conjunto de variables x_{ij}

β_0 = Es el intercepto

x_{ij} = Son las variables independientes a utilizar (Depende del modelo)

$\beta_{j(j=1,\dots,p)}$ = Son los coeficientes de regresión de los efectos de las variables independientes

ε_i = Es el término del error \sim NID (0,1)

Ambos modelos fueron implementados utilizando la paquetería BGLR de R (Pérez y De los Campos, 2014).

Se realizó una validación cruzada con diez repeticiones en ambos modelos, la cual consiste en evaluar el rendimiento de un modelo con parámetros que se derivaron del conjunto de entrenamiento (Lever *et al.*, 2016b). A partir de los resultados predichos se construyó una matriz de confusión (Cuadro 2) para cada uno de los modelos, la matriz estuvo compuesta por los positivos verdaderos (PV), falsos positivos (FP), falsos negativos (FN) y negativos verdaderos (NV), mismos que sirven para calcular las siguientes métricas:

Cuadro 2. Matriz de confusión para el cálculo de la sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión (Fuente: Lever *et al.*, 2016a).

		Predicho	
		+	-
Actual	+	PV	FN Error tipo II
	-	FP Error tipo I	NV

Sensibilidad. Es la proporción de positivos que el modelo predice correctamente.
 $PV / (PV + FN)$.

Especificidad. Es la proporción de negativos que el modelo predice correctamente.
 $NV / (NV + FP)$.

Exactitud. Es la proporción de los resultados predichos (positivos y negativos) por el modelo que son verdaderos. $(PV + NV) / \text{Total de observaciones}$.

Precisión. Es la proporción de los predichos positivos que son verdaderos. $PV / (PV + FP)$.

De igual forma, se realizó el análisis de los resultados predichos mediante la aplicación de la curva de características operativas del receptor (ROC) y la curva de recuperación de precisión (PR), que son representaciones gráficas de un sistema de clasificación binaria, determinándose el área bajo la curva (AUC) de ambas gráficas utilizando el paquete PRROC (Grau *et al.*, 2015) en el programa computacional R (R Core Team, 2018).

RESULTADOS

Las estadísticas descriptivas de las variables días abiertos, intervalo entre partos, número de lactación, duración de gestación, días en lactación y producción de leche al momento del muestreo de las 11,989 vacas utilizadas en el estudio se muestran en Cuadro 3.

Cuadro 3. Estadísticas descriptivas de variables productivas y reproductivas útiles para el desarrollo del modelo.

Variable	Mínimo	Media	Máximo	DE
Días abiertos	21	119.75	289.00	54.62
Intervalo entre partos (días)	278	397.44	583.00	55.06
Número de lactación	1	1.97	9.00	1.17
Duración de gestación (días)	248	277.69	316.00	6.21
Días en lactación	2	181.12	500.00	93.63
Producción leche en el día del muestreo (Kg)	2	38.86	85.60	8.92

DE= Desviación estándar

Las probabilidades predichas de las validaciones cruzadas en los Modelos 1 y 2, con respecto a la gestación se presentan en las siguientes gráficas. En la Figura 3, se puede apreciar que, para el Modelo 1, el 50% de las probabilidades de clasificación de vacas no gestantes se encuentra entre el 0.40 y 0.72, mientras que el 50% de las probabilidades de clasificación de vacas gestantes se encuentra entre 0.77 y 0.90.

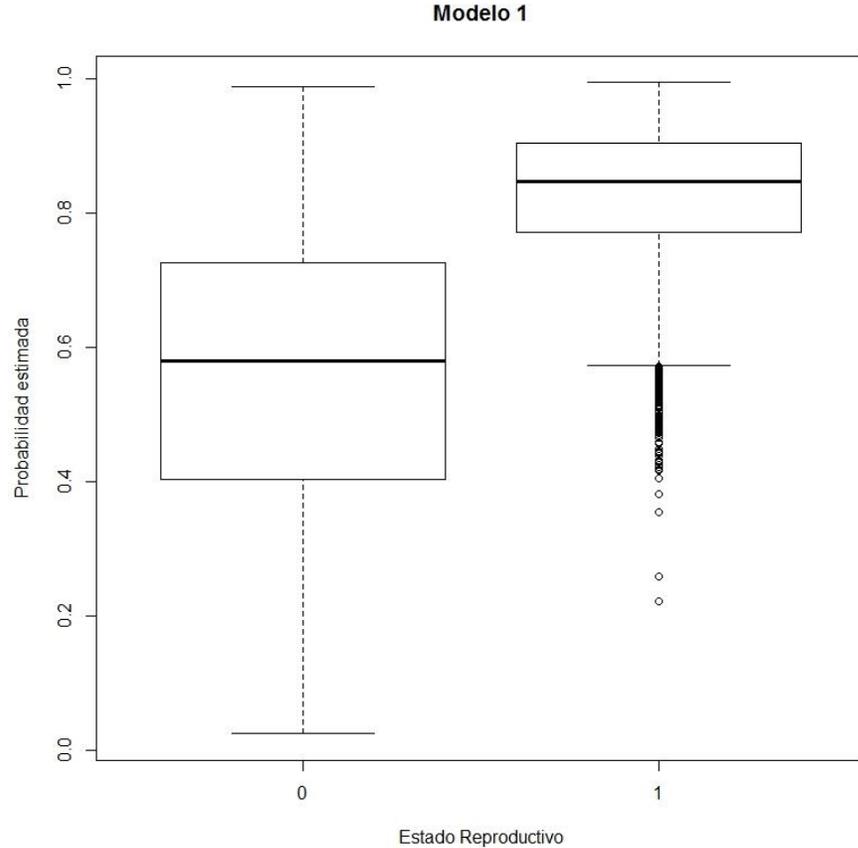


Figura 3. Distribución de las probabilidades obtenidas por el Modelo 1 en relación a la gestación de las vacas, representado en un diagrama de caja y bigotes (0= No gestante y 1= Gestante).

De igual modo, las probabilidades predichas mediante el Modelo 2, se muestran en la Figura 4, donde se puede observar que el 50% de las probabilidades de clasificación de vacas no gestantes del Modelo 2, se encuentra entre el 0.04 y 0.60. Mientras que el 50% de las probabilidades de clasificación de las vacas gestantes se encuentran entre 0.84 y 0.98.

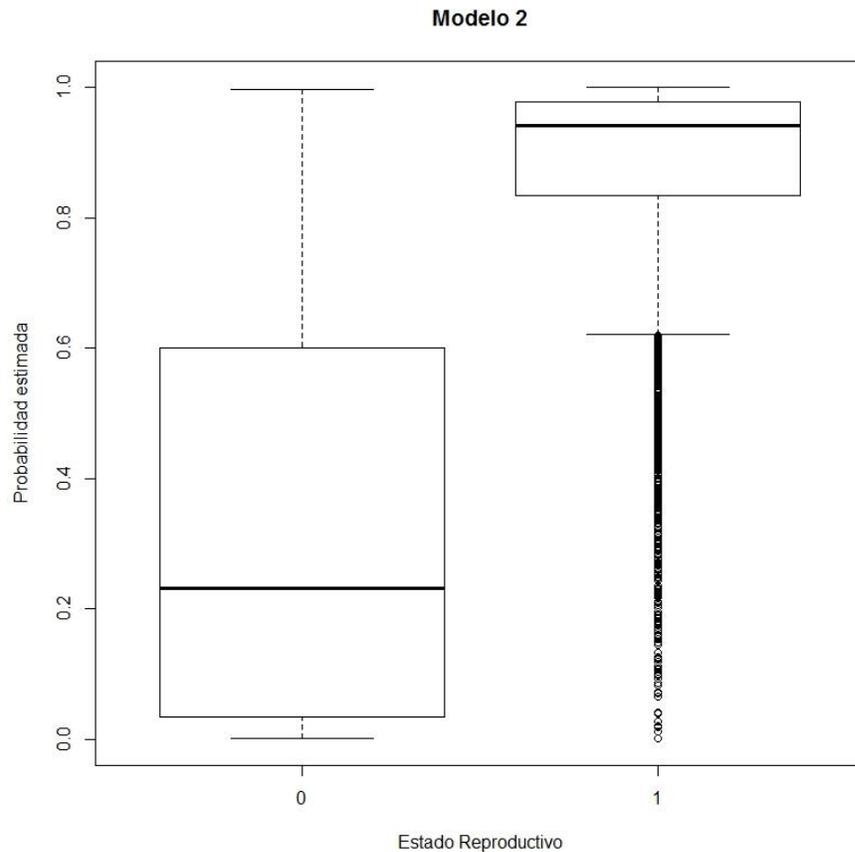


Figura 4. Distribución de las probabilidades obtenidas por el Modelo 2 en relación a la gestación de las vacas, representado en un diagrama de caja y bigotes (0= No gestante y 1= Gestante).

También se realizó el conteo y clasificación de los resultados obtenidos en las validaciones cruzadas de cada uno de los modelos (Cuadro 4). La clasificación se obtuvo comparando la probabilidad predicha por los modelos con la clasificación observada de cada espectro perteneciente al estado reproductivo de la vaca con el estado real. Se utilizó una probabilidad límite de clasificación: las probabilidades de gestación predichas iguales o menores a 0.50 correspondieron a vacas no gestantes y el resto a vacas gestantes.

Cuadro 4. Conteo de los resultados predichos del Modelo 1 y del Modelo 2 del estado reproductivo de las vacas gestantes y no gestantes.

Elementos relevantes	Modelo 1	Modelo 2
Positivos verdaderos	55474	52876
Falsos positivos	12994	6352
Falsos negativos	527	3185
Negativos verdaderos	8394	15036

A partir de estos conteos se calcularon la sensibilidad, la especificidad, la exactitud y la precisión. En el Modelo 1, la sensibilidad fue de 99% que corresponde al porcentaje de vacas clasificadas como gestantes de forma correcta. La especificidad fue de 39% correspondiente a vacas clasificadas como no gestante, mientras la precisión y la exactitud fueron de 81 y 82% respectivamente; la primera indica el porcentaje de vacas gestantes predichas correctamente. La segunda muestra el porcentaje de las predicciones que son reales tanto en vacas gestantes como en vacas no gestantes. Con respecto al Modelo 1, los resultados del Modelo 2 mostraron una sensibilidad menor (94%), pero especificidad, precisión y exactitud mayores (70%, 89% y 87%, respectivamente).

Dado que el estado reproductivo corresponde a una clasificación binaria, el rendimiento del clasificador fue evaluado mediante la curva ROC y el AUC-ROC (Grau *et al.*, 2015). Por lo tanto, se obtuvieron las AUC de ambos modelos, siendo de 0.65 (Modelo 1) y 0.77 (Modelo 2) como se muestran en las Figuras 5 y 6 respectivamente. Las AUC expresan la probabilidad de que el modelo pueda distinguir entre espectros pertenecientes a vacas gestantes y no gestantes.

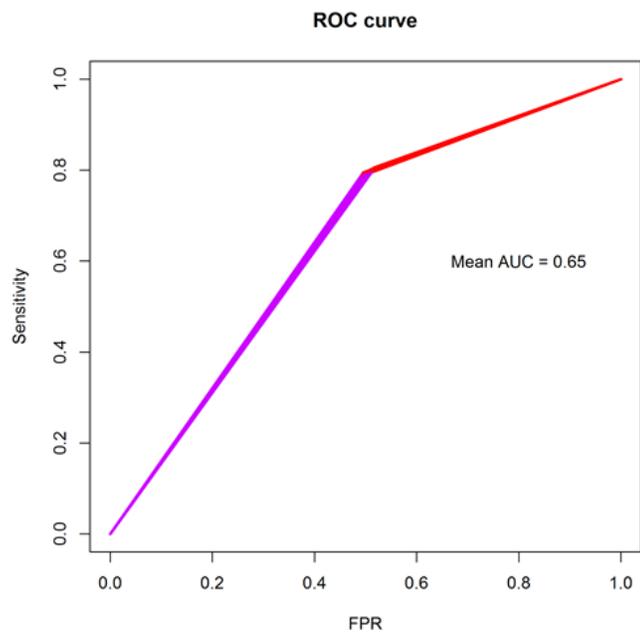


Figura 5. Curvas ROC obtenidas utilizando 10 repeticiones en las validaciones cruzadas del Modelo 1.

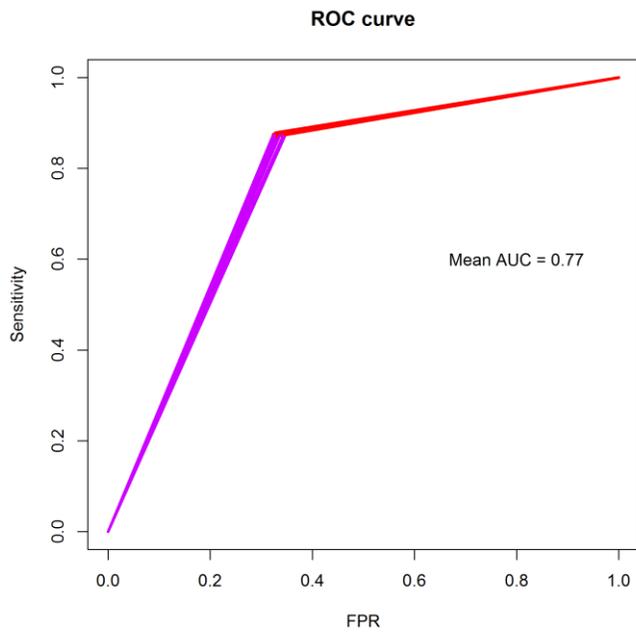


Figura 6. Curvas ROC obtenidas utilizando 10 repeticiones en las validaciones cruzadas del Modelo 2.

El desbalance en la proporción de espectros de vacas gestantes (56,001) con no gestantes (21,388) puede causar que las curvas ROC sean deficientes y muestren un bajo rendimiento del clasificador; en este sentido, AUC-PR es un indicador más adecuado para esta situación (Grau *et al.*, 2015). En este estudio el AUC-PR fue de 0.82 (Modelo 1) y 0.86 (Modelo 2).

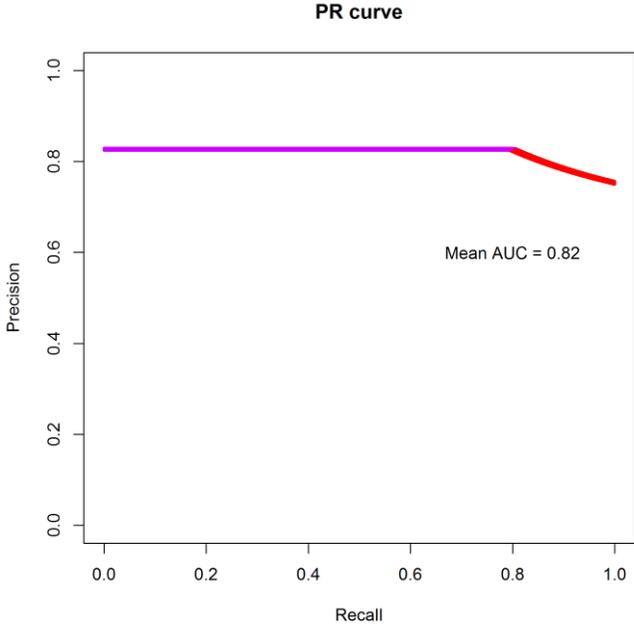


Figura 7. Curvas PR obtenidas utilizando 10 repeticiones en las validaciones cruzadas del Modelo 1.

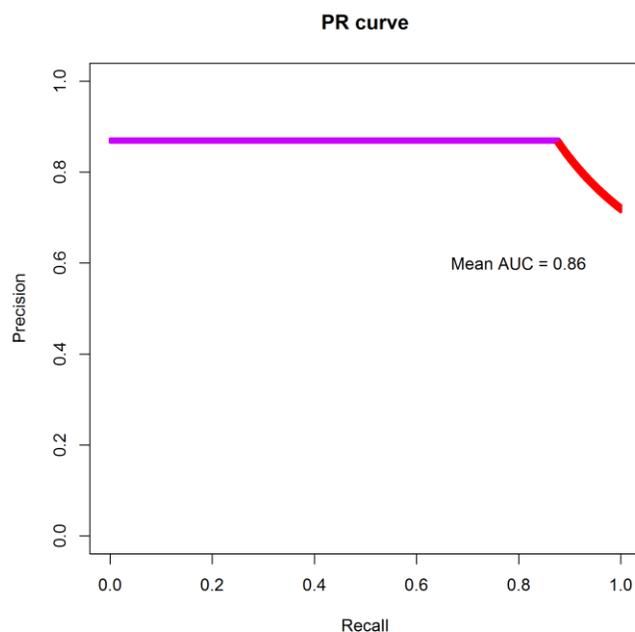


Figura 8. Curvas PR obtenidas utilizando 10 repeticiones en las validaciones cruzadas del Modelo 2.

Finalmente, se graficaron los efectos con valores absolutos correspondientes a los coeficientes de regresión de cada número de onda, a través de sus promedios y desviaciones estándar, obtenidos en las 10 repeticiones en las validaciones cruzadas, estas ondas son los que conforman al espectro de la leche (Figura 9 y 10), correspondientes a los Modelos 1 y 2, respectivamente.

Las ondas que muestran un efecto significativo son mencionadas en cinco regiones caracterizadas y utilizadas por (Bittante y Cecchinato, 2013) del espectro FTIR, las cuales son: Región 1 (5,000 a 3,673 cm^{-1}), Región 2 (3,669 a 3,052 cm^{-1}), Región 3 (3,048 a 1,701 cm^{-1}), Región 4 (1,698 a 1,586 cm^{-1}) y Región 5 (1,582 a 930 cm^{-1}).

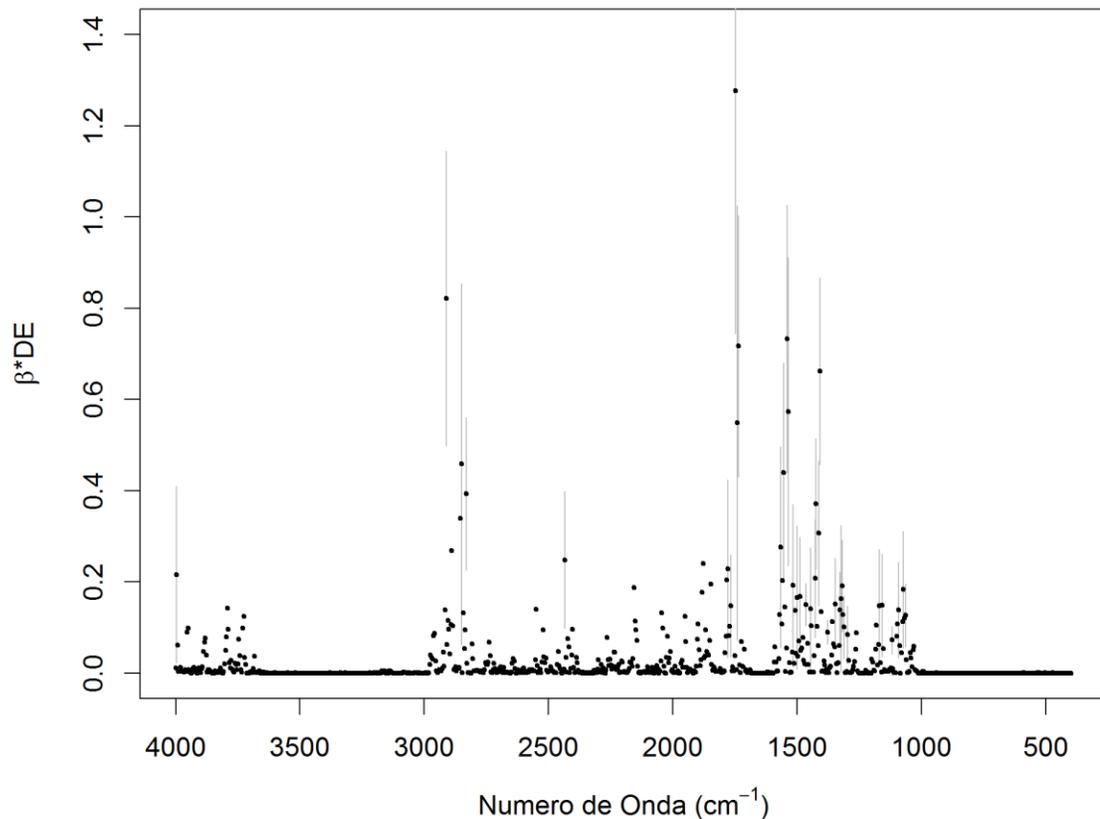


Figura 9. Valores absolutos del promedio e intervalos de confianza de los coeficientes de regresión de cada onda del espectro, obtenidos en el Modelo 1.

Coeficientes de regresión que muestran un efecto significativo en el espectro de la leche con relación al estado reproductivo de las vacas.

En el Modelo 1, la Región 1, 3 y 5 mostraron ondas importantes con 1, 9 y 25, respectivamente. En la Región 1 fue el 3, 996 cm^{-1} . En la Región 3 fueron, 2912, 2850, 2831, 2433, 1778, 1778, 1766, 1747, 1739 y 1735 cm^{-1} . En la Región 5 fueron, 1566, 1554, 1539, 1535, 1515, 1500, 1488, 1465, 1446, 1427, 1423, 1411, 1407, 1377, 1346, 1326, 1323, 1311, 1296, 1168, 1157, 1118, 1091, 1072 y 1064 cm^{-1} .

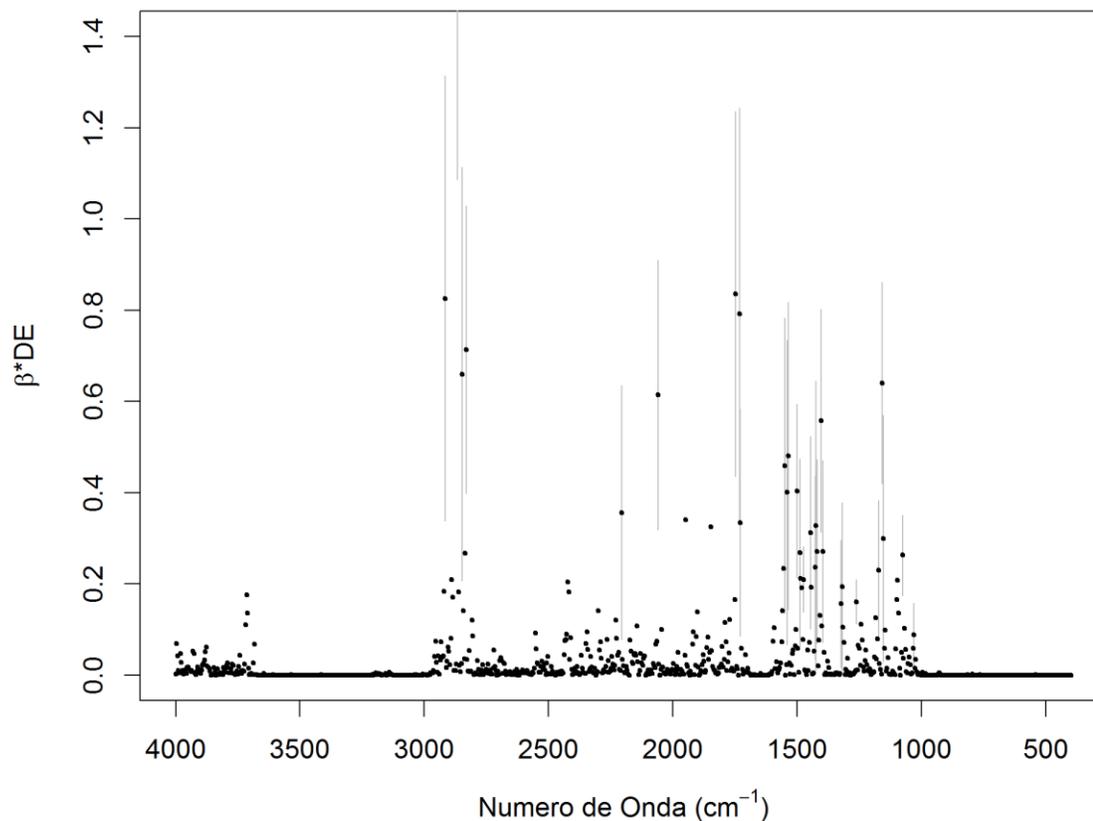


Figura 10. Valores absolutos del promedio e intervalos de confianza de los coeficientes de regresión de cada onda del espectro, obtenidos en el Modelo 2.

Para el Modelo 2, los efectos importantes, fueron obtenidos únicamente en las Regiones 3 y 5, con 9 y 20 ondas, respectivamente. En la Región 3 fueron, 2916, 2866, 2846, 2831, 2206, 2059, 1747, 1731 y 1728 cm^{-1} . En la Región 5 fueron, 1550, 1539, 1535, 1500, 1488, 1473, 1446, 1427, 1423, 1419, 1404, 1396, 1323, 1319, 1261, 1172, 1157, 1153, 1076 y 1029 cm^{-1} .

DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó, la utilidad del uso de la información espectral a partir de muestras de leche, como una herramienta capaz de relacionarse con características productivas o reproductivas, tal es el caso para confirmar el estado reproductivo de las vacas, que influye en gran medida sobre la productividad general del hato.

Las estadísticas descriptivas de las variables estudiadas en la población de las vacas lecheras de la raza Holstein mostraron un promedio similar de 119 ± 55 días abiertos y su correspondiente intervalo entre partos de 13 ± 1.8 meses en promedio, con respecto a las poblaciones de la raza Holstein estudiadas por Mariscal *et al.*, (2016) y Montaldo *et al.*, (2010). El promedio de la producción diaria de leche 38 ± 8.92 Kg y los días en lactación 181 ± 93 , fueron ligeramente mayores a los mostrados por Toledo *et al.* (2018a) y Ho *et al.*, (2019), quienes realizaron estudios de los espectros relacionados al estado reproductivo de las vacas de la raza Holstein, Pardo Suizo, Simmental, Pardo Alpino y Jersey.

La predicción del estado reproductivo mediante el uso exclusivo de la información espectral, muestra dispersión considerable de las probabilidades en la clasificación de una vaca no gestante, con una probabilidad promedio de 0.58, indicando una baja habilidad predictiva del modelo. En el caso de clasificación de una vaca gestante, el resultado fue más consistente ya que la probabilidad promedio fue de 0.84 y la dispersión menor. Mientras que, Delhez *et al.*, (2020) obtuvieron probabilidades promedio en sus diferentes estrategias implementadas para la clasificación del estado reproductivo, presentando un rango de 0.58 a 0.65, el cual fue incrementando al categorizar la gestación y esta fuera avanzada.

Por otra parte, la inclusión de efectos fijos a la información espectral mejoró el promedio de probabilidad en ambas categorías, mostrando una probabilidad promedio de 0.24 a pesar de tener una dispersión mayor de las probabilidades en la predicción de vacas no gestantes, mientras la probabilidad promedio fue de 0.94

para vacas gestantes. A pesar de ello, la inclusión de efectos sugeriría una remodelación constante, haciendo menos eficiente el proceso.

Se construyó la matriz de confusión en la cual es posible observar las relaciones entre las salidas del clasificador y las verdaderas, a través de las métricas más comunes. Para ello, el límite de clasificación de las probabilidades del estado reproductivo, fueron iguales o menores a 0.50, correspondientes a vacas no gestantes y el resto a vacas gestantes.

Las métricas calculadas a través de las validaciones cruzadas, muestran resultados alentadores para el uso de la información espectral. Se obtuvo un valor superior de sensibilidad utilizando únicamente como predictor la información espectral (99%), en comparación a lo encontrado por Delhez *et al.*, (2020), quienes tuvieron una sensibilidad promedio de 60% en sus validaciones. Sin embargo, la especificidad mostrada por ellos fue superior en 20 unidades porcentuales a la especificidad obtenida en el presente trabajo (39%). Esto muestra que el modelo podría tener una buena capacidad para predecir los espectros pertenecientes a vacas gestantes.

Además, al observar el comportamiento del modelo con la adición de efectos fijos a la información espectral, se encontraron valores deseables, mejorando la especificidad hasta en 31% más con respecto al Modelo 1. Estos resultados son comparables a los encontrados por Laine *et al.*, (2014) aunque con diferente metodología utilizando espectros residuales después de corregir varios efectos asociados con las vacas no gestantes mediante un análisis discriminante en la validación, obteniendo una sensibilidad de 99.7% y una especificidad de 86.2. Sin embargo, al utilizar ellos el espectro completo sin modificación, los resultados no fueron favorables, al grado de tener una tasa de error de clasificación de 55.5%; Así mismo, se han observado sensibilidades y especificidades optimistas al categorizar la gestación, encontrando desde 57 a 76% y 58 al 78% respectivamente, los cuales mejoran conforme la gestación se encuentra en las últimas etapas (Delhez *et al.*, 2020).

Respecto a lo anterior, la sensibilidad y especificidad obtenidas a través de la matriz de confusión para ambos modelos dependen de un umbral de clasificación elegido arbitrariamente. Por tanto, su representación gráfica en diferentes umbrales de probabilidad se puede visualizar mediante curvas, que luego se pueden comparar cuantitativamente por el área bajo la curva (AUC) (Keilwagen *et al.*, 2014). La ROC y su AUC, son ampliamente aceptadas como una medida general del rendimiento del clasificado indicando que tan bien distingue el modelo en dos categorías (Grau *et al.*, 2015, Sing *et al.*, 2005). La precisión diagnóstica del modelo es buena si el valor del AUC está entre 0.70 y 0.80 (Šimundić, 2009). De la misma manera, considerar que los valores de AUC pueden verse afectados por la forma en que son realizadas las validaciones cruzadas, lo que es probable que conduzca a resultados demasiado optimistas (Delhez *et al.*, 2020).

El Modelo 1 mostró resultados comparables, con una diferencia de 0.05, al valor obtenido por Toledo *et al.*, (2018a) en el promedio de las AUC (0.60) de las validaciones cruzadas, utilizando el espectro completo de muestras de leche de la raza Holstein. Así mismo, los resultados obtenidos fueron más similares a los mostrados en un estudio reciente utilizando una metodología semejante realizada por Delhez *et al.* (2020). Con relación al AUC perteneciente al Modelo 2, éste fue superior respecto al Modelo 1 alcanzando la clasificación buena en relación a la precisión diagnóstica del modelo.

A pesar de su popularidad, la curva ROC tiene algunos inconvenientes, incluido el desacoplamiento del sesgo de clase (Keilwagen *et al.*, 2014); esto puede causar que las curvas sean deficientes y muestren un bajo rendimiento del clasificador; en este sentido, AUC-PR es un indicador más adecuado para esta situación (Lever *et al.*, 2016, Grau *et al.*, 2015). En el presente estudio el desbalance en la proporción de espectros fue de vacas gestantes (56,001) con no gestantes (21,388), diferente a la utilizada en otros estudios, en donde buscaron equilibrar sus proporciones en sus clases (Delhez *et al.*, 2020).

El AUC-PR de ambos modelos en el presente estudio, fueron casi similares con una diferencia de 0.04, mostrando una buena habilidad predictiva de las vacas que realmente están gestantes, ya que evalúan la fracción de verdaderos positivos entre las predicciones positivas (Davis y Goadrich, 2006).

Finalmente, el efecto relativo del estado reproductivo de las vacas sobre el espectro MIR de la leche fue visualizado mediante los coeficientes de regresión, mostrándose similitudes en ambos modelos ajustados. La región que comprende entre los 930 a 1582 cm^{-1} mostró un mayor número de coeficientes significativos, semejante a lo mencionado por Laine *et al.*, (2017), en donde obtuvieron el mayor efecto de la gestación. Se sabe que esta región (a veces denominado, región de huellas dactilares) es muy importante en el análisis basado en FTIR porque contiene información importante sobre la estructura química de la materia analizada (Bittante y Cecchinato, 2013).

Por lo anterior, tanto los resultados obtenidos en este trabajo como en los ya realizados (Laine *et al.*, 2014, Laine *et al.*, 2017, Toledo *et al.*, 2018b, Delhez *et al.*, 2020), muestran resultados limitados para dictaminar el estado reproductivo de las vacas, pero a la vez estos resultados son prometedores ya que abren la posibilidad de seguir intentando relacionar la composición detallada de la leche obtenida en el espectro con la preñez.

Finalmente, la capacidad que muestra el uso FTIR como una herramienta de predecir con precisión el resultado del estado reproductivo de las vacas posterior a una inseminación (es decir, gestante o no gestante) permitiría a los productores implementar estrategias para optimizar las decisiones en el manejo reproductivo (Laine *et al.*, 2017), mejorando la rentabilidad del hato a través de un mejor control de los desechos, cantidad de reemplazos y venta de leche. Así mismo, un beneficio adicional al implementar esta herramienta podría ser una disminución de los días abiertos o monitorear abortos que a veces son difíciles de observar (Delhez *et al.*, 2020).

CONCLUSIÓN

La información espectral obtenida del análisis de las muestras de leche tiene una utilidad limitada para el diagnóstico de gestación, por lo cual, es necesario continuar con investigaciones más detalladas en los modelos o buscar estrategias que nos permitan mejorar la precisión. Sin embargo, la información espectral tiene el potencial de monitorear la preñez, ya que mostró una buena identificación de las vacas gestantes. Esto hace posible que los productores puedan implementar estrategias en el manejo reproductivo a partir de información rutinariamente colectada, economizando tiempo y dinero que serán reflejados en la rentabilidad del hato.

REFERENCIAS

1. Agudelo GDA, Bedoya MO. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. Revista Lasallista de Investigación, vol. 2, núm. 1, enero-junio, 2005, pp. 38-42.
2. Akers RM. (2006). Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. J. Dairy Sci. 89(4):1222–1234.
3. Amendola R. (2002). A dairy system based on forages and grazing in temperate México. [Tesis Doctorado]. Wageningen, Holanda; Universidad de Wageningen. <http://edepot.wur.nl/198963>
4. Angulo AJ, Mahecha LL, Olivera AM. (2009). Síntesis, composición y modificación de la grasa de la leche bovina: Un nutriente valioso para la salud humana. Revista MVZ Córdoba. 14(3):1856-1866.
5. Arriaga JCM, Heredia ND, Martínez GCG, Rayas AAA. (2013). Importancia de los sistemas de producción de leche a pequeña escala en México. In: 1er Congreso nacional de producción, calidad, transformación, comercialización y nutrición de la leche y sus derivados. UAEM. ICAR.
6. Balhara AK, Gupta M, Singh S, Mohanty AK, Singh I. (2013). Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions. The ScientificWorld Journal. 1-10.
7. Bastin C, Théron L, Lainé A, Gengler N. (2016). On the role of mid-infrared predicted phenotypes in fertility and health dairy breeding programs. J. Dairy Sci. 99(Sym): 1-15.
8. Bauman DE, Bruce CW. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation. A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. J. Dairy Sci. 63: 1514-1529.
9. Bauman DE, Mather IH, Wall RJ, Lock AL. (2006). Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. J. Dairy Sci. 89 (4):1235–1243.

10. Bittante G, Cecchinato A. (2013). Genetic analysis of the Fourier transform infrared spectra of bovine milk with emphasis on individual wavelengths related to specific chemical bonds. *J. Dairy Sci.* 96 (9):5991–6006.
11. Bohmanova J, Jamrozi J, Miglior F. (2009). Effect of pregnancy on productions traits of Canadians Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 92(6):2947–2959.
12. Bohmanova J, Miglior F, Jamrozik J, Schaeffer LR, Loker S. (2008). Accounting for the effect of pregnancy in the Canadian Test Day Model. Presented at Interbull, Annu. Meeting, Niagara Falls, NY, jun. 2008.
13. Burgula Y, Khali D, Kim S, Krishnan S, Cousin MA, Gore JP, et al. (2007). Review of mid-infrared fourier transform-infrared spectroscopy applications for bacterial detection. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology.* 15: 146-175.
14. Camacho VJH, Cervantes EF, Palacios RMI, Cesín VA, Ocampo LJ. (2017). Especialización de los sistemas productivos lecheros en México: la difusión del modelo tecnológico Holstein. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 8(3): 259-268.
15. CANILEC. (2018). Estadísticas del sector lácteo 2010-2017. Cámara Nacional de Industriales de la Leche. México. <http://www.canilec.org.mx/estadisticas-lacteos-2010-2017.pdf> Consultado 23 mayo, 2018.
16. Cavestany D. (2005). Producción animal: Manejo reproductivo en vacas de leche ¿Producir o no producir? *INIA.* (4): 2-5.
17. Commun L, Velek K, Barbry JB, Pun S, Rice A, Mestek A, et al. (2016). Detection of pregnancy-associated glycoproteins in milk and blood as a test for early pregnancy in dairy cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 28(3): 207–213.
18. Coulon JB, Pérochon L, Lescourret F. (1995). Modelling the effect of the stage of pregnancy on dairy cows' milk yield. *Animal Science.* 60:401-408.
19. Crowe MA, Hostens M, Opsomer G. (2018). Reproductive management in dairy cows-the future. *Irish Veterinary Journal.* 71(1): 1-13.
20. Davis, J. and Goadrich, M. (2006) The relationship between precision-recall and ROC curves. In: *Proceedings of the 23rd International Conference on Machine Learning.* ACM, New York, pp. 233–240.

21. De Marchi M, Toffanin V, Cassandro M, Penassa M. (2014). Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits. *J. Dairy Sci.* 97(3):1171–1186.
22. De Vries A. (2006). Determinants of the cost of days open in dairy cattle. Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. Cairns, Australia. <http://www.sciquest.org.nz/isvee>
23. Delhez P, Ho PN, Gengler N, Soyeurt H, Pryce JE. (2019). Diagnosing the pregnancy status of dairy cows: How useful is milk mid-infrared spectroscopy? *J. Dairy Sci.* 103 (4): 1-11.
24. Derrik MR, Stulik D, Landry JM. (1999). Infrared spectroscopy in conservation science. 1st ed. The Getty Conservation Institute. Los Angeles, USA.
25. FINRURAL. (2009). Bovino y sus derivados. Financiera Rural. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. México. <http://www.gbcbiotech.com/bovinos/industria/Bovino%20y%20sus%20derivados%20Financiera%20Rural%202012.pdf> Consultado 23 mayo, 2018.
26. FIRA. (2019). Panorama Agroalimentario: Leche y Lácteos. <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2019/06/Panorama-Agroalimentario-Leche-y-la769cteos-2019.pdf>. Consultado en febrero 2020.
27. Fricke PM, Ricci A, Giordano JO, Carvalho PD. (2016). Methods for and Implementation of Pregnancy Diagnosis in Dairy Cows. *Vet Clin Food Anim* 32:165–180.
28. Garcia CAC, Montiel RLA, Borderas TF. (2014). Grasa y proteína de la leche de vaca: componentes, síntesis y modificación. *Arch. Zootec.* 63(R): 85-105.
29. Grădinaru AC, Creangă S, Solcan G. (2015). Milk – a review on its synthesis, composition, and quality assurance in dairy industry. *HVM Bioflux.* 7(3): 173-177.
30. Grau J, Grosse I, Keilwagen J. (2015). PRROC: computing and visualizing precision-recall and receiver operating characteristic curves in R. *Bioinformatics.* 31(15):2595-2597.

31. Grelet C, Fernández PJA, Dardenne P, Baeten V, Dehareng F. (2015). Standardization of milk mid-infrared spectra from a European dairy network. *J. Dairy Sci.* 98 (4) :2150–2160.
32. Groenendaal H, Galligan DT, Mulder HA. (2004). An Economic spreadsheet model to determine optimal breeding and replacement decisions for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87(7): 2146-2157.
33. Guarneros AR, Rosales AJ, Ávila CJM, González VEA, Cantú CA, González PMA, *et al.* (2012). Manual para incrementar la producción de leche en el trópico seco de México. Folleto técnico N° 25. INIFAP.CIRNE. Villa Cuauhtémoc, Tam.
34. Guetouache M, Guessas B, Medjekal S. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Issues Biol. Sci. Pharm. Res.* Vol. 2(10):115-122.
35. Hernández CJ, (2009). Diagnóstico de gestación en la vaca. En Porras AIA y Páramo RRM (edit), Manual de prácticas de reproducción animal (pp. 48-54). FMVZ-UNAM, México, D.F.
36. Ho PN, Bonfatti V, Luke TDW, Pryce JE. Classifying the fertility of dairy cows using milk mid-infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 102 (11):10460–10470.
37. Karoui R. (2017). Methodologies for the characterization of the quality of dairy products. *Advances in Food and Nutrition Research.* 82:237-275.
38. Lainé A, Bastin C, Grelet C, Hammami H, Colinet FG, Dale LM, *et al.* (2017). Assessing the effect of pregnancy stage on milk composition of dairy cows using mid-infrared spectra. *J. Dairy Sci.* 100 (4):1–14.
39. Lainé A, Bel Mabrouk H, Dale LM, Bastin C, Gengler N. (2013). How to use mid-infrared spectral information from milk recording system to detect the pregnancy status of dairy cows. *Comm. Appl. Biol. Sci.* 79(1): 8-33.
40. Lane EA, Crowe MA, Beltman ME, More SJ. (2013). The influence of cow and management factor on reproductive performance of Irish seasonal calving dairy cows. *Animal Reproduction Science.* 141:34-41.
41. Lever J, Krzywinski M, Altman N. (2016a). Classification evaluation. *Nature Methods.* 13(8): 603-604.

42. Lever J, Krzywinski M, Altman N. (2016b). Model selection and overfitting. *Nature Methods*. 13(9): 703-704.
43. Lindmark MH. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res*. 10: 1-3.
44. Loera J, Banda J. (2017). Industria lechera en México: parámetros de la producción de leche y abasto del mercado interno. *Rev. Investig. Altoandin*. 19(4): 419 – 426.
45. Loker S, Miglior F, Bohmanova J, Jamrozik J, Schaeffer LR. (2009). Phenotypic analysis of pregnancy effect on milk, fat, and protein yields of Canadian Ayrshire, Jersey, Brown Swiss, and Guernsey breeds. *J. Dairy Sci*. 92(3):1300–1312.
46. Mariscal AV, Pacheco CA, Estrella QH, Huerta BM, Rangel SR, Nuñez DR. (2016). Indicadores reproductivos de vacas lecheras en agroempresas con diferente nivel tecnológico en los altos de Jalisco. *ASyD*. 13(3): 493-507.
47. McParland S, Berry DP. (2016). The potential of Fourier transform infrared spectroscopy of milk samples to predict energy intake and efficiency in dairy cows. *J. Dairy Sci*. 99(5):4056–4070.
48. McParland S, Kennedy E, Lewis E, Moore SG, McCarthy B, O'Donovan M, Berry DP. (2015). Genetic parameters of dairy cow energy intake and body energy status predicted using midinfrared spectrometry of milk. *J. Dairy Sci*. 98(2):1310–1320.
49. Mineur A, Köck A, Grelet C, Gengler N, Egger-Danner C, Sölkner J. (2017). First results in the use of milk midinfrared spectra in the detection of lameness in austrian dairy cows. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 8(2): 163-166.
50. Mongragón CP. (2017). Espectroscopia de infrarrojo... y 51 espectros de alimentos consumidos en México. 1ra ed. CIATEJ. Guadalajara, Jalisco.
51. Montaldo HH, Castillo JH, Valencia PM, Cienfuegos REG, Ruiz LFJ. (2010). Genetic and environmental parameters for milk production, udder health, and fertility traits in Mexican Holstein cows. *J. Dairy Sci*. 93 (5):2168–2175.
52. Núñez HG, *et al.* (2009). Producción de leche de Bovino en el sistema intensivo. INIFAP. CIRGOC. Libro Técnico Núm. 23. Veracruz, México.
53. Olori VE, Brotherstone S, Hill WG, McGuirk BJ. (1997). Effect of gestation stage on milk yield and composition in Holstein Friesian dairy cattle. *Livest. Prod. Sci*. 52:167–176.

54. Park YW. (2016). Production and Composition of Milk are affected by Multivariate Factors. *J Adv Dairy Res* 4 (3): e131.
55. Pérez P, De Los Campos G. (2014). Genome-wide regression and prediction with the BGLR statistical package. *Genetics*. 198:483–495.
56. Pinedo PJ, De Vries A. (2010). Effect of days to conception in the previous lactation on the risk of death and live culling around calving. *J. Dairy Sci.* 93(3):968–977.
57. Pohler KG, Franco GA, Reese ST, Dantas FG, Ellis MD, Payton RR. (2016). Past, present and future of pregnancy detection methods. In: *Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle – Des Moines, Iowa*.
58. Purohit G. (2010). Methods of pregnancy diagnosis in domestic animals: the current status. *WebmedCentral REPRODUCTION*. 1(12): 1-28.
59. R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical Computing, Vienna Austria. URL <http://www.R-project.org/>
60. Robledo PR. (2018). Producción de leche en México y su comercio de lácteos con países del APEC. In: Rosales Ortega, Rocío; Mercado Celis, Alejandro; Sánchez Almanza, Adolfo; Amparo Tello, Dagoberto y Venegas Herrera, Carmen. *Teoría, impactos externos y políticas públicas para el desarrollo regional*. CDMX: UNAM y AMECIDER. 282-303.
61. Roche JR. (2003). Effect of pregnancy on milk production and bodyweight from identical twin study. *J. Dairy Sci.* 86(3):777–783.
62. Rojo RR, Vázquez AJF, Pérez HP, Mendoza MGD, Zalem AZM, Albarrán PB, *et al.* (2009). Dual purpose cattle production in México. *Trop Anim Hlth Prod.* 41(5):715-721.
63. Román PH, Ortega RL, Hernández AL, Díaz AE, Espinoza GJA, Núñez HG, *et al.* (2009). Producción de leche de bovino en el sistema doble propósito. INIFAP-CIRGOC. Libro técnico Núm. 22. Veracruz, Méx.
64. Samková E, Špicka J, Pešek M, Pelikánová T, Hanus O. (2012). Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *S. Afr. J. Anim.* 42(2): 83-100.

65. SE. (2012). Análisis del sector lácteo en México. Secretaría de Economía. Dirección General de Industrias Básicas. México. http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf Consultado 12 mayo, 2018.
66. SIAP. (2018a). Boletín de Leche. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Bolet%C3%ADn%20de%20Leche%20octubre-diciembre%202018.pdf> . Consultado el 28 de marzo, 2019.
67. SIAP. (2018b). Panorama de la Leche en México. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/-Panorama%20de%20Leche%20octubre-diciembre%202018.pdf> Consultado el 28 de marzo, 2019.
68. Šimundić AM. (2009). Measures of diagnostic accuracy: Basic definitions. *EJIFCC*. 19(4):203-211.
69. Smith BC. (2011). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. 2nd ed. Taylor and Francis Group. New York, USA.
70. Stuart B. (2004). *Infrared spectroscopy fundamentals and applications*. Hoboken, NJ: J. Wiley. Chichester, West Sussex, England.
71. Sutton JD. (1989). Altering milk composition by feeding. *J. Dairy Sci.* 72:2801-2814.
72. Toledo AH, Vázquez AI, De los campos G, Tempelman RJ, Bittante G, Cecchinato A. (2018a). Diagnosing pregnancy status using infrared spectra and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101(3):2496–2505.
73. Toledo AH, Vázquez AI, De los campos G, Tempelman RJ, Gabai G, Cecchinato A, Bittante, G. (2018b). Changes in milk characteristics and fatty acid profile during the estrous cycle in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101(10):1-19.
74. Tripathi MK. (2014). Effect of nutrition on production, composition, fatty acids and nutraceutical properties of milk. *J. Adv. Dairy Res.* 2(2):1-11.
75. Vanlierde A, Dehareng F, Froidmont E, Dardenne P, Kandel P, Gengler N, *et al.* (2013). Prediction of the individual enteric methane emission of dairy cows from

- milk mid-infrared spectra. In: Proceedings of the 5th Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference Adv. Anim. Biosci. 4(Part. 2):433.
76. Vera AH, Hernández AL, Espinoza GJ, Díaz AE, Román PH, Núñez HG, *et al.* (2009). Producción de leche de bovino en el sistema familiar. INIFAP-CIRGOC. Libro técnico Núm. 24. Veracruz, Méx.
77. Wondossen A, Mohammed A, Negussie E. (2018). Reproductive performance of holstein friesian dairy cows in a tropical highland environment. J. Adv. Dairy Res. 6(2): 1-6.