

## Energy-mineral supplementation during the gestation-lactation transition period in Holstein cows

### Suplementación energético-mineral durante el período de transición gestación-lactancia en vacas Holstein

Luis Rodrigo Balarezo-Urresta<sup>1</sup>, Ernesto Noval-Artiles<sup>2</sup> and Juan Ramón García-Díaz<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Politécnica del Carchi. Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales. Tulcán, Proyecto de mejoramiento de la competitividad láctea en la provincia del Carchi. Escuela de Desarrollo Integral Agropecuario, Carchi, Ecuador.

<sup>2</sup>Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Medicina veterinaria y Zootecnia, Carretera a Camajuani Km. 5 ½. Santa Clara. CP 54830, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

\*Email: [juanramon@uclv.edu.cu](mailto:juanramon@uclv.edu.cu)

Luis Rodrigo Balarezo-Urresta: <https://orcid.org/0000-0001-5546-1259>

Ernesto Noval-Artiles: <https://orcid.org/0000-0001-6364-3546>

Juan Ramón García-Díaz: <https://orcid.org/0000-0002-2966-7824>

In order to determine the effect of energy-mineral supplementation during the gestation-lactation transition period on the metabolic profile and reproductive indicators of Holstein cows, a total of 32 animals, between the third and fourth lactation, and body condition  $\geq 3.5$  were selected. The experiment was performed in Carchi province, Ecuador, during the rainy season. Two groups of 16 animals each were randomly formed. The same foods were supplied to all, and those in the treated group were supplemented with corn, in an amount of 1.0 kg DM, 30 days before parturition, and 2.0 kg DM at the beginning of lactation until 60 days postpartum, plus parenteral supplementation of 20 mL of kyrofosfan. The hematochemical parameters and reproductive indicators were determined, which were compared by t-Student test for independent samples. The contributions of Cu and Zn did not cover the requirements in both study groups. The metabolizable energy was deficient in the animals that were not supplemented with corn. In the cows from the treated group, the concentrations in blood serum of P, Cu, Zn and cholesterol, and the body condition were higher ( $P < 0.05$ ) at 30 and 60 days postpartum. Total proteins increased ( $P < 0.05$ ) at 60 days postpartum, while betehydroxybutyrate decreased ( $P < 0.01$ ) at 30 days postpartum. The supplementation decreased ( $P < 0.05$ ) the parturition-first service interval, the services per gestation ( $P < 0.001$ ) and the parturition-conception and parturition-parturition intervals. It is concluded that energy-mineral supplementation improves the metabolic profile and reproductive indicators.

**Key words:** *energy, protein, deficit, metabolic profile, reproductive indicators*

In tropical regions, most grasses do not meet the mineral requirements of grazing dairy cows, so there are marked deficiencies that are associated with reproductive problems (McDowell and Arthington 2005 and García *et al.* 2010). In cattle herds, with an apparently adequate diet, alterations in protein, mineral and energy metabolism were diagnosed, with a manifest deterioration in reproductive capacity (García *et al.* 2011).

In cattle herds of the Andean region from Ecuador, more than 30 % and 65 % of cows were diagnosed with high concentrations in blood serum of urea nitrogen

Para determinar el efecto de la suplementación energético-mineral durante el período de transición gestación-lactancia en el perfil metabólico y los indicadores reproductivos de vacas Holstein, se seleccionaron 32 animales, entre tercera y cuarta lactancia, y condición corporal  $\geq 3.5$ . El experimento se desarrolló en la provincia Carchi, Ecuador, durante el período lluvioso. Se conformaron aleatoriamente dos grupos, de 16 animales cada uno. Se suministraron los mismos alimentos a todos, y a los del grupo tratado se les suplementó con maíz, en cantidad de 1.0 kg MS, 30 días antes del parto, y 2.0 kg MS al inicio de la lactancia hasta los 60 días posparto, más suplementación parenteral de 20 mL de kirofosfan. Se determinaron los parámetros hematoquímicos y los indicadores reproductivos, los que se compararon mediante prueba de t-Student para muestras independientes. Los aportes de Cu y Zn no cubrieron los requerimientos en ambos grupos de estudio. La energía metabolizable fue deficiente en los animales que no se suplementaron con maíz. En las vacas del grupo tratado, las concentraciones en suero sanguíneo de P, Cu, Zn y colesterol, y la condición corporal fueron superiores ( $P < 0.05$ ) a los 30 y 60 días posparto. Las proteínas totales aumentaron ( $P < 0.05$ ) a los 60 días posparto, mientras que el betehidroxitirato disminuyó ( $P < 0.01$ ) a los 30 días posparto. La suplementación disminuyó ( $P < 0.05$ ) el intervalo parto-primer servicio, los servicios por gestación ( $P < 0.001$ ) y los intervalos parto-concepción y parto-parto. Se concluye que la suplementación energético-mineral mejora los indicadores perfil metabólico y reproductivos.

**Palabras clave:** *energía, proteína, déficit, perfil metabólico, indicadores reproductivos*

En las regiones tropicales, la mayoría de los pastos no cubren los requerimientos minerales de las vacas lecheras en pastoreo, por lo que existen marcadas deficiencias que se asocian a problemas reproductivos (McDowell y Arthington 2005 y García *et al.* 2010). En rebaños bovinos, con una dieta aparentemente adecuada, se diagnosticaron alteraciones del metabolismo proteico, mineral y energético, con deterioro manifiesto en la capacidad reproductiva (García *et al.* 2011).

En rebaños bovinos de la región andina de Ecuador, se diagnosticaron más del 30 % y 65 % de las vacas con elevadas concentraciones en suero sanguíneo de

(BUN) and betahydroxybutyrate (B-OH), respectively, and more than 60 % of females with hypophosphataemia, hypocupremia and hypocinemia. All these nutritional and metabolic alterations were associated with the deterioration of reproductive indicators (Balarezo *et al.* 2016).

The energy in food is the limiting factor of reproduction for cows in the gestation-lactation transition period, which includes three weeks before and after parturition (Castro *et al.* 2012). However, there are criteria that suggest that the first weeks of the dry season should also be analyzed (Esposito *et al.* 2014).

The energy deficit causes an increase in B-OH, as a consequence of the mobilization of fats for obtaining energy, and decreases body condition, mainly during the transition period of the dairy cow. Consequently, energy deficiency affects the restart of postpartum ovarian activity (LeBlanc 2010) and uterine involution (Balarezo *et al.* 2018).

In addition to the previous, the energy deficit in the ration causes the negative energy balance (NEB) in the cows, which causes the disorder of the functions of the hypothalamic-hypophysis-ovary axis; and it affects the secretion, amplitude, and frequency of GnRH and LH pulses, which can cause reproductive problems (Walsh *et al.* 2007).

The objective of this study was to determine the effect of energy-mineral supplementation, fitted to the production conditions of the Andean region from Ecuador, on the metabolic profile and reproductive indicators of Holstein cows during the gestation-lactation transition period.

### Materials and Methods

*Location.* The research was developed from August 2016 to July 2017, in Tufiño parish, Tulcán canton, El Carchi province. This region is located between the 1°12' and 43" North Latitude and 78° 33' 12" West Longitude, an altitude of 2990 and 3450 m o.s.l. The soil is of the Andisol order, with an effective depth of 70 cm. The relief is undulating, with a slope percentage that fluctuated between 10 and 20 % (Balarezo *et al.* 2016), determined with GPS map 60 CSx.

The rainfall ranges between 1 000 and 1250 mm in the rainy season (RS), from October to April, and from 700 to 850 mm, in the dry season (DS), from May to September. The average temperature fluctuates between 6 and 11°C, with minimums and maximums of 2 and 15 °C, respectively.

*Experimental design.* A total of 32 Holstein cows were selected, between the third and fourth lactation, with an age between 4 and 8 years, and body condition (BC)  $\geq 3.5$ . They were in rationed grazing by electric fence for 18 h. The bromatological composition of the supplied food and the intake is showed in table 1.

Calfosol (multisalmin SA, Ecuador) was supplied, which has a Ca: P ratio of 2.25: 1 (table 2). It was orally

nitrógeno ureico (BUN) y betahidroxibutirato (B-OH), respectivamente y más del 60 % de las hembras con hipofosforemia, hipocupremia e hipocinemia. Todas estas alteraciones nutricionales y metabólicas estuvieron asociadas al deterioro de los indicadores reproductivos (Balarezo *et al.* 2016).

La energía en el alimento es el factor limitante de la reproducción para las vacas en el período de transición gestación-lactancia, que comprende tres semanas antes y después del parto (Castro *et al.* 2012). No obstante, existen criterios que plantean que las primeras semanas del período seco deben ser analizadas también (Esposito *et al.* 2014).

El déficit energético provoca aumento del B-OH, como consecuencia de la movilización de las grasas para obtener energía, y disminuye la condición corporal, principalmente durante el período de transición de la vaca lechera. Consecuentemente, la deficiencia energética afecta el reinicio de la actividad ovárica posparto (LeBlanc 2010) y la involución uterina (Balarezo *et al.* 2018).

Además de lo anterior, el déficit de energía en la ración ocasiona el balance energético negativo (BEN) en las vacas, lo que causa el trastorno de las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario; y afecta la secreción, amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH y LH, lo que puede causar problemas reproductivos (Walsh *et al.* 2007).

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la suplementación energético-mineral, ajustada a las condiciones de producción de la región andina del Ecuador, en el perfil metabólico e indicadores reproductivos de vacas Holstein durante el período de transición gestación-lactancia.

### Materiales y Métodos

*Ubicación.* La investigación se desarrolló desde agosto del 2016 hasta julio del 2017, en la parroquia de Tufiño, cantón Tulcán, provincia El Carchi. Esta zona se encuentra ubicada entre los 1° 12' y 43" Latitud Norte y 78° 33' 12" Longitud Oeste, a una altura de 2 990 a 3 450 m s.n.m., El suelo es del orden Andisol, con 70 cm de profundidad efectiva. El relieve es ondulado, con porcentaje de pendiente que fluctuó entre 10 y 20 % (Balarezo *et al.* 2016), determinado con GPS map 60 CSx.

Las precipitaciones oscilan entre 1 000 y 1 250 mm en el período lluvioso (PLL), de octubre a abril, y de 700 a 850 mm, en el poco lluvioso (PPLL), de mayo a septiembre. La temperatura promedio fluctúa entre 6 y 11°C, con mínimas y máximas de 2 y 15 °C, respectivamente.

*Diseño experimental.* Se seleccionaron 32 vacas Holstein, entre tercera y cuarta lactancia, con edad entre 4 y 8 años, y condición corporal (CC)  $\geq 3.5$ . Se encontraban en pastoreo racionado mediante cerca eléctrica durante 18 h. La composición bromatológica de los alimentos suministrados y el consumo se presenta en la tabla 1.

Se suministró calfosol (multisalmin SA, Ecuador), que tiene una relación Ca:P de 2.25:1 (tabla 2). Se aplicó

Table 1. Bromatological composition and intake of the supplied food to the studied animals

Foods	DMI (kg)	DM (%)	ME (MJ kg DM <sup>-1</sup> )	CP (%)	Ca %	P %	Cu (mg kg DM <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg DM <sup>-1</sup> )
Zea mays	2.00	87.00	13.35	8.10	0.30	0.29	2.05	23.30
Lolium perenne	4.77	14.10	11.51	21.35	0.27	0.59	5.00	10.00
Cenchrus clandestinum	2.12	14.00	8.49	20.37	0.26	0.35	13.90	59.50
Holcus lanatus	0.53	15.80	8.91	17.00	0.42	0.59	3.70	21.70
Trifolium repens	0.42	13.40	9.24	28.00	1.25	0.52	8.80	31.00
Plantago sativa	2.75	10.60	9.41	23.80	1.16	0.44	12.4	21.00
CALFOSAL	0.15	98.00	-----	-----	12.00	6.00	2.90	1.60

DMI: Dry matter intake, DM: dry matter, ME: metabolizable energy, CP: crude protein

applied, to guarantee between 100 to 150 g animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> of availability. Two groups of 16 animals each were randomly established. One group was used as a control and the other as a treated.

por vía oral, para garantizar entre 100 a 150 g animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de disponibilidad. Se conformaron de forma aleatoria dos grupos, de 16 animales cada uno. Un grupo se utilizó como control y el otro como tratado.

Table 2. Chemical composition of calfosal used as oral supplementation

Mineral	Concentration, %	Mineral	Concentration, %
P	6.00	Cu	0.29
Ca	12.00	Co	0.002
Mg	0.30	S	0.16
Na	17.00	Cl	27.00
K	0.005	Fe	0.15
Mg	0.30	Se	0.0003
Zn	0.16	Mn	0.004
I	0.02		

The animals from the treated group were given corn, in an amount of 1.0 kg DM, 30 d before parturition, and 2.0 kg DM at the beginning of lactation until 60 d postpartum (DPP). In addition, 20 mL of kirofosfan (Kirovet SA, Colombia) was parenterally applied, at 30 days before parturition (DBP), at parturition, and at 30 DPP. It contains sodium toldimfos (200 mg), zinc sulfate (1.1 mg), sodium selenite (0.33 mg), nicotinic acid (5 mg), potassium iodide (20 mg), manganese sulfate (1 mg) and 40 mg. copperxilin (Brouwer, Argentina), which contains copper glycinate (10 mg).

*Taking blood samples.* For the biochemical analyzes, 10 mL of blood was extracted by coccygeal venipuncture with vacutainer tubes, without anticoagulant. It was waited 24 h for the spontaneous retraction of the coagulum, it was centrifuged at 2,500 g for 10 min. and blood serum was obtained, which was frozen at -10°C until the analysis.

*Determination of hematochemical parameters.* The hemochemical indicators were determined in a Star Fax 3300 equipment (Aznar Diagnóstica, USA), using commercial kits, according to the manufacturer's procedures (table 3). All the analyzes were carried out in the diagnostic laboratory, Carlos Martínez Hoyos veterinary clinic, from Universidad de Nariño, Colombia.

A los animales del grupo tratado se les suministró maíz, en cantidad de 1.0 kg MS, 30 d antes del parto, y 2.0 kg MS al inicio de la lactancia hasta los 60 d posparto (DPP). Además, se les aplicó por vía parenteral, a los 30 d antes del parto (DAP), al parto, y a los 30 DPP, 20 mL de kirofosfan (Kirovet SA, Colombia). Este contiene toldimfos sódico (200 mg), sulfato de cinc (1.1 mg), selenito de sodio (0.33 mg), ácido nicotínico (5 mg), yoduro de potasio (20 mg), sulfato de manganeso (1 mg) y 40 mg de cobrexilin (Brouwer, Argentina), que contiene glicinato de cobre (10 mg).

*Toma de muestras de sangre.* Para los análisis bioquímicos se extrajeron 10 mL de sangre por venopunción coccígea con tubos vacutainer, sin anticoagulante. Se esperaron 24 h para la retracción espontánea del coágulo, se centrifugó a 2 500 g durante 10 min. y se obtuvo el suero sanguíneo, que se congeló a -10°C hasta el momento de los análisis.

*Determinación de los parámetros hematoquímicos.* Los indicadores hemoquímicos se determinaron en un equipo Star Fax 3300 (Aznar Diagnóstica, USA), utilizando kits comerciales, según los procedimientos del fabricante (tabla 3). Todos los análisis se realizaron en el laboratorio de diagnóstico, clínica veterinaria Carlos Martínez Hoyos, de la Universidad de Nariño, Colombia.

Table 3. Hematochemical indicators evaluated in the researched cows

Profile	Variables	Method
Mineral	Ca, Mg, Cu, Zn	EEA (Miles <i>et al.</i> 2001)
	Phosphorus	Phosphomolybdate. Ultra Violet (UV)
Hematochemical	Total proteins	Biuret. Colorimetric
	Cholesterol	CHOD-POD. Enzymatic colorimetric
	$\beta$ -hydroxybutyrate (B-OH)	RANBUT D-3. Enzyme kinetic

*Body condition.* The BC was estimated by physical examination of the animals, which included inspection and palpation. It was classified on a scale of 1-5 points and divisions of 0.25 between them, according to the methodology proposed by Rodenburg (2004).

*Methodology for heat and artificial insemination detection.* Heat detection was performed from 5-9 a.m. and from 3-7 p.m., by a trained man. As an auxiliary method, paint was used on the base of the cows' tails. An experienced technician carried out the insemination by depositing the semen in the body of the uterus, with a technical efficiency between 60 and 65 % in the last four years. Semen from proven fertility bulls was used, content in straws of 0.25 and concentrations of 32 million per dose.

*Analysis of reproductive indicators.* The parturition-first service intervals, parturition-conception interval, parturition-parturition interval, percentage of conceptions at first service and services per conceptions were determined. It was proceeded from individual records, according to the methodologies described by Brito *et al.* (2010).

*Statistical processing.* The biochemical and reproductive indicators were compared between the control and treated groups by means of the t- Student test for independent samples. The statistical package StatgraphisCenturion Ver. XV.II (StatPoint Technologies 2010) was used in these processes.

## Results and Discussion

Table 4 shows the nutrient balance. At 35 DPP, in the treated group, the incorporation of corn and the supplementation of mineral salt orally satisfied the nutrients of metabolizable energy and Ca, respectively.

*Condición corporal.* La CC se estimó mediante el examen físico de los animales, que incluyó la inspección y palpación. Se clasificó en la escala de 1-5 puntos y divisiones de 0.25 entre ellos, según la metodología propuesta por Rodenburg (2004).

*Metodología para la detección del celo e inseminación artificial.* La detección del celo se realizó de 5-9 a.m. y de 3-7 p.m., por un hombre entrenado. Como método auxiliar, se utilizó pintura en la base de la cola de las vacas. Un técnico experimentado efectuó la inseminación depositando el semen en el cuerpo del útero, con una eficiencia técnica entre 60 y 65 % en los últimos cuatro años. Se utilizó semen de toros de fertilidad probada, contenido en pajuelas de 0.25 y concentraciones de 32 millones por dosis.

*Análisis de los indicadores reproductivos.* Se determinaron los intervalos parto-primer servicio, intervalo parto-concepción, intervalo parto-parto, porcentaje de gestaciones al primer servicio y servicios por gestación. Se procedió a partir de los registros individuales, según las metodologías descritas por Brito *et al.* (2010).

*Procesamiento estadístico.* Se compararon los indicadores bioquímicos y reproductivos entre los grupos control y tratado mediante la prueba de t-Student para muestras independientes. En estos procesamientos se utilizó el paquete estadístico StatgraphisCenturion Ver. XV.II (StatPoint Technologies 2010).

## Resultados y Discusión

La tabla 4 muestra el balance de nutrientes. A los 35 DPP, en el grupo tratado, la incorporación del maíz y la suplementación de sal mineral por vía oral satisfizo los nutrimentos de energía metabolizable y Ca,

Table 4. Nutrient balance of the treated group at 35 DPP

Food	ME (MJ d <sup>-1</sup> )	CP	Ca g d <sup>-1</sup>	P	Cu mg d <sup>-1</sup>	Zn
Control group						
Total contribution	140.92	3 005.17	87.80	79.40	114.62	397.11
Requirement	145.78	1 789.00	87.09	47.01	140.00	561.66
Difference	-4.86	1 216.17	0.71	32.39	-25.37	-164.55
Treated group						
Total contribution	162.48	3 071.00	94.11	83.14	113.00	421.01
Requirement	153.98	1 926.00	93.3	49.67	147.50	615.00
Difference	8.80	1 144.99	0.81	33.47	-34.455	-193.99

However, the control group maintained the energy imbalance.

In both groups, the total CP contributions were higher than the requirements of these animals, and its concentration was in accordance with the estimated DM intake, which was 21.38 % in the control group and 19.37 % in the treated group; and 14.05 kg DM<sup>-1</sup> and 15.85 kg DM<sup>-1</sup>, respectively. In the first case, the lower DMI could be due to excess protein, and the imbalance between this one and the energy (NRC 2001).

The excess of CP in lactating animals, between 20 and 23 %, negatively affects the parturition-conception interval, decreases the pH in the uterus and increases the concentration of urea and P4 in blood in cows in early lactation (NRC 2001 and Castro *et al.* 2012).

In both groups, the excess of N caused an energy expenditure to be able to eliminate it, increasing the open days, services per conception and interval between parturitions (David *et al.* 2018). However, energy supplementation facilitated a better energy-protein ratio (table 4).

The concentrations of Ca and Mg in blood serum did not differ at any time ( $P > 0.05$ ) in the supplemented cows with respect to the control during the gestation-lactation transition period (table 5).

respectivamente. Sin embargo, el grupo control mantuvo el desbalance energético.

En ambos grupos, los aportes totales de PB fueron superiores a los requerimientos de estos animales, y su concentración estuvo de acuerdo con el consumo estimado de MS, que fue 21.38 % en el grupo control y 19.37 % en el tratado; y 14.05 kg MS<sup>-1</sup> y 15.85 kg MS<sup>-1</sup>, respectivamente. En el primer caso, el menor CMS se pudo deber al exceso de proteína, y el desbalance entre esta y la energía (NRC 2001).

El exceso de PB en los animales en lactación, entre 20 y 23 %, afecta negativamente el intervalo parto concepción, disminuye el pH en el útero e incrementa la concentración de urea y P4 en sangre en vacas en lactancia temprana (NRC 2001 y Castro *et al.* 2012).

En ambos grupos, el exceso de N causó un gasto energético para poder eliminarlo, incrementando los días abiertos, servicios por concepción e intervalo entre partos (David *et al.* 2018). Sin embargo, la suplementación energética facilitó una mejor relación energía-proteína (tabla 4).

Las concentraciones de Ca y Mg en suero sanguíneo no difirieron en ningún momento ( $P > 0,05$ ) en las vacas suplementadas con respecto al control durante el período de transición gestación-lactancia (tabla 5).

Table 5. Concentration of minerals in blood serum in the gestation-lactation transition period

Variables	Moment	Groups		±SE
		Control	Treated	
Ca, mmol L <sup>-1</sup>	30 DBP	3.68	3.43	0.20
	30 DPP	2.86	2.99	0.22
	60 DPP	3.61	3.80	0.16
P, mmol L <sup>-1</sup>	30 DBP	1.75	1.79	0.08
	30 DPP	1.68	2.18	0.11**
	60 DPP	1.69	2.16	0.08**
Mg, mmol L <sup>-1</sup>	30 DBP	1.25	1.20	0.06
	30 DPP	1.42	1.44	0.0767
	60 DPP	1.36	1.53	0.10
Cu, μmol L <sup>-1</sup>	30 DBP	11.76	11.65	0.14
	30 DPP	11.00	12.07	0.21***
	60 DPP	11.16	12.62	1.61***
Zn, μmol L <sup>-1</sup>	30 DBP	12.37	12.16	0.28
	30 DPP	11.98	13.50	0.20***
	60 DPP	12.41	14.33	0.21***

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  in rows indicate significant differences between the the values shown in each of them (t-Student).

DBP: days before parturition

DPP: days postpartum

The Ca for the two groups was always above the critical limit (CL) of deficiency established by McDowell and Arthington (2005). This agrees with the contribution of this mineral in the supplied food, which covered their requirements. Also, the dairy cow performs a strong

El Ca para los dos grupos siempre estuvo por encima del límite crítico (LC) de deficiencia establecido por McDowell y Arthington (2005). Esto concuerda con el aporte de este mineral en los alimentos suministrados, que cubrió sus requerimientos. Además, la vaca lechera

action on Ca homeostasis, with the aim of preventing its loss, especially in highly productive animals or during prepartum (NRC 2001).

In both groups, the Ca concentrations in blood serum decreased at 30 d of lactation with respect to the evaluation performed at 30 DBP. This was influenced by the high yield in dairy production and the start of production activity. However, as the Ca requirements are covered, the cow can support metabolic activity during the evaluated period.

In the research 88.8 % of the grasses samples showed deficient Mg values, according to the CLs suggested by McDowell and Arthington (2005). However, the supplementation with Calfosal substitute the nutritional requirements of this macroelement, which is corroborated in its concentrations in blood serum in both groups (table 5), although they did not differ ( $P > 0.05$ ). This may be mainly due to an adequate ruminal pH and the appropriate absorption of this mineral (NRC 2001) from the gastrointestinal system (Schonewille 2013).

The supplementation increased ( $P < 0.01$ ) the P concentrations in blood serum, at 30 and 60 DPP from 1.68 to 2.18 and 1.69 to 2.16 mmol/L, respectively (table 5), which must have decreased the losses of this macroelement due to its use in dairy production, and must have favored postpartum reproductive activity. For this reason, it is almost mandatory to supplement good quality minerals by different ways, including soil fertility enhancing procedures (McDowell and Arthington 2005).

In the treated group, cupremia and cinchemia were higher ( $P < 0.001$ ) at 30 and 60 DPP with respect to the control group (table 5). In the latter, at all evaluation moments, they were lower than the deficiency CL established by McDowell and Arthington (2005), consequently with the deficit of these microelements in the nutrient balance.

These results corroborate the Noval *et al.* (2016) reports, who refers that parenteral supplementation of 50 mg of Cu, 100 mg of Zn and 50 mg of Mn increased the cupremia and cinchemia, from five and 15 days after treatment, respectively. While, blood concentrations of both minerals become deficient at 60 d.

Under this research conditions, the P supplied in the diet covered the requirements of the dairy cows, but there were deficiencies of the macroelement in the blood serum of the animals, which could be caused by the excesses of CP and Mg in the diet.

The excessive contributions of CP and Mg originate in the rumen the formation of magnesium sulfate, which reduces the absorption of P in the small intestine (Djokovic *et al.* 2014), and iron sulfide, which reduces the absorption of Cu at ruminal level (Arthington and Brown 2005). In addition, in the soil there are excesses of S and Fe (Balarezo *et al.* 2016) that condition the deficiency of Cu and Zn in the blood serum of cows

realiza una fuerte acción en la homeostasis del Ca, con el objetivo de impedir su pérdida, sobre todo en animales muy productivos o durante el parto (NRC 2001).

En ambos grupos, las concentraciones de Ca en suero sanguíneo disminuyeron a los 30 d de lactancia con respecto a la evaluación realizada a los 30 DAP. En ello influyó el alto rendimiento en producción láctea y el inicio de la actividad productiva. No obstante, como se cubren los requerimientos de Ca, la vaca puede soportar la actividad metabólica durante el período evaluado.

En la investigación, 88.8 % de las muestras de pastos presentaron valores deficientes de Mg, según los LC sugeridos por McDowell y Arthington (2005). Sin embargo, la suplementación con Calfosal suplió los requerimientos nutricionales de este macroelemento, lo que se corrobora en sus concentraciones en suero sanguíneo en ambos grupos (tabla 5), aunque no difirieron ( $P > 0,05$ ). Esto se puede deber, principalmente, a un adecuado pH ruminal y a la apropiada absorción de ese mineral (NRC 2001) desde el sistema gastrointestinal (Schonewille 2013).

La suplementación incrementó ( $P < 0,01$ ) las concentraciones de P en suero sanguíneo, a los 30 y 60 DPP de 1.68 a 2.18 y 1.69 a 2.16 mmol/L, respectivamente (tabla 5), lo que debe haber amortiguado las pérdidas de este macroelemento por su uso en la producción láctea, y debe haber favorecido la actividad reproductiva posparto. Es por ello que es casi obligatorio suplementar minerales de buena calidad por diferentes vías, incluidos los procedimientos mejoradores de la fertilidad del suelo (McDowell y Arthington 2005).

En el grupo tratado, la cupremia y la cinquemia fueron superiores ( $P < 0.001$ ) a los 30 y 60 DPP con respecto al grupo control (tabla 5). En este último, en todos los momentos de evaluación, fueron inferiores al LC de deficiencia establecido por McDowell y Arthington (2005), consecuentemente con el déficit de estos microelementos en el balance de nutrientes.

Esos resultados corroboran los informes de Noval *et al.* (2016), quienes refieren que la suplementación parenteral de 50 mg de Cu, 100 mg de Zn y 50 mg de Mn incrementó la cupremia y la cinquemia, a partir de los cinco y 15 d posteriores al tratamiento, respectivamente. En tanto, las concentraciones en sangre de ambos minerales se hacen deficientes a los 60 d.

En las condiciones de esta investigación, el P suministrado en la dieta cubrió los requerimientos de las vacas lecheras, pero hubo deficiencias del macroelemento en el suero sanguíneo de los animales, lo que pudo ser causado por los excesos de PB y Mg en la dieta.

Los aportes excesivos de PB y Mg originan en el rumen la formación de sulfato de magnesio, que disminuye la absorción del P en el intestino delgado (Djokovic *et al.* 2014), y de sulfuro de hierro, que reduce la absorción del Cu a nivel ruminal (Arthington y Brown 2005). Además, en el suelo existen excesos de S y Fe (Balarezo *et al.* 2016) que condicionan la deficiencia de Cu y Zn en el suero sanguíneo de las vacas (McDowell

(McDowell and Arthington 2005).

These aspects show that although P, Cu and Zn are supplemented orally, there were deficiencies of these minerals or, at least, this way will not be the most effective for supplementation. This justifies the strategy of oral and parenteral mineral supplementation used in this research, which increased the concentrations of P, Cu and Zn in blood serum (table 5).

These results agree with those obtained by García *et al.* (2012) and Noval *et al.* (2016), who with the supplementation of other mineral sources, different schemes and parenterally, obtained favorable results in reproductive and economic efficiency.

The injectable minerals avoid interferences and antagonisms in their absorption and metabolism (García *et al.* 2012). However, oral supplementation is very important for microorganisms and rumen bioactivity (McDowell and Arthington 2005 and Djokovic *et al.* 2014). The combination of both ways for the supplementation of minerals constitutes one of the scientific and practical contributions of this research.

Table 6 shows the concentrations of the energy and protein profile indicators of the cows under study. In supplemented cows, B-OH concentrations decreased ( $P < 0.01$ ) at 30 DPP. The BC and blood cholesterol concentrations were higher ( $P < 0.05$ ) in supplemented cows at 30 and 60 DPP. Also in them, total proteins (TP) increased ( $P < 0.05$ ).

The decrease in B-OH is due to that in the animals supplemented with corn there was less fat mobilization to compensate the energy deficit. Under these conditions, the concentrations of non-esterified fatty acid in the follicular fluid decrease. In this medium, the oocytes

y Arthington 2005).

Estos aspectos indican que aunque se suplemente P, Cu y Zn por vía oral existirán deficiencias de estos minerales o, al menos, esta vía no será la más efectiva para la suplementación. Esto justifica la estrategia de suplementación oral y parenteral de minerales utilizada en esta investigación, que incrementó las concentraciones de P, Cu y Zn en suero sanguíneo (tabla 5).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por García *et al.* (2012) y Noval *et al.* (2016), quienes con la suplementación de otras fuentes de minerales, distintos esquemas y por vía parenteral, obtuvieron resultados favorables en la eficiencia reproductiva y económica.

Los minerales inyectables evitan las interacciones y antagonismos en su absorción y metabolismo (García *et al.* 2012). Sin embargo, la suplementación oral es muy importante para los microorganismos y la bioactividad del rumen (McDowell y Arthington 2005 y Djokovic *et al.* 2014). La combinación de ambas vías para la suplementación de los minerales constituye uno de los aportes científicos y prácticos de esta investigación.

En la tabla 6 se exponen las concentraciones de los indicadores del perfil energético y proteico de las vacas en estudio. En las vacas suplementadas disminuyeron ( $P < 0.01$ ) las concentraciones de B-OH a los 30 DPP. La CC y las concentraciones sanguíneas de colesterol fueron superiores ( $P < 0.05$ ) en las vacas suplementadas a los 30 y 60 DPP. También en ellas se incrementaron ( $P < 0.05$ ) las proteínas totales (PT).

La disminución del B-OH se debe a que en los animales suplementados con maíz hubo menor movilización de grasa para compensar el déficit de energía. En estas condiciones disminuyen las concentraciones de ácido graso no esterificado en el fluido folicular. En este

Table 6. Levels of the energy and protein profile indicators in the cows under study during the gestation-lactation transition period.

Variables	Moment	Groups		±SE
		Control	Treated	
B-OH, mmol L <sup>-1</sup>	30 DBP	0.51	0.47	0.04
	30 DPP	0.93	0.57	0.06**
	60 DPP	0.87	0.65	0.05
BC, U <sup>-1</sup>	30 DBP	3.50	3.56	20.08
	30 DPP	2.61	2.93	0.08**
	60 DPP	3.21	3.50	0.07*
Cholesterol, mmol L <sup>-1</sup>	30 DBP	3.48	3.28	0.11
	30 DPP	2.72	3.02	0.11*67
	60 DPP	3.42	3.80	0.08*
TP, g L <sup>-1</sup>	30 DBP	91.31	92.06	0.62
	30 DPP	83.75	85.93	2.58
	60 DPP	88.37	94.37	1.61*

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  in rows indicate significant differences between the the values shown in each of them (t-Student).

DBP: days before parturition

DPP: days postpartum

have higher quality and competence and, consequently, higher fertility (Aardema *et al.* 2019).

The improvement in energy metabolism indicators may be due to supplementation with corn, which increased body energy reserves and BC at 30 and 60 DPP.

These results are in contrast to those stated by other authors, who show that the peak of DM intake occurs at 10-14 weeks postpartum, but that of lactation occurs at the eighth week. Therefore, the NEB should be extended for more than 30 DPP (Macrae 2019). The lack of correspondence can be explained because this experiment was performed with cows that had a BC  $\geq 3.5$  and controlled research conditions. The latter included a balanced ration and quality grasses, which allowed them to have a NEB of shorter duration.

The improvement in the energy status of the supplemented animals may be due to the increase in cupremia and cinchemia in them. The Cu is a co-factor of the terminal enzyme of the respiratory chain, and cytochrome-c-oxidase catalyzes the transfer of four electrons to O<sub>2</sub> to form two molecules of water and ATP, in addition to participating in obtaining energy (Gebhard *et al.* 2001).

The Zn is involved in energy metabolism because the secretion of pyruvate kinase in the  $\beta$  cells of the pancreas is dependent on this microelement. This enzyme participates in glycolysis, so it is assumed that there is a compromise of the energy metabolism of the animal during Zn deficiency (Evans and Henshaw 2008).

In cows supplemented with 50 mg of Cu parenterally, three applications every 60 days, increased (P < 0.05) the BC (García *et al.* 2007). This treatment in fattening bulls increased (P < 0.05) live weight (LW) and their mean daily gain (MDG) (García *et al.* 2017). The injectable Cu supplementation, alone or in combination with Zn and Mn, increased (P < 0.05) the serum levels of Cu and Zn and MDG in calves (Noval *et al.* 2016). These results corroborate the importance of these microelements to improve LW and MDG, both related to energy metabolism.

In the treated group, cholesterol values were higher (P < 0.05) at 30 and 60 DPP (table 6), which corroborates the results obtained by Moyano and Rodríguez (2014). The increase in cholesterolemia is associated with a better adaptation of the animals of this group to NEB, as a result of the supplementation with corn, the decrease in B-OH concentrations and the increases in cinchemia. The Zn is necessary for the synthesis of cholesterol, which is in turn essential for the synthesis of steroids, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> and T<sub>4</sub>, which favor the adequate presentation of estrous cycles (Omur *et al.* 2016).

Total proteins increased in supplemented animals at 60 DPP (table 6), possibly because the magnitude of NEB decreased and because of the beneficial actions in the protein metabolism of minerals, especially Cu

medio, los ovocitos tienen más calidad y competencia y, consecuentemente, mayor fertilidad (Aardema *et al.* 2019).

La mejora en los indicadores del metabolismo energético se puede deber a la suplementación con maíz, que incrementó las reservas energéticas corporales y la CC a los 30 y 60 DPP.

Estos resultados contrastan con lo planteado por otros autores, que indican que el pico de consumo de MS ocurre a las 10-14 semanas posparto, pero el de lactancia se produce a la octava semana. Por tanto, el BEN se debe prolongar más de 30 DPP (Macrae 2019). La falta de correspondencia se puede explicar porque este experimento se realizó con vacas que tenían una CC  $\geq 3.5$  y condiciones controladas de investigación. Estas últimas incluyeron una ración equilibrada y pastos de calidad, lo que les permitió tener un BEN de menor duración.

La mejora del estado energético de los animales suplementados se puede deber al incremento de la cupremia y la cinchemia en ellos. El Cu es co-factor de la enzima terminal de la cadena respiratoria, y la citocromo-c-oxidasa cataliza la transferencia de cuatro electrones al O<sub>2</sub> para formar dos moléculas de agua y ATP, además de participar en la obtención de energía (Gebhard *et al.* 2001).

El Zn está implicado en el metabolismo energético porque la secreción de piruvatoquinasa en las células  $\beta$  del páncreas es dependiente de este microelemento. Esta enzima participa en la glucólisis, por lo que se asume que existe un compromiso del metabolismo energético del animal durante la deficiencia de Zn (Evans y Henshaw 2008).

En vacas suplementadas con 50 mg de Cu por vía parenteral, tres aplicaciones cada 60 d, incrementaron (P < 0,05) la CC (García *et al.* 2007). Este tratamiento en toros en ceba aumentó (P < 0.05) el peso vivo (PV) y su ganancia media diaria (GMD) (García *et al.* 2017). La suplementación inyectable del Cu, solo o combinado con Zn y Mn, incrementó (P < 0,05) los niveles séricos de Cu y Zn y la GMD en terneros (Noval *et al.* 2016). Estos resultados corroboran la importancia de estos microelementos para mejorar el PV y la GMD, ambos relacionados con el metabolismo energético.

En el grupo tratado, los valores del colesterol fueron superiores (P < 0,05) a los 30 y 60 DPP (tabla 6), lo que corrobora los resultados obtenidos por Moyano y Rodríguez (2014). El aumento de la cholesterolemia se asocia a una mejor adaptación de los animales de ese grupo al BEN, producto de la suplementación con maíz, la disminución de las concentraciones de B-OH y los incrementos de la cinchemia. El Zn es necesario para la síntesis del colesterol, que es a su vez imprescindible para la síntesis de los esteroides, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T<sub>4</sub>, que favorecen la adecuada presentación de ciclos estrales (Omur *et al.* 2016).

Las proteínas totales se incrementaron en los animales suplementados a los 60 DPP (tabla 6), posiblemente porque disminuyó la magnitud del BEN y por las acciones beneficiosas en el metabolismo proteico de



(García *et al.* 2017).

The main reproductive indicators (table 7) in the control group had a marked deterioration, according to the reference parameters of dairy cattle in optimal production conditions (Brito *et al.* 2010). However, the mineral energy supplementation improved the indicators with respect to the control.

los minerales, especialmente el Cu (García *et al.* 2017).

Los principales indicadores reproductivos (tabla 7) en el grupo control tuvieron un marcado deterioro, de acuerdo con los parámetros de referencia del bovino lechero en condiciones óptimas de producción (Brito *et al.* 2010). Sin embargo, la suplementación energético mineral mejoró los indicadores con respecto al control.

Table 7. Reproductive indicators of the study groups during the evaluated period

Indicators	Groups		±SE
	Control	Treated	
Parturition- first service interval, d	126.93	99.43	5.67*
Parturition –conception interval, d	181.31	138.62	9.49**
Parturition-parturition interval, d	463.31	420.62	9.23**
Service per conception, U	2.43	1.93	0.17*
Proportion of conceptions at first service	0.4115	0.5881	0.17

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 in rows indicate significant differences between the the values shown in each of them (t-Student)

There are several mechanisms during pre parturition and post parturition that affect the fertility of the dairy cow. One of the main is NEB, which affects follicular growth and estradiol production, possibly due to decreased levels of insulin, insulin growth factor, and LH pulses. The loss of BC after parturition increases the percentages of cows that do not cycle at the end of the voluntary waiting period (Carvalho *et al.* 2014).

The decrease (P < 0.05) of the reproductive indicators in the supplemented cows is due to the supplementation increased the concentrations of P, Cu and Zn, which play important roles in the reproductive performance of the dairy cow. In Cuba, parenteral Cu supplementation in the gestation-lactation transition period favored reproductive performance (García *et al.* 2012).

The increase in cupremia and cinchemia favor the production of E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> by luteal cells and, consequently, postpartum reproductive performance. In addition, Mn supplementation favors the synthesis of cholesterol, and this of the mentioned hormones (Griffiths *et al.* 2007).

Also the energy supplementation of cows with the use of corn reduced the NEB and with it, the mobilization of fat and the B-OH. These circumstances caused an increase in BC and cholesterol in the supplemented cows.

The increase in cholesterol is associated with higher synthesis of E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub>, which promote a better uterine environment. This favors the maternal recognition of the pregnancy, the implantation of the embryo and the development of the pregnancy (Quintela *et al.* 2008). Consequently, the supplemented cows had higher fertility after the first postpartum artificial insemination and a higher percentage of pregnancies at the first service.

It is concluded that energy-mineral supplementation,

Existen varios mecanismos durante el parto y posparto que afectan la fertilidad de la vaca lechera. Uno de los principales es el BEN, que afecta el crecimiento follicular y la producción de estradiol, posiblemente por la disminución de las concentraciones de insulina, el factor de crecimiento insulínico y los pulsos de LH. La pérdida de la CC posterior al parto incrementa los porcentajes de vacas que no ciclan al final del período de espera voluntaria (Carvalho *et al.* 2014).

La disminución (P < 0.05) de los indicadores reproductivos en las vacas suplementadas se debe a que la suplementación incrementó las concentraciones de P, Cu y Zn, que cumplen importantes funciones en el comportamiento reproductivo de la vaca lechera. En Cuba, la suplementación parenteral de Cu en el período de transición gestación-lactancia favoreció el comportamiento reproductivo (García *et al.* 2012).

El incremento de la cupremia y la cinchemia favorecen la producción de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> por las células luteales y, consecuentemente, el desempeño reproductivo posparto. Además, la suplementación de Mn favorece la síntesis de colesterol, y este de las hormonas mencionadas (Griffiths *et al.* 2007).

También la suplementación energética de las vacas con la utilización de maíz redujo el BEN y con ello, la movilización de grasa y el B-OH. Estas circunstancias provocaron el incremento de la CC y el colesterol en las vacas suplementadas.

El aumento del colesterol está asociado a mayor síntesis de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, que propician mejor ambiente uterino. Este favorece el reconocimiento materno de la gestación, la implantación del embrión y el desarrollo de la gestación (Quintela *et al.* 2008). Consecuentemente, las vacas suplementadas tuvieron mayor fertilidad tras la primera inseminación artificial posparto y superior porcentaje de gestaciones al primer servicio.

Se concluye que la suplementación energético-

fitted to the production conditions of the Andean region of Ecuador, during the gestation-lactation transition period, positively affects the metabolic profile and reproductive indicators.

mineral, ajustada a las condiciones de producción de la región andina del Ecuador, durante el período de transición gestación-lactancia, incide positivamente en los indicadores perfil metabólico y reproductivos.

#### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests among them

#### Author's contribution

Luis Rodrigo Balarezo-Urresta: Original idea, design and conducting the experiment, data analysis, manuscript writing

Ernesto Noval-Artiles: Conducting the experiment, data analysis, manuscript writing

Juan Ramón García Díaz: Conducting the experiment, data analysis, manuscript writing

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

#### Contribución de los autores

Luis Rodrigo Balarezo-Urresta: Idea original, diseño y conducción del experimento, análisis de datos y escritura del manuscrito

Ernesto Noval-Artiles: Conducción del experimento, análisis de datos y escritura del manuscrito

Juan Ramón García Díaz: Conducción del experimento, análisis de datos y escritura del manuscrito

### References

- Aardema, H., Helena, T.A. & Peter, L.A.M. 2019. "An overview on how cumulus cells interact with the oocyte in a condition with elevated NEFA levels in dairy cows". *Animal Reproduction Science*, 207: 131-137, ISSN: 0378-4320, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.003>.
- Arthington, J.D. & Brown, W.F. 2005. "Estimation of feeding value of four tropical forage species at two stages of maturity". *Journal of Animal Science*, 83(7): 1726-1731, ISSN: 1525-3163, DOI: <https://doi.org/10.2527/2005.8371726x>.
- Balarezo, L.R., García-Díaz, J.R., Hernández-Barreto, M.A. & García-López, R. 2016. "Metabolic and reproductive state of Holstein cattle in the Carchi region, Ecuador". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(3): 381-392, ISSN: 2079-3480.
- Balarezo, L.R., García-Díaz, J.R., Hernández-Barreto, M.A. & Vargas-Hernández, S. 2018. "Uterine Involution in Holstein cows in the province of Carchi, Ecuador". *Revista MVZ Córdoba*, 23(2): 6649-6659, ISSN: 0122-0268, DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1339>.
- Brito, R., Blanco, G.S., Calderón, R., Preval, B. & Campo, E. 2010. *Patología de la Reproducción Animal*. 2nd Ed. Ed. Félix Varela. La Habana, Cuba, pp. 1-41, ISBN: 978-959-07-1279-1.
- Carvalho, P.D., Souza, H.A., Amundson, C.M., Hackbart, M.J., Fuenzalida, J.M., Ayres, H.M., Dresch, R.A., Vieira, M.L., Guenther, J.N., Grummer, R.R., Fricke, M.P., Shaver, D.R. & Wiltbank, C.M. 2014. "Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows". *Journal of Dairy Science*, 97(6): 1-18, ISSN: 1525-3198, DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7809>.
- Castro, N., Kawashima, C., Van Dorland, H.A., Morel, I., Miyamoto, A. & Bruckmaier, R.M. 2012. "Metabolic and energy status during the dry period is crucial for the resumption of ovarian activity postpartum in dairy cows". *Journal of Dairy Science*, 95(10): 5804-5812, ISSN: 1525-3198, DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5666>.
- David, D.M., Campos, R., Apráez, J.E., Velez, M. & Zambrano, G.L. 2018. "Metabolic and reproductive response to energy supplementation in dairy cows in tropical highlands". *Revista de Ciencias Agrícolas*, 35(2): 51-63, ISSN: 2256-2273, DOI: <https://dx.doi.org/10.22267/rcia.183502.91>.
- Djokovic, R.D., Kurcubic, V.S. & Ilic, Z.Z. 2014. "Blood serum levels of macro-and micronutrients in transition and full lactations cows". *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(3): 715-720, ISSN: 1310-0351.
- Esposito, G., Irons, C.P. & Webb, C.E. 2014. "Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows". *Animal Reproduction Science*, 144(3-4): 60-71, ISSN: 0378-4320, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.007>.
- Evans, J.R. & Henshaw, K. 2008. "Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration. Review". *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1): CD000253, ISSN: 1469-493X, DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000253.pub2>.
- García, J.R., Cuesta, M., García-López, R., Quiñones, R., Figueredo, J.M., Faure, R., Pedroso, R. & Mollineda, A. 2010. "Characterization of the content of microelements in the soil-plant-animal system and its influence on cattle reproduction in the central region of Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(3): 227-231, ISSN: 2079-3480.
- García, J.R., Cuesta, M., Pedroso, R., Rodríguez, J., Gutiérrez, M., Mollineda, A., Figueredo, J.M. & Quiñones, R. 2007. "Suplementación parenteral de cobre en vacas gestantes: Efecto sobre postparto y terneros". *Revista MVZ Córdoba*, 12(2): 985-995, ISSN: 0122-0268, DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.419>.
- García, J.R., Cuesta, M., Silveira, E., Quiñones, R., Hernández, M. & Mollineda, A. 2011. "Desequilibrios metabólicos con especial referencia a las carenciales de minerales asociadas a problemas reproductivos en vacas lecheras de Cuba". *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 12(12): 1-12, ISSN: 1695-7504.
- García, J.R., Munyori, H., Cuesta, M., Quiñones, R., Figueredo, J.M., Noval, E. & Mollineda, A. 2012. "Therapeutic efficacy and pharmacological safety of parenteral supplementation of different concentrations of copper in cows". *Archiv Tierzucht*, 55(1): 25-35, ISSN: 2363-9822, DOI: <https://doi.org/10.5194/aab-55-25-2012>.
- García, J.R., Noval-Artiles, E., Pérez-Bello, A., Hernández-Barreto, M. & Pérez-González, Y. 2017. "Effects of copper parenteral

- supplementation on the weight gain in fattening bulls". *Revista MVZ Córdoba*, 22(2): 5820-5827, ISSN: 0122-0268, DOI: <http://dx.doi.org/10.21897/rmvz.1009>.
- Gebhard, S., Ronimus, R.S. & Morgan, H.W. 2001. "Inhibition of phosphofructokinases by copper (II)". *FEMS Microbiology Letters*, 197(1): 105-109, ISSN: 1574-6968, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10590.x>.
- Griffiths, L.M., Loeffler, S.H., Socha, M.T., Tomlinson, D.J. & Johnson, A.B. 2007. "Effects of supplementing complexed zinc, manganese, copper and cobalt on lactation and reproductive performance of intensively grazed lactating dairy cattle on the South Island of New Zealand". *Animal Feed Science and Technology*, 137(1-2): 69-83, ISSN: 0377-8401, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.10.006>.
- LeBlanc, S. 2010. "Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period". *Journal of Reproduction and Development*, 56(Suppl): S29-35, ISSN: 1348-4400, DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.1056s29>.
- Macrae, A. 2019. "Assessment of energy balance in dairy cattle". *Livestock*, 24(5): 229-235, ISSN: 2053-0870, DOI: <https://doi.org/10.12968/live.2019.24.5.229>.
- McDowell, L.R. & Arthington. 2005. *Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales*. 4th Ed. Ed. Universidad de La Florida. Departamento de Zootecnia, Universidad de la Florida. Gainesville, Florida, U.S.A., p. 91.
- Moyano, M.E., Rodríguez, C.E. 2014. "Suplementación energética y su efecto en el nivel de colesterol y el perfil hormonal preovulatorio en vacas". *Revista de Salud Animal*, 36(2): 90-96, ISSN: 0253-570X.
- Noval, E., García-Díaz, J.R., García-López, R. & Jiménez-Pérez, J. 2016. "Efecto de diferentes dosis de un compuesto inyectable de Cu, Zn y Mn en parámetros bioprodutivos de la vaca lechera". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(2): 371-380, ISSN: 2079-3480.
- NRC (National Research Council). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th Rev. Ed. Ed. The National Academies Press. Washington D.C., U.S.A, p. 381, ISBN: 978-0-309-06997-7, DOI: <https://doi.org/10.17226/9825>.
- Omur, A., Kirbas, A., Aksu, E., Kandemir, F., Dorman, E., Kaynar, O. & Ucar, O. 2016. "Effects of antioxidant vitamins (A, D, E) and trace elements (Cu, Mn, Se, Zn) on some metabolic and reproductive profiles in dairy cows during transition period". *Polish Journal of Veterinary Science*, 19(4): 697-706, ISSN: 1505-1773, DOI: <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0088>.
- Quintela, L.A., Díaz, C., Becerra, J.J., Alonso, G., Gracia, S. & Herradón, P.G. 2008. "Papel del  $\beta$ -caroteno y la vitamina A en la reproducción en el ganado vacuno: revisión". *ITEA, Información Técnica Económica Agraria*, 104(3): 399-410, ISSN: 1699-6887.
- Rodenburg, J. 2004. *Body Condition Scoring of Dairy Cattle*. OMAFRA Factsheet. [online] Order (92-122): 414-420. [Consulted 2010September 4].
- Shonewille, J.T. 2013. "Magnesium in dairy cow nutrition: an overview". *Plant and Soil*, 368: 167-178, ISSN: 1573-5036, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1665-5>.
- StatPoint Technologies. 2010. *Statgraphics Centurion User Manual*. Version 16.1 [Windows]. Statgraphics Technologies, Inc. The Plains, Virginia, U.S.A, Available: < <https://www.statgraphics.com/download-statgraphics-centurion-xvi>>.
- Walsh, R.B., Kelton, D.F., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Walton, J.S. & LeBlanc, S.J. 2007. "Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows". *Journal of Dairy Science*, 90(1): 315-324, ISSN: 1525-3198, DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72632-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72632-2).

**Received: January 15, 2021**

**Accepted: February 17, 2021**