

EFFECTOS DEL ESTADO ENERGÉTICO Y PROTEICO SOBRE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y PRESENCIA DE CETOSIS SUBCLÍNICA EN VACAS BROWN SWISS POSPARTO

Effects of energy and protein status on reproductive parameters and presence of subclinical ketosis in Brown Swiss cows postpartum

Ide Unchupaico Payano^{1*}, Edith Ancco Gomez², Eduardo Fernández Curi³, Williams Olivera Acuña⁴, Carlos Quispe Eulogio²

¹ Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo, Perú.

² Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana los Andes, Huancayo, Perú.

³ Investigador Privado en nutrición y alimentación animal, Lima, Perú.

⁴ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana los Andes, Huancayo, Perú.

* Corresponding author: Ide Unchupaico Payano, e-mail: iunchupaico@uncp.edu.pe

Recibido: 23/08/2021

Aceptado: 09/10/2021

Publicado: 31/12/2021

ABSTRACT

This study aimed to determine protein and energy metabolites in postpartum Brown Swiss cows and their effect on the presence of subclinical ketosis and reproductive parameters. One hundred cows from four farms in the Mantaro Valley (Junín, Perú) were grouped according to parity (1, 2, 3 and 4). The variables of the metabolic profile (total proteins, blood urea nitrogen [BUN], glucose, β -hydroxybutyrate [B-HB]), milk production and body condition were estimated between 7 to 60 days postpartum in 7-day intervals. Likewise, the calving-first heat interval and the pregnancy rate at first service were recorded. The determination of subclinical ketosis was based on a semi-quantitative analysis by levels of B-HB in milk ($\mu\text{mol/l}$) using a commercial kit. BUN levels ranged between 11.74 and 15.92 mg/dl, being higher in fourth parity cows ($p < 0.05$). The averages of total protein (6.54-7.90 g/dl) were homogeneous between calvings. The glucose values presented an inverse response, being lower in cows of third and fourth parity compared to cows of first and second parity ($p < 0.05$). Similarly, the highest levels of milk production were observed in third parity cows (14.41 ± 5.42 l/d) and fourth parity (15.43 ± 4.36 l/d) with respect to first and second calvers ($p < 0.05$). Body condition was lower in cows with subclinical ketosis. The calving - first heat interval and the pregnancy rate at first service were lower in cows with subclinical ketosis ($p < 0.05$).

Keywords: BUN, body condition, glucose, protein, beta hydroxybutyrate

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo determinar metabolitos proteicos y energéticos en vacas Brown Swiss posparto y su efecto sobre la presencia de cetosis subclínica y parámetros reproductivos. Se evaluaron 100 vacas de cuatro establos del Valle del Mantaro (Junín, Perú), agrupadas de acuerdo con el número de parto (1, 2, 3 y 4). Las variables del perfil metabólico (proteínas totales, nitrógeno ureico sanguíneo [NUS], glucosa, β -hidroxibutirato [B-HB]), producción de leche y condición corporal fueron estimadas entre los 7 a 60 días posparto en intervalos de 7 días. Asimismo, se registró el intervalo parto-primer celo y la tasa de preñez al primer servicio. La determinación de cetosis subclínica se basó en un análisis semicuantitativo mediante niveles de B-HB en leche ($\mu\text{mol/l}$) usando un kit comercial. Los niveles de NUS variaron entre 11.74 y 15.92 mg/dl, siendo más altos en vacas de cuarto parto ($p < 0.05$). Los promedios de proteína total (6.54-7.90 g/dl) fueron homogéneos entre partos. Los valores de glucosa presentaron un comportamiento inverso, siendo menores en vacas de tercer y cuarto parto respecto a vacas de primer y segundo parto ($p < 0.05$). En forma similar, los mayores niveles de producción de leche se observaron en vacas de tercer (14.41 ± 5.42) y cuarto parto (15.43 ± 4.36) con respecto a vacas de primer y segundo parto ($p < 0.05$). La condición corporal fue menor en vacas con cetosis subclínica. El intervalo parto-primer celo y la tasa de preñez al primer servicio fue menor en vacas con cetosis subclínica ($p < 0.05$).

Palabras clave: NUS, condición corporal, glucosa, proteína, betahidroxibutirato.

INTRODUCCIÓN

El 87% de la población de vacunos en el Perú está en manos de productores agropecuarios de los valles interandinos (CENAGRO, 2012). De estos, el 58% posee menos de 5 has que no disponen de soporte técnico ni se encuentran asociados, lo cual determina costos de producción elevados, especialmente en la alimentación (CENAGRO, 2012). Por otro lado, el balance de los nutrientes es de suma importancia para mejorar los niveles de producción de leche. Los nutrientes que más costos repercuten en la alimentación son la proteína y la energía.

La interrelación entre la proteína y energía es compleja, pero el organismo logra mantener un balance metabólico entre todas las funciones (Butler et al., 2006). No obstante, cuando hay un quiebre en esta relación, la vaca entra en un proceso de desbalance metabólico (De Vries y Veerkamp, 2000). La mayor capacidad para producción de leche es durante las primeras semanas de la lactación en vacas genéticamente mejoradas, para esta función hace que las vacas presenten un balance energético negativo (BEN) y esta condición se encuentra asociada a efectos adversos sobre la reproducción (Butler, 2000). En estos casos, ocurre una movilización fisiológica de reservas lipídicas como repuesta metabólica, la cual se caracteriza por un aumento de metabolitos como beta-hidroxibutirato (BHB), ácidos grasos libres, cetonas en plasma sanguíneo y una disminución de glucosa circulante, de estos, BHB es un indicador directo del balance energético negativo (Benedet et al., 2019). Las vacas de razas lecheras en lactación casi siempre evidencian un balance energético negativo después del parto debido a que a pesar de que incrementan su consumo no logran cubrir sus necesidades de producción; y si esto no es corregido mediante una estrategia adecuada de alimentación energética, el problema puede evidenciarse a lo largo de la lactación, ocasionando problemas no solo derivados de un mal manejo nutricional sino de orden sanitario y reproductivo (Nydham et al., 2009).

El BEN retrasa el momento de la primera ovulación debido a la inhibición de la frecuencia del pulso de LH, asociado a niveles bajos de glucosa en sangre, insulina y factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) y que, colectivamente, restringen la producción de estrógeno por los folículos dominantes. Además, el BEN reduce las concentraciones séricas de progesterona y la fertilidad (Butler, 2000).

Por otro lado, dietas ricas en proteína cruda contribuyen a una alta producción de leche, pero también se asocian con un menor rendimiento reproductivo. Una elevada concentración de proteína en la dieta puede resultar en concentraciones elevadas de urea en plasma que afectan el ambiente uterino y la fertilidad. En consecuencia, factores que se relacionan con la presencia de BEN y alta proteína en la dieta dan como resultado una baja fertilidad en vacas lecheras en el posparto (McNamara et al., 2008). Este escenario no está siendo evaluado ni reportado bajo las condiciones de la sierra peruana y tampoco hay evidencia de BEN estimada a partir del BHB en vacas de la raza Brown Swiss. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue determinar la presencia de cetosis subclínica y el efecto del estatus energético-proteico sobre algunos parámetros reproductivos asociados a un balance energético negativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio y Animales

Se evaluaron 100 vacas Brown Swiss de cuatro establos representativos del Valle del Mantaro, Junín, Perú. Estos establos se encuentran dentro de una microcuenca lechera y con un sistema común de manejo y alimentación. De estas, 40 vacas se encontraban un establo del distrito de El Mantaro, 30 en un establo en la provincia de Concepción, 20 en un establo en el distrito de Matahuasi y 10 en un establo del distrito de San Lorenzo. Todos los establecimientos ganaderos se encontraban en un rango de altitud entre 3280 y 3360 msnm. El sistema de manejo es de tipo semi-estabulado, cuyo patrón alimenticio está basado en pastoreo en una asociación gramínea – leguminosa (18% de proteína cruda) y suplementación con alimento balanceado. El suministro de alimento balanceado fue a razón de 2 kg/vaca/día. Las vacas fueron alimentadas en horas de la mañana (5:00 am) con alimento balanceado durante el ordeño y sometidas a pastoreo durante el día (de 8:00 a 17:00 horas).

Diseño Experimental

Las vacas fueron distribuidas en cuatro grupos de acuerdo con el número de partos (1, 2, 3 y 4). La toma de muestras se realizó entre los meses de febrero y abril, considerada como época de lluvias. Las variables del perfil metabólico (proteínas totales, nitrógeno ureico sanguíneo, glucosa, beta-hidroxibutirato), producción de leche y la condición corporal fueron estimadas entre los 7 y 60 días posparto en intervalos de 7 días, haciendo un total de 8 muestreos individuales por cada vaca, mientras que, las variables reproductivas fueron el periodo entre el parto al primer celo observable medido en días y la tasa de preñez a la primera inseminación. La detección de celo fue visual y la inseminación fue realizada por un solo profesional en orden de evitar que este factor tenga algún efecto sobre las variables estudiadas.

Evaluación de Variables

Se colectaron 100 muestras de sangre (3-5 ml) en tubos vacutainer con anticoagulante (ácido etilendiaminatetraacético) de los animales en ayuno. Las muestras fueron colectadas a las 06:00 h, guardadas en cajas de poliesterino expandido para asegurar su preservación y como protector de rayos UV para su traslado al laboratorio en el menor tiempo posible.

Las muestras fueron centrifugadas a 1077 G durante 15 minutos y el plasma fue colocado en crioviales y congelados a -20 °C hasta su análisis. La determinación de metabolitos proteicos (proteína total y nitrógeno ureico sanguíneo – mg/dl) y metabolitos energéticos (glucosa – mg/dl) fue realizada mediante espectrofotometría en base a kits comerciales (Valtek® - Chile). Se utilizó un espectrofotómetro con espectro UV visible (Toption UV-5100B UV/VIS – China).

La determinación de proteína total está basada la reacción de Biuret. Con respecto a la urea presente en la muestra, el fundamento indica que este metabolito es desdoblado a amonio por acción de la enzima ureasa. La glucosa por su parte fue determinada mediante una reacción con el reactivo enzimático que contiene una mezcla de las enzimas Glucosa Oxidasa (GOD) y Peroxidasa (POD).

Las muestras de leche fueron tomadas en ayuno antes del suministro del alimento balanceado. La determinación de beta-hidroxibutirato (B-HB) en leche ($\mu\text{mol/l}$) fue realizada mediante el kit PortaBHB Milk Ketone Test (USA) (Figura 1), método semicuantitativo que utiliza tiras reactivas en leche. La almohadilla reactiva de la tira reactiva contiene una enzima que convierte BHB a partir del acetoacetato, generando un compuesto de color púrpura. A más oscuro sea el color, mayor será la concentración de BHB. La interpretación de la prueba se basa en los siguientes rangos: 0-99 $\mu\text{mol/l}$ es normal (-); de 100-199 $\mu\text{mol/l}$ es cuestionable (+/-); de 200-499 $\mu\text{mol/l}$ es positivo (+); >500 $\mu\text{mol/l}$ es positivo (++) . Para establecer el diagnóstico de cetosis subclínica para el presente estudio se consideraron vacas con valores mayores a 200 $\mu\text{mol/l}$.

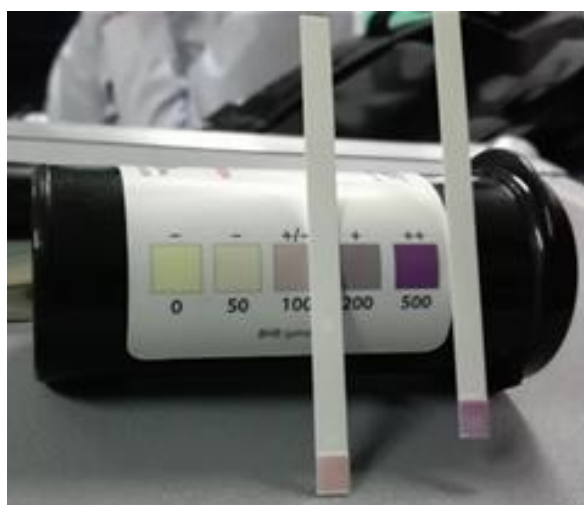


Figura 1. Kit PortaBHB® Milk Ketone Test (USA) para determinación de β -hidroxibutirato (B-HB) en leche

El intervalo entre el parto y el primer celo fue medido en días, el celo fue evaluado por observación directa. La preñez fue considerada como el no retorno al celo después de la inseminación y mediante ultrasonografía transrectal a los 28 días de la inseminación basada en la observación de la vesícula embrionaria. Se utilizó un ecógrafo (Esaote-Pie Medical, Países Bajos) con transductor lineal a una frecuencia de 7.0 MHz. Además, se estimó la condición corporal en una escala de 1 a 5. El control lechero se hizo el día previo a la toma de la muestra de sangre.

Análisis Estadístico

Se realizó estadística descriptiva. Se hizo un análisis de varianza para variables cuantitativas continuas mediante un diseño de bloques completamente al azar donde los tratamientos fueron los partos y los bloques cada establo. La prueba de comparación de medias utilizada fue Duncan. Para variables discretas se usó una prueba de contingencia. Se usaron los programas estadísticos SAS 9.0 y SPSS V25. El nivel de significancia fue del 95%.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los promedios de las variables evaluadas en las vacas Brown Swiss según el número de partos. Los promedios de nitrógeno ureico sanguíneo (NUS) variaron entre 11.74 y 15.92 mg/dl en promedio entre partos, denotando un incremento de concentraciones a partir del primer parto, mientras que los promedios de proteína total (6.54-7.90 g/dl) fueron más homogéneos entre partos que los valores de NUS. Los valores de glucosa presentaron un comportamiento inverso, siendo menores en vacas de tercer y cuarto parto respecto a vacas de primer y segundo parto ($p < 0.05$). En forma similar, los mayores niveles de producción de leche se observaron en vacas de tercer (14.41 \pm 5.42) y cuarto parto (15.43 \pm 4.36) con respecto a vacas de primer y segundo parto ($p < 0.05$).

Tabla 1. Parámetros metabólicos y producción de leche en vacas Brown Swiss en lactación por número de partos en condiciones de sierra.

	1° parto	2° parto	3° parto	4° parto
Vacas (n)	26	20	23	31
Nitrógeno ureico sanguíneo (mg/dl)	11.74 \pm 2.49 ^a	12.74 \pm 3.0 ^{bc}	13.98 \pm 3.0 ^b	15.92 \pm 2.97 ^a
Proteína total (g/dl)	7.90 \pm 1.21 ^a	7.64 \pm 1.31 ^a	6.54 \pm 1.11 ^b	7.59 \pm 1.53 ^a
Glucosa (mg/dl)	59.99 \pm 4.29 ^a	57.17 \pm 4.26 ^a	51.81 \pm 3.05 ^b	48.59 \pm 2.35 ^b
Condición corporal (CC)	3.21 \pm 0.13 ^a	2.94 \pm 0.59 ^a	2.81 \pm 0.66 ^{ab}	2.78 \pm 0.21 ^b
Producción de leche (l)	10.41 \pm 2.71 ^b	11.66 \pm 2.25 ^b	14.41 \pm 5.42 ^a	15.43 \pm 4.36 ^a

a,b Letras diferentes dentro de filas indican diferencias entre partos ($p < 0.05$)

Tabla 2. Frecuencia de vacas primíparas y múltiparas Brown Swiss en lactación con cetosis subclínica de acuerdo con los valores de β -hidroxibutirato en leche

Partos	β -hidroxi-butirato ($\mu\text{mol/l}$)	Vacas con cetosis subclínica (%)
1 (n=34)	>200	16 ^b
>1 (n=66)	>200	62 ^a

ab Letras diferentes dentro de columna indican diferencias ($p < 0.05$)

El 62% de las vacas múltiparas presentaron cetosis subclínica basada en la determinación de beta-hidroxibutirato (>200 $\mu\text{mol/l}$), mientras que solo 16% de las vacas primíparas presentaron esta disfunción fisiológica (Tabla 2; $p < 0.05$).

El intervalo entre el parto a la presentación del primer celo fue afectado por las concentraciones de beta-hidroxibutirato ($p < 0.05$) para ambos grupos (primíparas y múltiparas) (Tabla 3). La tasa de preñez al primer servicio se vio afectada en el caso de vacas múltiparas con valores mayores a 200 $\mu\text{mol/l}$ de β -hidroxibutirato en leche ($p < 0.05$; Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de las concentraciones de β -hidroxibutirato (B-HB) en leche ($\mu\text{mol/l}$) sobre parámetros reproductivos en vacas Brown Swiss en lactación en la sierra peruana.

Variables	Primíparas (n=26)		Múltiparas (n=56)	
	0-200	>200	0-200	>200
Intervalo parto – 1° celo (días)	92.6 \pm 21.1 ^b	102.3 \pm 34.6 ^a	87.6 \pm 31.1 ^b	97.3 \pm 25.1 ^a
Preñez al primer servicio (%)	87 ^A	73 ^A	69 ^A	56 ^B

ab Letras diferentes dentro de filas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). A,B Letras diferentes dentro de filas indican diferencias dentro de vacas primíparas y múltiparas ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

El 17% de las vacas, independientemente del número de partos, estuvieron por encima del nivel crítico de referencia de 20 mg/dl de NUS para vacas lecheras. Concentraciones cercanas y por encima de este nivel crítico son propias de vacas que presentan alteraciones metabólicas y productivas (Hammond, 1997; Butler, 1998). De manera similar, se encontró animales que están por debajo y por encima del rango referencial de proteína total propuesto para vacas (6.74-7.46 g/dl; NRC, 2001). La glucosa presentó rangos de 32.05 a 59.57 mg/dl, donde un 13% de vacas estuvieron por debajo del rango referencial establecida (40-80 mg/dl) (NRC, 2001) y fueron vacas múltiparas de tercer y cuarto parto.

Fisiológicamente cuando hay balance energético negativo hay una oxidación de las reservas de grasa corporal, lo cual permite que el ciclo de Krebs sea incompleto, conduciendo a una elevación de cuerpos cetónicos como el BHB (Duplessis et al., 2018), condición que se denomina cetosis. La cetosis subclínica es una enfermedad metabólica común que afecta a más del 40% del ganado lechero en las primeras etapas de la lactancia (McArt et al., 2012; Gordon et al., 2013), habiendo encontrado en el presente estudio 62% de vacas múltiparas y 16% de primíparas con cetosis subclínica, probablemente debido a un inadecuado manejo alimenticio en la etapa de periparto. Por otro lado, es importante señalar que a pesar de haberse medido con muestras de leche de vacas en ayuno, diversos estudios demuestran que hay una variación en las concentraciones de BHB y de otros metabolitos con relación al periodo posparto ((Christensen et al., 1997; Eicher et al., 1999). Vacas con niveles elevados de cuerpos cetónicos en sangre tienen un mayor riesgo de desarrollar desplazamiento del abomaso, metritis, menor producción de leche y baja fertilidad (Duffield et al., 2009; McArt et al., 2012). En el presente caso, vacas con valores mayores a 200 $\mu\text{mol/l}$ de BHB presentaron mayores intervalos parto-1° celo y menor tasa de preñez al primer servicio. Asimismo, la producción de leche también se vio afectada, especialmente en vacas múltiparas, debido al descenso de glucosa circulante (Herd, 2000).

La alta producción de leche en las vacas depende de altos niveles de energía y proteína en la dieta; sin embargo, esto causa efectos detrimentales en el comportamiento reproductivo (Butler, 1998; Westwood et al., 1998). La gravedad del BEN se relaciona principalmente con ingesta de materia seca que, a su vez, está relacionada con la condición corporal al momento del parto, además un BEN durante las primeras 3-4 semanas posparto están altamente correlacionadas con los

días hasta la primera ovulación, se asocia positivamente con la tasa de concepción más tardía durante el periodo de reproducción, la duración del intervalo posparto hasta la primera ovulación representa una interacción importante del estado energético en el desempeño reproductivo. Dependiendo de la cantidad y composición de proteínas, las concentraciones séricas de la progesterona pueden disminuir, el ambiente uterino se altera y la fertilidad disminuye (Butler, 1998). Los resultados del estudio evidencian altos niveles de NUS en las vacas, lo que permite suponer que los ganaderos en el Valle del Mantaro están suministrando dietas ricas en proteína.

Los resultados del estudio evidencian que el factor relacionado a la falta de asesoramiento para poder equilibrar la dieta en las vacas lecheras en las diferentes etapas de producción permiten la presencia de cetosis subclínica en vacas lecheras aun siendo primerizas y que además afectan algunos parámetros reproductivos que probablemente ocasionan pérdidas económicas en los ganaderos.

CONCLUSIONES

- Los metabolitos proteicos y energéticos medidos evidencian presencia de cetosis subclínica y consecuente balance energético negativo en una elevada proporción de vacas posparto del Valle del Mantaro (Junín, Perú).
- Se encontró un elevado número de vacas con alto nitrógeno ureico sanguíneo que, en conjunto con el beta-hidroxibutirato, pueden estar afectando la tasa de preñez y retardando la presentación de celo, especialmente en vacas múltiparas.

Código de ética

Los autores declaramos que el estudio fue llevado a cabo respetando el Código de ética para estudios experimentales con animales de acuerdo con la normativa presente: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm

Contribución de autores

IUP Adquisición de fondos, Supervisión; EAG Análisis de datos, Escritura del borrador original; EFC Adquisición e interpretación de datos; WOA Metodología; CQE Análisis de datos, Escritura del borrador original, Revisión y edición. Todos los autores han participado en la revisión y aprobación de la versión final del documento.

Conflicto de Intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses

REFERENCES

- Benedet A, Manuelian C, Zidi A, Penasa M, De Marchi M. Invited review: β -hydroxybutyrate concentration in blood and milk and its associations with cow performance. *Animal*, 2019;13(8), 1676-1689. <https://doi.org/10.1017/S175173111900034X>
- Butler ST, Pelton SH, Butler WR. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J Dairy Sci*; 2006;89(8):2938-51. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72566-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72566-8).
- Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Review. Anim Reprod Sci*. 2000;2;60-61:449-57. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00076-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00076-2)
- Butler WR. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci*. 1998;81, 2533-2539. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)70146-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)70146-8)
- [CENAGRO] IV Censo Nacional Agropecuario. Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012. Lima Perú – [Internet]. Disponible en: <https://www.agrorural.gob.pe/dmdocuments/resultados.pdf>
- Christensen JO, Grummer RR, Rasmussen FE, Bertics SJ. Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. *J. Dairy Sci*, 1997;80(3):563-568. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)75971-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)75971-X)
- de Vries MJ, Veerkamp RF. Energy Balance of Dairy Cattle in Relation to Milk Production Variables and Fertility. *J Dairy Sci*. 2000;83(1):62-69. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74856-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74856-9)
- Duffield TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci*, 2009;92 (2):571-580. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1507>
- Duplessis M, Cue RI, Santschi DE, Lefebvre DM, Girard CL. Short communication: Relationships among plasma and milk vitamin B12, plasma free fatty acids, and blood β -hydroxybutyrate concentrations in early lactation dairy cows, *J. Dairy Sci*. 2018;01(9):8559-8565. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14477>
- Eicher R, Liesegang A, Bouchard E, Tremblay A. Effect of cow-specific factors and feeding frequency of concentrate on diurnal variations of blood metabolites in dairy cows. *Am. J. Vet. 1999; Res.*, 60 (12):1493-1499. [Internet]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10622157/>
- Gordon JL, LeBlanc SJ, Duffield TF. Ketosis treatment on lactating dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2013;29(2):433-445. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.001>
- Hammond AC. Update on BUN and MUN as a guide for protein supplementation in cattle. In: *Proc. Florida Rum. Nutr. Symp.*, 1997. Gainesville, Florida - USA. [Internet]. Disponible en: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.518.4801&rep=rep1&type=pdf>
- Herdt, TH. Ruminant adaptation to negative energy balance: influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2000;16(2):215-230. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30102-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30102-X)
- McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR. A field trial on the effect of propylene glycol on displaced abomasum, removal from herd, and reproduction in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. *J. Dairy Sci*, 2012;95(5):2505-2512. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4908>
- McNamara S, Murphy JJ, O'Mara FP, Rath M, Mee JF. Effect of milking frequency in early lactation on energy metabolism, milk production and reproductive performance of dairy cows. *Livestock Science*. 2008;117(1):70-78. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.11.013>
- Nydam DV, Ospina PA, Stokol T, Overton TR. Evaluation of the effect of non-esterified fatty acids (NEFA) and β -hydroxybutyrate (BHB) concentrations on health, reproduction and production in transition dairy cattle from the Northeast USA. *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference For Feed Manufacturers*. 2009. 71st Meeting. East Syracuse, New York – USA. [Internet]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Glen_Broderick/publication/43290986_Ammonia_emissions_from_dairy_barns_What_have_we_learned/links/0912f51125256bca50000000/Ammonia-emissions-from-dairy-barns-What-have-we-learned.pdf#page=102
- [NRC] National Research Council. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academy Press. 2001. Washington, D.C. 381 p.
- Westwood CT, Lean IJ, Kellaway RC. Indications and implications for testing of milk urea in dairy cattle: a quantitative review Part 2. Effect of dietary protein on reproductive performance. *N. Z. Vet. J.* 1998;46, 123-140. <https://doi.org/10.1080/00480169.1998.36076>