

# VARIACIONES DIARIAS DE METABOLITOS SANGUÍNEOS Y SU RELACIÓN CON EL COMPORTAMIENTO ALIMENTICIO EN VACAS LECHERAS A PASTOREO PRIMAVERAL

## Diurnal Variations in Blood Metabolites Concentration and its Relationship With Feeding Behavior in Lactating Dairy Cows Grazing Permanent Pasture in Spring

Mirela Noro <sup>1\*</sup>, José Borkert <sup>4</sup>, Gerardo Andrés Hinojosa <sup>4</sup>, Rubén Pulido <sup>2</sup> y Fernando Wittwer <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile (UACH). Casilla 567, Valdivia, Chile.

\*E-mail: mirelanoro@gmail.com <sup>2</sup>Instituto de Ciencia Animal, UACH. <sup>3</sup>Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, UACH. <sup>4</sup>Práctica privada, Chile.

### RESUMEN

Las concentraciones sanguíneas de los metabolitos oscilan siguiendo un ritmo circadiano, asociado a la ingesta de alimento. El conocimiento de estas oscilaciones es necesario para establecer el mejor horario para los muestreos sanguíneos para realización de perfiles metabólicos en sistema de pastoreo. El objetivo del experimento fue determinar las oscilaciones diarias en las concentraciones sanguíneas de metabolitos asociadas al comportamiento alimenticio en vacas lecheras a pastoreo y suplementadas con concentrado. Se utilizaron ocho vacas Frisonas, que pastoreaban un pasto permanente en primavera durante 60 días. Cuatro vacas (GP-C), fueron suplementadas con 3 kg de concentrado durante los ordeños y otras cuatro no recibieron suplementación (GP). El comportamiento alimenticio se observó durante los días 56 y 57 del ensayo y el día 58 se obtuvieron las muestras de sangre cada 4 horas, durante 24 horas, en las que se determinó las concentraciones plasmáticas de metabolitos proteicos, energéticos y minerales. Las vacas ocuparon un 30,4% del día pastoreando, mayormente durante el período diurno y un 31,7% para la rumia, mayormente durante la noche. Las concentraciones sanguíneas de todos los metabolitos se mantuvieron constantes durante el día en GP-C, mientras que en GP las concentraciones de urea,  $\beta$ OH-butyrate y triglicéridos se incrementaron y de fósforo disminuyeron. Se concluye que en vacas lecheras sólo a pastoreo, las concentraciones sanguíneas de  $\beta$ OH-butyrate, urea, triglicéridos y fósforo varían durante el día y que la suplementación con concentrado disminuye estas variaciones.

**Palabras clave:** Metabolitos sanguíneos, vacas, variaciones diarias.

### ABSTRACT

Blood metabolites concentrations present diurnal variations related to food intake. An experiment was carried out to evaluate diurnal variations in the blood metabolites concentration related to feeding behavior in grazing lactating cows. Eight Friesian cows, 60 to 90 days of lactation, were kept grazing, during 60 days, on a spring paddock mostly of rye grass and allotted in two groups. Group, GP-C, (n=4) was supplemented with 3 kg of concentrate and group GP, (n=4) was not supplemented. Grazing behavior was observed every 10 minutes during days 56 and 57. Blood samples were obtained on the day 58 every 4 hours to measure plasma concentrations of urea, albumin,  $\beta$ OH-butyrate, cholesterol, triglycerides, glucose, Ca, Pi and Mg. Cows spent 30.4% of the day grazing, mostly during the day, and 31.7% of the day ruminating, mostly during night. Concentration of all the metabolites remained unchanged in the GP-C, however, in GP the plasma concentration of urea,  $\beta$ OH-butyrate and triglycerides increased and phosphate decreased during a day. Thus, in dairy cows fed only on pasture, blood concentrations of most of the metabolites determined in the metabolic profiles remained unchanged during the day, excepting urea,  $\beta$ OH-butyrate, triglycerides and Pi, and supplementation with concentrate decreases those variations.

**Key words:** Blood metabolites, cows, daily fluctuations.

### INTRODUCCIÓN

Las concentraciones de los metabolitos sanguíneos oscilan durante el día siguiendo un ritmo circadiano, especialmente en los rumiantes, debido a su comportamiento alimenticio [13]. Los forrajes producidos en otoño y especialmente en la primavera contienen un elevado contenido de proteína cru-

da (PC) y un bajo contenido de materia seca (MS), siendo rápidamente y extensivamente degradadas en el rumen [24]. La fermentación ruminal depende de la calidad y cantidad del forraje ingerido y de los tiempos de pastoreo y de rumia por los animales [1, 5, 6]. El contenido de carbohidratos no estructurales y de proteínas solubles de los forrajes fluctúan durante las horas del día [3], al igual que la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) y de amonio ruminal [5, 19, 29]. La frecuencia y el tiempo de ordeño afectan el comportamiento ingestivo de los animales [18], influenciando en el metabolismo ruminal. Por lo anterior, es esperable encontrar oscilaciones en las concentraciones sanguíneas de metabolitos durante el transcurso del día y consecuentemente, la hora de muestreo de sangre de los animales sería un factor a tomar en cuenta al momento de interpretar los perfiles sanguíneos [16], práctica ampliamente utilizada al sur de Chile para el diagnóstico de trastornos metabólicos [9]. Variaciones diurnas de hormonas y de metabolitos sanguíneos del metabolismo de energía y proteína han sido descritos en bovinos (*Bos taurus*) estabulados [28, 30]. Sin embargo, son escasos los estudios realizados en animales a pastoreo, con condiciones similares a las del sur de Chile, y además, donde se considere las variaciones experimentadas durante las 24 horas del día. El objetivo del presente experimento fue determinar en vacas a pastoreo, en periodo de primavera y suplementadas con concentrado, las variaciones diarias en las concentraciones plasmáticas de metabolitos proteicos, energéticos y minerales y relacionarlas con el comportamiento alimenticio, con la finalidad de estimar el mejor horario para el muestreo sanguíneo en sistemas de pastoreo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del ensayo.** El estudio se realizó en la estación experimental Vista Alegre de la Universidad Austral de Chile, X Región, Chile, (39°48' LS y 73°13' LO), a una altura de 12 m.s.n.m, clima templado húmedo con influencia mediterránea, con una temperatura media anual de 12 °C, una precipitación de 1.871 mm anual [8]. En el mes de noviembre, período en el cual se desarrolló la experiencia, la precipitación media fue de 108 mm y 14 horas diarias de luz [8].

**Animales.** Se utilizaron 8 vacas de raza Frisón negro con una producción de leche de  $31 \pm 4$  L/día, con  $84 \pm 14$  días posparto,  $563 \pm 41$  kg de peso vivo y una condición corporal entre 2 y 3 (escala de 1-5) [12], seleccionadas por comportamiento y docilidad y adaptadas a la sujeción mediante bozal. Los animales fueron individualizados por medio de un arete de registro y un número pintado en sus flancos y cateterizadas (Certofix Mono, Braun 1,4 x 2,1 mm/14G, Alemania) en la vena yugular derecha.

**Grupos.** Las vacas fueron asignadas homogéneamente en dos grupos de 4 animales, con base en la producción de leche, días posparto, peso vivo y condición corporal. Un grupo se mantuvo a pastoreo sin suplementación con concentrado (Gru-

po pastoreo, GP). El otro grupo, dispuso de pasto más 6 kg de concentrado/día, entregado en dos raciones de 3 kg cada una (GP-C), junto al ordeño de la mañana y de la tarde. Los animales estaban adaptados a la dieta, desde un mes previo al experimento. Los grupos fueron identificados con bozal individual de diferentes colores.

Los dos grupos de vacas fueron manejados independientemente pastoreando en una franja de pasto. El tamaño de las franjas fue regulado por medio de un cerco eléctrico móvil, a modo de entregar un oferta de 35 kg de MS vaca/día para permitir un consumo *ad libitum* [15, 24].

Durante el periodo experimental correspondiente a la primera semana del mes de septiembre, las vacas pastorearon en un potrero, a aproximadamente 400 metros de distancia de la sala de ordeño. El pasto permanente mejorado estaba constituido mayormente de ballica (*Lolium* spp.) con uniformidad en cuanto a composición botánica, edad y manejo, y con una composición nutricional al día del muestreo de 12% MS; 25% PC y 56 g/kg MS de carbohidratos solubles. El concentrado utilizado fue en base a pulpa de remolacha (*Beta vulgaris*) con 88,9% MS; 11,1% PC; 37,9% fibra detergente neutro; 16% extracto etéreo; 6,9% cenizas totales y 3,1 Mcal/kg MS de energía metabolizable. El agua fue ofrecida *ad libitum* en los potreros y sala de espera de ordeño y las sales minerales en el patio de la sala de espera del ordeño. Las vacas fueron ordeñadas diariamente entre las 08:00 y 08:30 y entre las 17:00 y 17:30 horas.

## Muestreos y determinaciones

**Comportamiento alimenticio.** Fue determinado mediante la estimación visual a cada vaca por 24 horas continuas, con registros cada 10 minutos, totalizando dos días de observaciones realizadas por 3 personas. Se registró en una pauta el tiempo de pastoreo (aprehensión, manipulación del alimento, masticación y deglución), de rumia (regurgitación, remasticación y redeglución del bolo alimentario), así como de descanso (incluyendo ingesta de líquidos) a 2 días previos al muestreo sanguíneo. Se consideró desde las 09:00 horas hasta las 21:59 horas como periodo diurno y desde las 22:00 hasta las 08:59 horas como nocturno.

**Análisis sanguíneo.** Para la obtención de muestras de sangre, los animales fueron muestreados en el potrero, cada 4 horas durante 24 horas (09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00, 05:00 horas) a través del catéter fijado en la vena yugular. Se extrajeron 7 mL de sangre, de los cuales 3 mL fueron adicionados a un tubo con fluoruro de sodio (NaF) para la determinación de la glucemia y 4 mL fueron adicionados a un tubo con heparina sódica para la determinación de las concentraciones plasmáticas de  $\beta$ OH-butirato, triglicéridos, colesterol, urea, albúmina, fosfato inorgánico (Pi), calcio (Ca) y magnesio (Mg). Posteriormente, las muestras de sangre fueron centrifugadas por 10 minutos a 5.600 g (Centra CL3E, Thermo IEC, EUA). Se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa (GOD-PAP, Roche® n° 1448668), urea (GD UV cinéti-

co, Human® n° 10521), albúmina (verde de bromo cresol, Human® n°10560), colesterol (CHOD-PAP, Human n° 10019), triglicéridos (GPO-PAP, Roche n° 2016648), Pi (heptamolibdato de amonio, Human®, n° 10027) en un autonalizador espectrofotómetro Cobas Mira Plus® de Roche (Alemania). La concentración de  $\beta$ OH-butirato (FAO-AIEA, 1993) en un fotolorímetro Hitachi 4020 (Japón), y las de calcio (Ca) y magnesio (Mg) en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 2380® (EUA).

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos fueron analizados empleando estadística descriptiva ( $\bar{X} \pm EE$ ). Se estableció la normalidad de la distribución de los datos de cada variable por la prueba de Kolmogorov-Smirnov [21] y homocedasticidad mediante la prueba de Bartlett [21]. Se compararon las variables paramétricas y homocedásticas mediante ANDEVA para medidas repetidas ( $y_{ij} = \mu + C_i + CT_{ij} + \varepsilon_{ij}$ ; donde  $y_{ij}$ = variable dependiente,  $\mu$ = media general,  $C_i$ = efecto concentrado,  $CT_{ij}$ : efecto interacción hora día y concentrado o pastoreo;  $\varepsilon_{ijk}$ : error experimental); los datos no paramétricos o heterocedásticos fueron comparados mediante Mann-Whitney [21]. Se estableció un análisis de correlación de Pearson entre las variables sanguíneas y el comportamiento de pastoreo y rumia a cada 4 horas previas al muestreo de sangre respectivo, empleando el programa estadístico Statistix 8.0 (NH Analytical Software, Roseville, MN; EUA) con un nivel de significación del 95% ( $P < 0,05$ ) [21].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

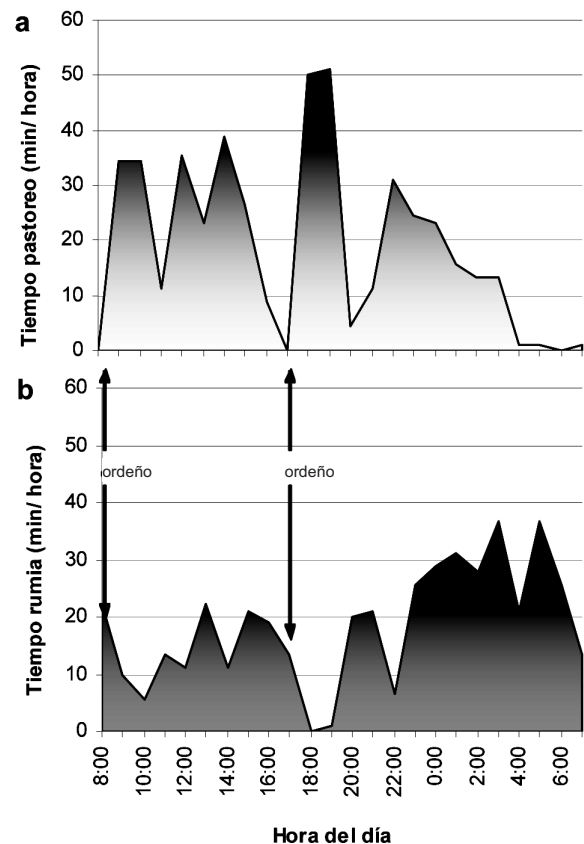
### Comportamiento alimenticio

Los animales ocuparon un 62,5% de su tiempo pastoreando y rumiando, utilizando el tiempo restante para descansar, beber agua, interrelacionar con otros animales y manifestar celo. El tiempo total de pastoreo fue similar entre los grupos ( $P > 0,05$ ), siendo de  $7,3 \pm 0,7$  horas/día, lo que representa 30,4% de las horas del día, similar a las 7,6 horas observadas en vacas mantenidas en condiciones y producción similar al del presente estudio (FIG. 1) [23]. El tiempo de pastoreo diurno (5,1 horas/día) correspondió al 69% del tiempo total de pastoreo, superior al nocturno de 2,3 horas/día ( $P > 0,05$ ). Estos resultados mantuvieron la tendencia, pero con diferencias menos marcadas, que los presentados en otro estudio, donde se observó que un 85% correspondió al pastoreo diurno [2]. Se observaron cuatro periodos de pastoreo, uno inmediatamente post ordeño, seguido por otro de larga duración previo al ordeño de la tarde. Después al ordeño de la tarde hasta al anochecer, se observó el periodo más intenso de pastoreo. El cuarto ocurrió al comienzo de la noche, entre las 20:00 y 03:00 horas, subsecuente a ello hubo una escasa o nula actividad de ingesta. La mayor intensidad de pastoreo post-ordeños ha sido descrita en estudios en similares condiciones, especialmente tras el ordeño de la tarde [4]. Sin embargo, el tiempo dedicado a la ingesta es dependiente de la disponibilidad de forraje, del consumo de materia seca y de las características de los animales [15].

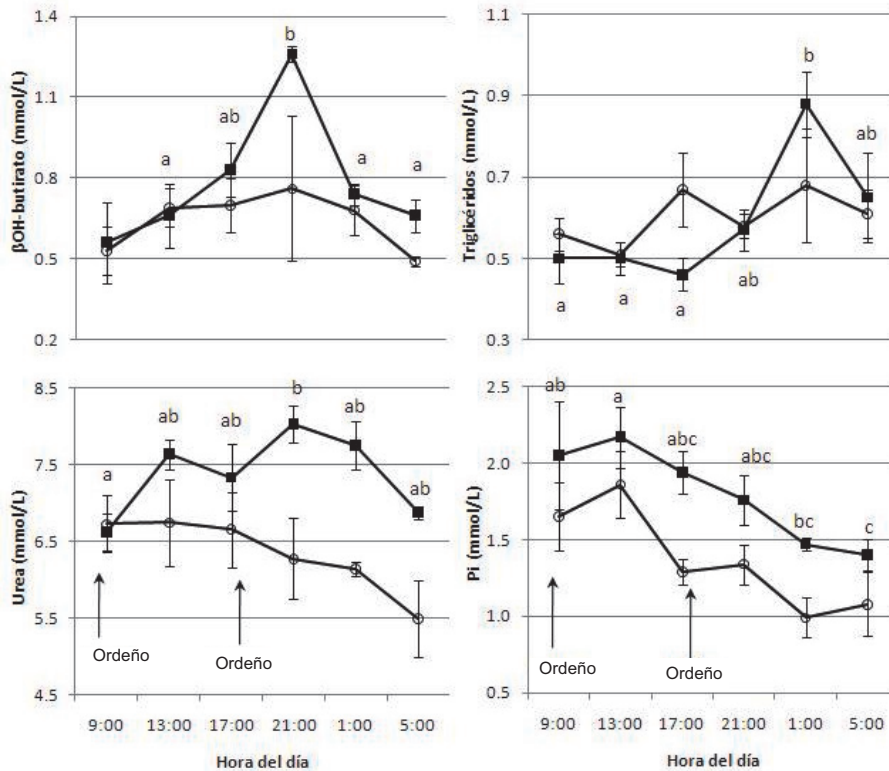
El tiempo total de rumia ( $7,6 \pm 1,2$  horas/día) representó un 31,7% del día, así como los tiempos de rumia diurno y nocturno fueron similares en los grupos GP y GP-C ( $P > 0,05$ ), a su vez mayor (66%), durante el período nocturno (5,0 horas/día), que durante el período diurno (2,6 horas/día,  $P < 0,05$ ), concentrándose mayormente esta actividad entre las 23:00 y 05:00 horas (FIG. 1b). Similar a los reportados en vacas en pastoreo y suplementadas con concentrado [25] o con heno [22].

### Fluctuaciones diurnas de los metabolitos sanguíneos

Las concentraciones plasmáticas de todos los metabolitos medidos permanecieron sin cambios significativos durante el transcurso de las 24 horas del día (FIG. 2;  $P > 0,05$ ) en las vacas suplementadas con concentrado, grupo GP-C, mientras que las concentraciones plasmáticas de urea,  $\beta$ OH-butirato, triglicéridos y Pi, variaron durante el transcurso del día en el grupo sin concentrado ( $P < 0,05$ ; FIG. 2).



**FIGURA 1. CICLO DIARIO DE PASTOREO (A) Y DE RUMIA (B) EN VACAS LECHERAS EN LACTANCIA (N= 8) PASTOREANDO POTRERO DE BALLICA (*Lolium Perenne*) DURANTE LA PRIMAVERA.**



**FIGURA 2. VARIACIÓN DIARIA EN LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS ( $X \pm EE$ ) DE  $\beta$ OH-BUTIRATO, UREA Y FÓSFORO (PI) TRIGLICÉRIDOS EN VACAS LECHERAS A PASTOREO NO SUPLEMENTADAS (■) Y SUPLEMENTADAS CON CONCENTRADO (○). Letras distintas señalan diferencias entre muestreos en el grupo GP,  $P < 0,05$ . \*Diferencias entre grupos en un mismo muestreo,  $P < 0,05$ .**

El grupo GP incrementó sus concentraciones de  $\beta$ OH-butyrate y de urea a las 21:00 horas ( $P < 0,05$ ; FIG. 2), 2-3 horas posterior al pico en el consumo de forraje (entre las 18:00 y 19:00 horas). Esta mayor concentración de urea se asociaría al intenso consumo, posterior al ordeño de la tarde, en pastos con alto contenido de proteínas degradables en el rumen (FIG. 1a). Las concentraciones plasmáticas de glucosa y  $\beta$ OH-butyrate presentaron una relación inversa durante el transcurrir del día [30], con concentraciones plasmáticas de glucosa inferiores en las primeras cuatro horas posteriores a la ingesta del alimento, y un siguiente incremento. A su vez, las concentraciones de  $\beta$ OH-butyrate y de urea se comportaron de un modo inverso, aumentando posterior a la ingesta de alimentos [17, 26]. Al respecto se describe que la ingestión de ensilaje cetogénico genera hiperinsulinemia transitoria, leve cetonemia que a su vez, disminuyen la glucemia [7]. En el presente experimento las concentraciones promedio de  $\beta$ OH-butyrate a las 21:00 horas en las vacas a solo pastoreo fueron valores de cetosis subclínica ( $\beta$ OH  $> 1,2$  mmol/L), las cuales estarían más bien relacionadas a la fermentación butírica 2 a 4 horas posterior al pico de consumo del pasto que a la cetosis [10, 20]. Estos resultados indicaron que, el muestreo sanguíneo realizado posterior al pico de ingesta de pasto generaría un diagnóstico falso positivo de cetosis subclínica. A su vez se describen que los cambios en las concentraciones plasmáticas de los metabolitos durante el día

son mínimos y no interfieren en el diagnóstico de desbalances metabólicos-nutricionales [14].

La mayor concentración de triglicéridos en GP se presentó a la hora 01:00 (0,88 mmol/L), correlacionándose con el comportamiento de rumia ( $r = 0,59$ ;  $P < 0,016$ ). La concentración plasmática de Pi disminuyó con el transcurso del día, alcanzando los valores más bajos a la 01:00 y 05:00 horas y su máxima concentración a la 13:00 horas ( $P < 0,05$ ; FIG. 2), con un comportamiento similar en los dos grupos, si bien significativo solo en el grupo en pastoreo, hecho que se explicaría por la mayor salivación nocturna en el grupo a pastoreo que genera mayor recirculación de P.

Los resultados indicaron que el momento de mayor estabilidad y representabilidad para obtención de sangre, que exprese el balance de los principales metabolitos sanguíneos indicadores del metabolismo de la energía, proteína y minerales para perfiles metabólicos sanguíneos en animales a pastoreo de primavera en el sur de Chile, sería entre las 05:00 y 13:00 horas del día. Otros estudios señalaron un rango más estrecho entre 9:00 y 11:00 horas [26].

El grupo GP-C presentó una glucemia mayor y concentraciones plasmáticas de urea y Pi menores que las del GP ( $P < 0,05$ ; TABLA I). El mejor balance energético-nitrogenado en GP-C se asociaría a una mayor utilización del nitrógeno del pasto



**TABLA I**  
**CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS (X ± DE)\* DE METABOLITOS ENERGÉTICOS, PROTEICOS Y MINERALES EN VACAS LECHERAS SOLO A PASTOREO NO SUPLEMENTADAS (GP) Y SUPLEMENTADAS CON CONCENTRADO (GP-C).**

VARIABLE		GP (n= 4)	GP-C (n= 4)	Signif.
		X ± DE	X ± DE	
βOH-butirato	mmol/L	0,77 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,185
Colesterol	mmol/L	4,34 ± 0,66 <sup>a</sup>	5,09 ± 1,32 <sup>a</sup>	0,126
Glucosa	mmol/L	3,02 ± 0,59 <sup>a</sup>	3,39 ± 0,31 <sup>b</sup>	0,000
Triglicéridos	mmol/L	0,58 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,220
Urea	mmol/L	7,34 ± 0,69 <sup>b</sup>	6,29 ± 1,02 <sup>a</sup>	0,002
Albúmina	g/L	43,6 ± 3,66 <sup>a</sup>	41,5 ± 2,37 <sup>a</sup>	0,062
Calcio	mmol/L	2,31 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,299
Fósforo	mmol/L	1,82 ± 0,44 <sup>b</sup>	1,23 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,000
Magnesio	mmol/L	0,66 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,085

\* media de 6 determinaciones durante el día; <sup>a,b</sup> señalan diferencias entre grupos, P<0,05.

con la energía aportada en el concentrado, lo que habría mejorado la utilización del amonio producido en el rumen [27], asociado a una mayor producción de propionato para la síntesis de glucosa [6, 11]. La disminución en la fosfatemia en GP-C con relación a GP, estaría asociada a un efecto de sustitución del pasto por la ingesta del concentrado en base a pulpa de remolacha, el cual presenta un bajo contenido de Pi [25].

## CONCLUSIONES

Vacas lecheras a pastoreo primaveral dedicaron 30,4% de su tiempo a pastorear, mayormente en el día, y 31,7% para rumiar mayormente en la noche. Vacas lecheras sin suplementación con concentrado, presentaron variaciones diarias en las concentraciones sanguíneas de algunos metabolitos energéticos, proteicos y minerales.

La suplementación con 3 kg de concentrado realizada dos veces al día a vacas a pastoreo primaveral minimizó las variaciones en las concentraciones sanguíneas de los metabolitos energéticos, proteicos y minerales.

## AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Chile, proyecto FONDECYT – 1030331.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AIKMAN, P.C.; REYNOLDS, C.K.; BEEVER, D.E. Diet digestibility, rate of passage, and eating and rumination behavior of Jersey and Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 91: 1103-14. 2008.

[2] ALBRIGHT, J.L. Feeding behaviour of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 76: 485-498. 1993.

[3] AVONDO, M.; BONANNO, A.; PAGANO, R.I.; VALENTI, B.; GRIGOLI, A.D.; ALICATA, M.L.; GALOFARO, V.; PENNISI, P. Milk quality as affected by grazing time of day in Mediterranean goats. *J. Dairy Res.* 75: 48-54. 2008.

[4] BALOCCHI, O.; PULIDO, R.G.; FERNÁNDEZ, J. Comportamiento del pastoreo en vacas con y sin suplementación con concentrados. *Agric. Téc.* 62: 87-98. 2002.

[5] BARGO, F.; MULLER, L.D. Grazing behavior affects daily ruminal pH and NH<sub>3</sub> oscillations of dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 88: 303-9. 2005.

[6] BARGO, F.; MULLER, L.D.; KOLVER, E.S.; DELAHOY, J.E. Invited review: production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 86: 1-42. 2003.

[7] BORREBAEK, B.; HALSE, K.; TVEIT, B.; DAHLE, H.K. Plasma glucose, ketone bodies, insulin, glucagon and enteroglucagon in cows: Diurnal variations related to ketone levels before feeding and to the ketogenic effects of feeds. *Acta Vet. Scand.* 31: 5-15. 1990.

[8] DIRECCIÓN METEOROLÓGICA DE CHILE. Informe de precipitaciones. 2010. En Línea: <http://www.meteochile.cl/precipitacion.html>. 20 de octubre, 2010.

[9] CONTRERAS, P.A.; VALENZUELA, L.; WITWER, F.; BÖHMWALD, H. Desbalances metabólicos nutricionales más frecuentes en rebaños de pequeños productores de leche. *Arch. Med. Vet.* 28: 39-50. 1996.

[10] DUFFIELD, T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16: 231-53. 2000.

[11] EICHER, R.; LIESEGANG, A.; BOUCHARD, E.; TREMBLAY, A. Effect of cow-specific factors and feeding frequency of concentrate on diurnal variations of blood me-

- tabolites in dairy cows. **Am. J. Vet. Res.** 60: 1493-9. 1999.
- [12] FERGUSON, J.D.; GALLIGAN, D.T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. **J. Dairy Sci.** 77: 2695-2703. 1994.
- [13] FISCHER, V.; DESWYSEN, A.G.; DUTILLEUL, P.; DE BOEVER, J. Padrões da distribuição nictemeral do comportamento ingestivo de vacas leiteiras, ao início e ao final da lactação, alimentadas com dieta à base de silagem de milho. **Rev. Bras. Zoot.** 31: 2129-2138. 2002.
- [14] HAGEMEISTER, H.; UNSHELM, J. Individual, diurnal and time-of-day changes in the blood constituents in cattle. 8. Behavior of lactate, pyruvate, urea and blood sugar. **Zentralbl. Veterinarmed A.** 17: 13-26. 1970.
- [15] HODGSON, J. Grazing management. In: Essex, E (Ed.). **Science into Practice.** Longman Scientific and Technical, Ed. E. Essex. Pp.203. 1990.
- [16] HOFF, B.; DUFFIELD, T. Nutritional and metabolic profile testing of dairy cows. **Anim. Health Lab. LabNote.** Pp. 1-3. 2003.
- [17] MANSTON, R.; ROWLANDS, G.J.; LITTLE, W.; COLLIS, K.A. Variability of the blood composition of dairy cows in relation to time of day. **J. Agri. Sci. Camb.** 96: 593-598. 1981.
- [18] MELIN, M.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; WIKTORSSON, H. Feeding patterns and performance of cows in controlled cow traffic in automatic milking systems. **J. Dairy Sci.** 88: 3913-22. 2005.
- [19] MILLER, L.A.; THEODOROU, M.K.; MACRAE, J.C.; EVANS, R.T.; ADESOGAN, A.T.; HUMPHREYS, M.O.; SCOLLAN, N.D.; MOORBY, J.M. Milk production and N partitioning responses in dairy cows offered perennial ryegrass selected for high water soluble carbohydrate concentrations. In: IX International Symposium on ruminant Physiology. Pretoria- South Africa, 17-22 october: **South Afric. J. Anim. Sci.** 29: 321-322. 1999.
- [20] MULLIGAN, F.J.; O'GRADY, L.; RICE, D.A.; DOHERTY, M.L. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. **Anim. Reprod. Sci.** 96: 331-53. 2006.
- [21] PETRIE, A.; WATSON, P. **Statistics for Veterinary and Animal Science.** 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford: Wiley-Blackwell. 312pp. 2006.
- [22] PHILLIPS, C.J.C.; LEAVER, J.D. Supplementary feeding of forage to grazing dairy cows. Offering hay to dairy cows at high and low stocking rates. **Grass and Forag. Sci.** 40: 183-192. 1985.
- [23] PULIDO, R.G.; BALOCCHI, O.; FERNÁNDEZ, J. Efecto del nivel de producción de leche sobre el comportamiento ingestivo en vacas lecheras en pastoreo primaveral. **Arch. Med. Vet.** 33: 137-144. 2001.
- [24] PULIDO, R.G.; BERNDT, S.; ORELLANA, P.; WITTWER, F. Efecto del tipo de carbohidrato en el concentrado sobre la respuesta productiva de vacas lecheras de alta producción en pastoreo primaveral. **Arch. Med. Vet.** 39: 19-26. 2007.
- [25] PULIDO, R.G.; FELMER, E.; HINOSTROZA, A. Efecto del tipo de carbohidrato en el concentrado sobre el consumo de alimento en vacas lecheras en pastoreo. **Arch. Med. Vet.** 38:123-128. 2006.
- [26] ROWLANDS, G.J. A review of variations in the concentrations of metabolites in the blood of beef and dairy cattle associated with physiology, nutrition and disease, with particular reference to the interpretation of metabolic profiles. **World Rev. Nutr. Diet.** 35: 172-235. 1980.
- [27] SINCLAIR, K.D.; SINCLAIR, L.A.; ROBINSON, J.J. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptative changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. **J. Anim. Sci.** 78: 2659-2669. 2000.
- [28] SOARES, P.C.; MARUTA, C.A.; SUCUPIRA, M.C.A.; MORI, C.S.; KITAMURA, S.S.; ANTONELLI, A.C.; ORTOLANI, E.L. Diagnóstico de carência energética em bovinos por testes de metabolismo ruminal. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 43: 33-41. 2006.
- [29] SORIANO, F.D.; POLAN, C.E.; MILLER, C.N. Milk production and composition, rumen fermentation parameters, and grazing behavior of dairy cows supplemented with different forms and amounts of corn grain. **J. Dairy Sci.** 83: 1520-9. 2000.
- [30] VICARI, T.; VAN DEN BORNE, J.J.; GERRITS, W.J.; ZBINDEN, Y.; BLUM, J.W. Postprandial blood hormone and metabolite concentrations influenced by feeding frequency and feeding level in veal calves. **Dom. Anim. Endocrinol.** 34: 74-88. 2008.