

**VARIACIONES EN EL NIVEL PLASMATICO DE UREA,
PROTEINAS Y ACIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS EN
OVEJAS GESTANTES Y LACTANTES, RECIBIENDO
DIFERENTES NIVELES DE ENERGIA Y PROTEINA
DURANTE EL ULTIMO TERCIO DE LA GESTACION**

*Por J. S. González;
J. A. Guada y
F. J. Ovejero*

INTRODUCCION

La estimación de las necesidades energéticas y protéicas de los animales exige actualmente la utilización de técnicas costosas, como la realización de balances de nitrógeno y energía y el estudio de la composición corporal o bien la realización de pruebas prácticas de alimentación de larga duración, experimentos todos ellos de uso limitado.

La utilización de parámetros sanguíneos que definan el estado de nutrición protéica y energética de los animales, podría ser de gran utilidad en el estudio de sus necesidades nutritivas, dada la gran facilidad con que estos parámetros pueden ser analizados en el laboratorio.

Se ha demostrado la existencia de relaciones entre el nivel de ciertos metabolitos sanguíneos y la ingestión de energía y proteína en ovejas gestantes (REID y HINKS, 1962; RUSSEL y col., 1967; SYKES y FIELD, 1973; GALVEZ y ROMEVA, 1973) y vacas lactantes (FISHER y col., 1975; MORRIS y SWAN, 1976), habiéndose comprobado que los niveles plasmáticos de urea y de ácidos grasos no esterificados son indicadores válidos de la ingestión y utilización del nitrógeno (PRESTON y col., 1965; MCINTYRE, 1970; TORREL y col. 1974) y del grado de

* Los datos utilizados en este trabajo proceden de la memoria presentada por el primero de los autores para la obtención del grado de Doctor.

An. Fac. Vet. León, 1977, 23, 83-93.

subalimentación energética (RUSSEL y col., 1967-b; ROBINSON y col., 1971; GUADA y col., 1975), respectivamente.

Sin embargo, el nivel plasmático de estos metabolitos puede verse afectado por diversos factores, cuya identificación no se encuentra siempre bien definida (BOWDEN, 1971; HEANEY y LODGE, 1975). En el presente trabajo se estudia la influencia de la ingestión de energía y proteína sobre el nivel plasmático de urea, proteínas y ácidos grasos no esterificados, en ovejas gestantes y lactantes, con objeto de obtener la información básica que nos permita comprobar su utilidad como indicadores del grado de subalimentación en el ganado ovino.

MATERIAL Y METODOS

Un total de 72 ovejas de raza Churra, con edades comprendidas entre los 2,5 y 6 años, fueron cubiertas, después de haber procedido a la sincronización del celo mediante la inyección de progestágenos sintéticos. A los 75 días de la cubrición se distribuyeron en 6 grupos experimentales homogéneos y se alojaron en jaulas individuales.

Durante el período de gestación estudiado las ovejas fueron alimentadas con raciones conteniendo: paja de lentejas (40 %), y una mezcla de concentrados (60 %) preparada fundamentalmente a base de cebada y soja en proporciones adecuadas para aportar 3,0, 4,5 y 6,0 g de proteína bruta digestible /kg PV^{0,75} (tratamientos P₁, P₂ y P₃). Cada ración fue administrada a dos niveles de ingestión, 52 y 60 g de materia seca /Kg PV^{0,75} (tratamientos E₁ y E₂).

Durante los dos primeros meses de la lactación subsiguiente todas las ovejas recibieron 88 g de materia seca /Kg PV^{0,75} de una ración con la misma relación forraje: concentrado que las utilizadas en la gestación, pero con un 18 % de proteína bruta en la materia seca.

La digestibilidad de todas las raciones fue estudiada mediante pruebas de balance realizadas, durante la gestación y la lactación, en 6 ovejas por tratamiento, cuyos resultados se describen en publicación aparte (GONZÁLEZ y col., 1978).

Una vez por semana, durante todo el período de gestación y lactación estudiados, se tomaron muestras de sangre en todas las ovejas por punción en la vena yugular. La sangre fue recogida en tubos heparinizados y seguidamente centrifugada a 1.500 x G. El plasma obtenido fue analizado para conocer su contenido en urea, proteínas y ácidos grasos no esterificados (AGNE).

El contenido de urea en plasma se determinó de acuerdo con la técnica descrita por COULOMBE y FAVREAU (1963), después de obtener un filtrado libre de proteínas según el procedimiento descrito por FOLIN y WU (1919). El contenido de proteínas mediante el método de GORNALL y col. (1949) y la concentración de AGNE siguiendo la técnica descrita por ITAYA y UI (1965).

TABLA 1
Número de animales, peso inicial e ingestión diaria de nutrientes durante los últimos 75 días de la gestación y las cuatro primeras semanas de la lactación

	GESTACION						RSD ⁻	Lactación	RSD ⁻			
	E ₁			E ₂								
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₁	P ₂	P ₃						
N.^o de ovejas												
Peso inicial (Kg)*	11	11	9	10	11	11	5,78	63	6,15			
Ingestión diaria (g /kg ^{0,75})	44,9	46,2	47,5	45,9	47,7	47,7	44,5					
Materia orgánica digestible	33,0	35,1	36,0	36,5	41,0	40,9	0,98	57,2	1,30			
Proteína bruta	5,0	6,7	8,5	5,2	7,2	8,8	0,17	16,2	0,37			
Proteína aparentemente digestible	2,7	4,4	6,4	2,7	4,5	6,2	0,11	12,3	0,28			

- Desviación standard residual.

* Media de los pesos correspondientes a los 75 y 76 días de la gestación y al 2.^o y 3.^o días postpartum en la lactación.

TABLA 2
Nivel medio de urea, ácidos grasos no esterificados y proteínas en el plasma durante los últimos 60 días de la gestación y las cuatro primeras semanas de la lactación

Tratamientos durante la gestación	GESTACION						RSD ⁻	Lactación	RSD ⁻			
	E ₁			E ₂								
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₁	P ₂	P ₃						
GESTACION												
Urea (mg /100 ml)	16,6	30,0	38,1	15,6	25,9	31,6	5,79	*	***			
Acidos grasos (meq /l)	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,08	**	NS			
Proteínas (g /l)	6,5	7,0	6,9	6,6	7,1	6,9	0,36	NS	***			
LACTACION												
Urea (mg /100 ml)	55,7	57,2	56,0	51,8	55,0	53,1	8,62	NS	NS			
Acidos grasos (meq /l)	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,01	NS	NS			
Proteínas (g /l)	7,3	7,2	7,0	7,0	7,2	7,1	0,30	NS	NS			

Desviación standard residual (P<0,05) (P<0,01) (P<0,001)

NS (P>0,05) (P>0,01) (P>0,001)

RESULTADOS

El número de ovejas que finalizaron el experimento, junto con su peso inicial y los valores medios de ingestión durante todo el período experimental figuran en la tabla 1.

En total, 8 ovejas tuvieron que ser retiradas del experimento, 4 de ellas por no estar gestantes, otras 4 por sufrir abortos al final de la gestación y una última debido a que rehusó ingerir la ración correspondiente. En el resto de las ovejas, el consumo fue en general satisfactorio y los niveles de ingestión logrados fueron los esperados, excepto en los tratamientos con un nivel más bajo de proteína (E_1P_1 y E_2P_1) en los que la ingestión de materia orgánica digestible fue ligeramente menor.

El contenido medio de urea, AGNE y proteínas en el plasma, durante las ocho últimas semanas de la gestación, figura para cada uno de los tratamientos experimentales en la tabla 2.

El efecto de la ingestión de energía y de proteína sobre el nivel medio de urea, AGNE y proteínas en el plasma de cada una de las ocho últimas semanas de la gestación, se ilustra en las figuras 1 y 2 respectivamente, y los valores correspondientes a cada una de las cuatro primeras semanas de la lactación se representan en la figura 3.

El nivel plasmático de urea, durante la gestación tuvo un valor medio de 26 mg/100 ml, aunque varió ampliamente con la ingestión de proteína, aumentando desde 16 a 35 mg/100 ml. En todos los niveles de proteína la concentración de urea en plasma disminuyó aproximadamente en un 15 %, al aumentar la ingestión de energía. Ambos efectos fueron estadísticamente significativos y constantes durante la mayor parte del período de gestación estudiado, excepto en las semanas 18 y 19 en las que la concentración de urea fue similar en los dos niveles de energía (fig. 1). En ningún caso fue significativa la interacción energía x proteína.

Independientemente del efecto de los tratamientos, el nivel plasmático disminuyó en todos los casos en las primeras semanas del experimento ($P<0,001$), para mantenerse después relativamente constante hasta el final de la gestación, como puede apreciarse en las figuras 1 y 2.

Durante las primeras semanas de la lactación, el nivel de urea aumentó ($P<0,001$), como respuesta a un incremento en la ingestión de proteína bruta de un 135 %, hasta aproximadamente duplicar el valor medio correspondiente al período de gestación.

El contenido medio de AGNE en el plasma durante la gestación, fue semejante para los tres niveles de proteína, pero aumentó desde 0,30 a 0,37 meq/l ($P<0,01$) al disminuir la ingestión de energía.

El nivel de energía administrado durante la gestación, no tuvo ningún efecto significativo sobre la concentración de AGNE en el plasma durante la lactación.

Por otra parte, el contenido plasmático de AGNE aumentó linealmente durante las ocho últimas semanas de la gestación ($P<0,001$), desde un valor medio de 0,2 hasta cerca de 0,5 meq/l. al final de la gestación (figuras 1 y 2). Durante las tres primeras semanas, el nivel de AGNE no varió con la ingestión de energía, pero, a partir de la semana 15, se mantuvo constantemente superior en el nivel bajo de ingestión.

Después del parto, la concentración de AGNE en el plasma disminuyó hasta alcanzar un nivel igual al observado en la semana 13 de la gestación, 0,2

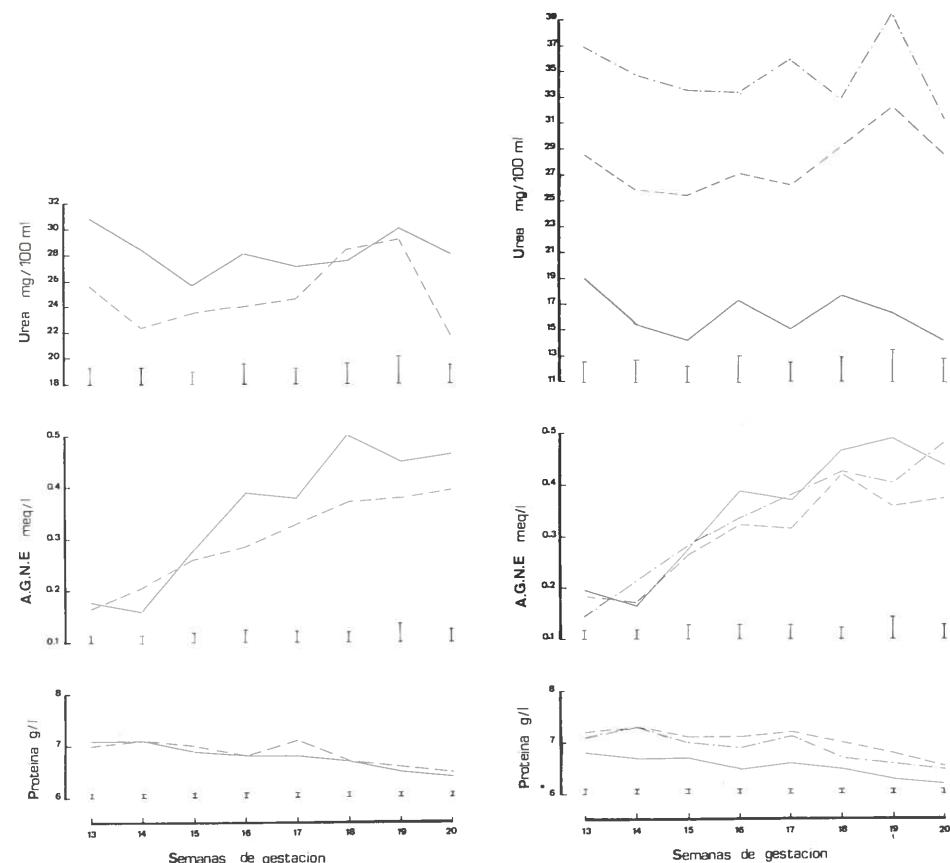


Figura 1.—Efecto de la ingestión de energía sobre el nivel plasmático de urea, ácidos grasos no esterificados (AGNE) y proteínas durante cada una de las 8 últimas semanas de la gestación. I, error standard de la media.

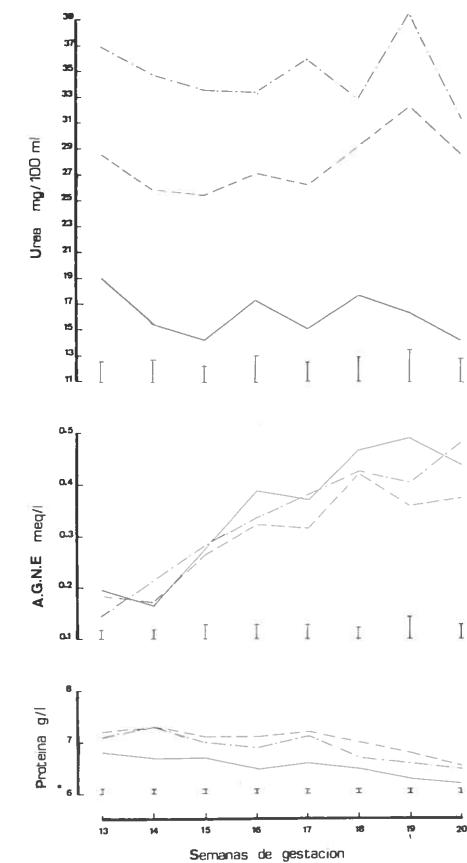


Figura 2.—Efecto de la ingestión de proteína sobre el nivel plasmático de urea, ácidos grasos no esterificados (AGNE) y proteínas durante cada una de las 8 semanas de la gestación. I, error standard de la media.

meq /l, que se mantuvo constante durante el período de la gestación estudiado (figura 3).

El contenido en proteínas plasmáticas tuvo un valor medio en todo el experimento de 7,0 g /l, excepto en el tratamiento con menor ingestión de proteína durante la gestación, en que disminuyó hasta un valor de 6,5 g /l, siendo estas diferencias altamente significativas.

El nivel de proteínas plasmáticas disminuyó significativamente y de forma constante a lo largo de las ocho últimas semanas de la gestación ($P<0,001$). Sin embargo, en todos los casos, fue un 10 % menor ($P<0,001$) en el trata-

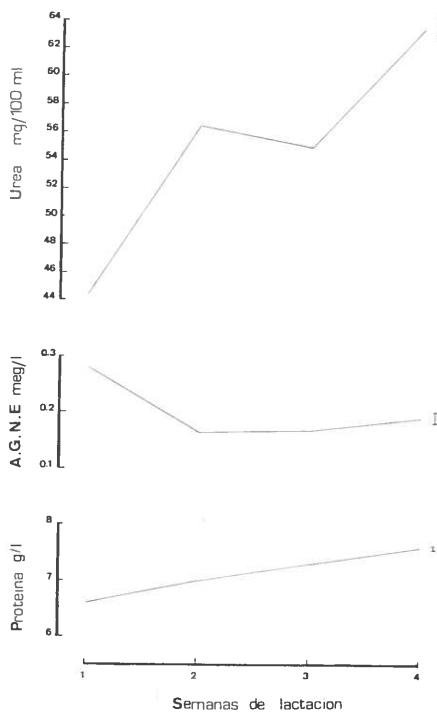


Figura 3.—Nivel plasmático de urea, ácidos grasos no esterificados (AGNE) y proteínas durante cada una de las 4 primeras semanas de la lactación. I, error standard de la media.

miento P_1 . Durante la lactación, aumentó regularmente hasta alcanzar en la cuarta semana valores similares a los del comienzo del experimento.

DISCUSION

La disminución en el contenido de urea en el plasma durante la gestación en el nivel alto de energía, coincide con un aumento en la retención de nitrógeno en este nivel de ingestión (GONZÁLEZ y col, 1978) y supone una mejor utilización de la proteína ingerida (BALCH, 1967). Esta mejor utilización pudo ser debida, en parte, a una mayor síntesis de proteína microbiana, como consecuencia de un aumento en la cantidad de substrato fermentable (HUN-

GATE, 1966; PURSER, 1970; ORSKOV, 1977). Por otra parte, el aumento en la cantidad de nutrientes que pasa el rumen sin ser degradados al elevarse el plano de ingestión (ORSKOV, 1977), contribuye a que una mayor cantidad de proteína y de carbohidratos de la dieta pueda ser absorbida directamente en el intestino delgado, aunque, probablemente, las proteínas muy solubles sean degradadas en el rumen independientemente del nivel de alimentación (MILLER, 1973). De todas formas, un aumento en la disponibilidad de glucosa, como consecuencia de una mayor absorción de carbohidratos en el intestino delgado, puede también contribuir a una mejor utilización de los aminoácidos absorbidos (HEARD, 1964; NAKANO y ASHIDA, 1975; TAO y ASPLUND, 1975).

La ingestión de proteína tuvo un marcado efecto sobre el nivel plasmático de urea a lo largo de toda la gestación. La existencia de una estrecha relación entre la concentración de urea en el plasma y la ingestión de proteína ha sido observada por numerosos autores, tanto en ovejas gestantes (SYKES y FIELD, 1973), como no gestantes (PRESTON y col, 1965; MCINTYRE, 1970; EGAN y KELLAWAY, 1971; EGAN, 1972).

En nuestro caso, la concentración media de urea en el plasma estuvo relacionada con la ingestión de proteína y energía que explicaron un 60 % de la variación existente. La consideración de un término cuadrático correspondiente a la ingestión de proteína redujo la variación residual en un 6 % adicional ($P<0,05$). La ecuación que definió esta relación fue:

$$Y = 6,301X_1 - 0,101X_1^2 - 0,066X_2 - 12,81 \\ (\pm 1,402) \quad (\pm 0,035) \quad (\pm 0,014)$$

en la que Y es la concentración de urea (mg /100 ml), X_1 la ingestión de nitrógeno (g /día) y X_2 la ingestión de materia orgánica digestible (g /día). El coeficiente de correlación múltiple fue 0,81 y la desviación standard residual 6,49.

PRESTON y col (1965) también han observado la existencia de relaciones no lineales entre el nivel plasmático de urea y la ingestión de proteína, y MCINTYRE (1970) encontró un aumento lineal en la concentración de nitrógeno uréico hasta un valor de 30 mg /100 ml con una ingestión de aproximadamente 25 gramos de nitrógeno, a partir del cual no hubo respuesta a incrementos en la ingestión.

En este experimento y de acuerdo con la anterior ecuación, la concentración máxima de urea se alcanza con una ingestión de 31,2 g de nitrógeno y supone un contenido de 45 y 40 mg /100 ml para los niveles bajo y alto de energía respectivamente. Sin embargo, durante la lactación subsiguiente, cuando los animales recibieron una ingestión de 44,6 g de nitrógeno, el nivel de urea en plasma ascendió hasta un valor medio de 55 mg /100 ml.

Estos resultados están de acuerdo con los de NOLAN y LENG (1970), que sugieren una mayor reutilización de la urea en el tracto digestivo durante la

gestación y con las observaciones de ROBINSON y col (1973) sobre una menor excreción urinaria de nitrógeno urélico en ovejas gestantes que en las no gestantes.

De todas formas, la variación que tiene lugar en el volumen plasmático como consecuencia de la gestación (SYKES y FIELD, 1973; MACKIE, 1977) hace difícil la interpretación de los cambios en los niveles plasmáticos de urea.

El contenido medio de AGNE en el plasma fue significativamente mayor en el grupo de ovejas que recibió un nivel bajo de ingestión durante la gestación, lo que parece indicar la utilidad del nivel plasmático de AGNE como índice del grado de subalimentación en ovejas gestantes, como ha sido sugerido por REID y HINKS (1962) y RUSSEL y col (1967). Estos resultados también coinciden con los de DAVIES y col (1971) y ROBINSON y col (1971) que han encontrado un efecto de la ingestión de energía sobre el nivel de AGNE en el plasma de ovejas en gestación.

Sin embargo, los resultados de SYKES y FIELD (1972) y de HEANEY y LODGE (1975), que han observado niveles altos de AGNE en el plasma de ovejas gestantes alimentadas «ad libitum», parecen sugerir la existencia de un aumento fisiológico en el nivel de AGNE durante la gestación.

El hecho de que la concentración de AGNE en el grupo de ovejas que recibieron un plano de ingestión alto y que tuvieron una ganancia neta de peso de 0,5 kg de media durante los últimos 60 días de la gestación, experimentase un incremento durante este período (figura 1) parece apoyar la hipótesis de que un aumento en el nivel de AGNE durante las últimas fases de la gestación, es indicador de una movilización fisiológica de grasa, más bien que de una ingestión de energía inadecuada (SYKES y FIELD, 1972; HEANEY y LODGE, 1975). Sin embargo, el hecho de que el nivel de AGNE experimentase un incremento mayor en el grupo de ovejas que recibieron un nivel de ingestión bajo y sufrieron pérdidas netas de peso, parece indicar que, aun suponiendo la existencia de un aumento fisiológico como consecuencia de la propia gestación, existe una relación entre el grado de subalimentación y el nivel plasmático de AGNE.

REID y HINKS (1962) han obtenido una relación entre el peso de los corderos al nacimiento y el nivel medio de AGNE, en ovejas mantenidas con una ingestión constante durante el último tercio de la gestación y ROBINSON y col (1971) relacionaron el nivel de AGNE con el peso de los corderos y la ingestión de MOD en la gestación. Sin embargo, en el presente experimento la concentración plasmática de AGNE y el peso de los corderos al nacimiento no estuvieron correlacionados, mientras que sí existió una correlación significativa ($r = 0,27$ $P < 0,05$) entre la concentración de AGNE y el cambio neto de peso.

Durante la lactación, el contenido de AGNE en el plasma se mantuvo en niveles considerados como normales para una oveja bien alimentada, lo cual

era de esperar si tenemos en cuenta que en todos los grupos existieron ganancias de peso apreciables.

Por último, el nivel de proteínas plasmáticas disminuyó en todos los tratamientos a lo largo de los últimos 60 días de la gestación. Esta disminución parece ser totalmente explicable por los cambios en el volumen de plasma durante este período de la gestación, que suponen un aumento de un 10 % entre los 105 y 144 días (MACKIE, 1977).

Independientemente de estos cambios debidos a una mayor dilución, la concentración de proteínas plasmáticas fue constantemente inferior a lo largo de toda la gestación (figura 2) en aquellas ovejas que recibieron el nivel más bajo de proteína, lo que confirma la existencia de una subalimentación protéica en este nivel de ingestión, como había sido puesto de manifiesto por los resultados procedentes de los balances de nitrógeno (GONZÁLEZ y col, 1978).

Esta variación en el contenido de proteínas en el plasma concuerda con los resultados de SYKES y FIELD (1973), quienes también observaron una disminución durante las dos últimas semanas de la gestación con niveles de ingestión similares a los nuestros e indica su posible valor como índice de subalimentación protéica en animales gestantes.

RESUMEN

Setenta y tres ovejas Churras recibieron durante la segunda mitad de la gestación raciones con una relación forraje: concentrado de 40 : 60, administradas a dos niveles de ingestión de energía equivalentes a 34,7 y 39,6 g de materia orgánica digestible (MOD) /kg PV^{0,75}, aportando a cada nivel 2,7, 4,5 y 6,3 g de proteína aparentemente digestible /Kg PV^{0,75}. Durante los dos primeros meses de la subsiguiente lactación, todos los animales recibieron una ración con un 18 % de proteína a un nivel único de ingestión de 57,2 g de MOD /Kg PV^{0,75}.

Se determinó el contenido plasmático de urea, proteínas y ácidos grasos no esterificados (AGNE), en muestras de sangre obtenidas semanalmente.

El nivel de urea en plasma durante la gestación, disminuyó al aumentar la ingestión de energía y aumentó de forma no lineal con la ingestión de proteína, alcanzándose la concentración máxima de urea, 45 y 40 mg /100 ml, para los dos niveles de energía empleados, con una ingestión de 31,2 g de nitrógeno/día. Durante la lactación, el nivel de urea aumentó hasta un valor medio de 55 mg /100 ml.

El nivel medio de AGNE no se vio afectado por la ingestión de proteína, pero disminuyó al aumentar la de energía y aumentó gradualmente durante la gestación, desde un valor medio de 0,17 a 0,40, incluso en el nivel alto de energía en el que los animales experimentaron ganancias netas de peso. Durante la lactación el nivel de AGNE disminuyó hasta alcanzar un valor medio de 0,20 meq /l.

El contenido en proteínas plasmáticas fue menor en el nivel más bajo de proteína y disminuyó un 10 % a lo largo de la gestación, para aumentar en la misma medida durante la lactación.

SUMMARY

Sixty three Churra ewes were fed during the second half of the pregnancy, 34.7 and 39.6 g of digestible organic matter (DOM) /kg W^{0.75} and 2.7, 4.5 and 6.3 g of apparently digestible protein /kg W^{0.75} at each level of energy, of a diet with a roughage to concentrate ratio of 40 : 60. During the two first months of the subsequent lactation, all the ewes were fed 52.7 g of DOM /kg W^{0.75} of a diet with a protein content of 18 % in the dry matter.

The plasma concentration of urea, proteins and non esterified fatty acids (NEFA), were determined in blood samples taken at weekly intervals throughout the experiment.

In late pregnancy, plasma urea concentration increased curvilinearly with the crude protein intake, but decreased at the high energy intake within all the protein levels. The maximum plasma urea concentration, 45 and 40 mg /100 ml at each energy level, was reached at a nitrogen intake of 31.2 g /day. During lactation, the plasma urea concentration increased to an average value of 55 mg /100 ml.

The plasma NEFA concentration was not affected by protein intake, being lower at the high energy intake and increased progressively during late gestation from a mean value of 0.17 to 0.40 meq /l. even at high energy level, that allowed a net gain of weight. During the subsequent lactation NEFA concentration decreased to a mean value of 0.20 meq /l.

The plasma proteins concentration decreased at the lowest protein intake and declined by 10 % throughout late pregnancy.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a don A. Gómez su colaboración en el manejo de los animales y toma de muestras, y al personal del laboratorio de Nutrición Animal de la Estación Agrícola Experimental de León, doña R. Díez y don A. Herranz, la realización de los análisis químicos de las muestras.

BIBLIOGRAFIA

- BALCH, C. C. (1967).—Problems in predicting the value of non-protein nitrogen as a substitute for proteins in rations for farm animal ruminants. *World Rev. Anim. Prod.*, **3**, 84-91.
- BOWDEN, D. M. (1971).—Non-esterified fatty acids and ketone bodies in blood as indicators of nutritional status in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.*, **51**, 1-14.
- COULOMBE, J. J. y FAVREAU, L. (1963).—A new simple semi-micro method for colorimetric determination of urea. *Clin. Chem.*, **9**, 102-108.
- DAVIES, P. J., JOHNSTON, R. G. y ROSS, D. B. (1971).—The influence of energy intake on plasma levels of glucose, non-esterified fatty acids and acetone in the pregnant ewe. *J. Agric. Sci., Camb.*, **77**, 261-265.
- EGAN, A. R. y KELLAWAY, R. C. (1971).—Evaluation of nitrogen metabolites as indices of nitrogen utilization in sheep given frozen and dry nature herbages. *Br. J. Nutr.*, **26**, 335-351.
- EGAN, A. R. (1972).—Plasma and urinary metabolites as indices of N utilization in sheep. *Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod.*, **32**, 87-95.
- FISHER, L. J., DONNELLY, P. E., HUTTON, J. B. y DUGANZICH, D. M. (1975).—Relationships between levels of feeding and certain metabolites in dairy cows in mid lactation. *J. Agric. Sci., Camb.*, **84**, 29-37.
- FOLIN, O. y WU, H. (1919).—A system of blood analysis. *J. Biol. Chem.*, **38**, 81-110.
- GÁLVEZ, J. F. y ROMEVA, J. (1973).—Necesidades energéticas de la oveja Manchega durante la gestación. *Anales I.N.I.A. Prod. Anim.*, **4**, 67-77.
- GONZÁLEZ, J. S., GUADA, J. A. y OVEJERO, F. J. (1978).—Efecto de la ingestión de proteína y energía sobre la retención de nitrógeno en la oveja Churra gestante. *Zootechnia* (En prensa).
- GORNALL, A. G., GARDWILL, C. J. y DAVID, M. M. (1949).—Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **117**, 751-766.
- GUADA, J. A., ROBINSON, J. J. y FRASER, C. (1975).—The effect of dietary energy concentration on protein utilization during late pregnancy in ewes. *J. Agric. Sci., Camb.*, **85**, 175-183.
- HEANEY, D. P. y LODGE, G. A. (1975).—Body composition an energy metabolism during late pregnancy in the ad-libitum fed ewe. *Can. J. Anim. Sci.*, **55**, 545-555.
- HEARD, C. R. C. (1964).—Carbohydrates and proteins. *Proc. Nutr. Soc.*, **23** 110-119.
- HUNGATE, R. D. (1966).—The rumen and its microbes. Academic Press. London.
- ITAYA, K. y UI, M. (1965).—Colorimetric determination of free fatty acids in biological fluids. *J. Lipid Res.*, **6**, 16-20.
- MACKIE, W. S. (1977).—Changes in concentration of plasma proteins in intensively bred ewes. *J. Agric. Sci. Camb.*, **88**, 283-288.
- MCINTYRE, K. H. (1970).—The effects of increased nitrogen intakes on plasma urea nitrogen and rumen ammonia levels in sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, **21**, 501-507.
- MILLER, E. L. (1973).—Evaluation of foods as sources of nitrogen and aminoacids. *Proc. Nutr. Soc.*, **32**, 79-84.
- MORRIS, M. L. y SWAN, H. (1976).—Urea, glucose and free fatty acids in blood as predictors of milk yield of lactating dairy cows. *Anim. Prod.*, **22**, 158. Abs.
- NAKANO, K. y ASHIDA, K. (1975).—Possible intervention of insulin, cyclic AMP and glucocorticoids in protein-sparing action of dietary carbohydrates in rats. *J. Nutrition*, **105**, 906-913.
- NOLAN, J. V. y LENG, R. A. (1970).—Metabolism of urea in late pregnancy and the possible contribution of amino acid carbon to glucose synthesis in sheep. *Br. J. Nutr.*, **24**, 905-915.
- ORSKOV, E. R. (1977).—Nitrogen digestion and utilization by young and lactating ruminants. *World Rev. Nutr. Diet.*, **26**, 225-257.
- PRESTON, R. L., SCHNAKENBERG, D. D. y PFANDER, W. H. (1965).—Protein utilization in ruminants. I. Blood urea nitrogen as affected by protein intake. *J. Nutrition*, **86**, 281-288.
- PURSER, D. B. (1970).—Nitrogen metabolism in the rumen: Microorganism as a source of protein for the ruminant animal. *J. Anim. Sci.*, **30**, 988-1.001.
- REID, R. L. y HINKS, N. T. (1962).—Studies on the carbohydrate metabolism of sheep. XVIII The metabolism of glucose, free fatty acids, ketones and amino acids in late pregnancy and lactation. *Aust. J. Agric. Res.*, **13**, 1.112-1.123.
- ROBINSON, J. J., FRASER, C. y BENNETT, C. (1971).—An assessment of the energy requirements of the pregnant ewe using plasma free fatty acid concentrations. *J. Agric. Sci. Camb.*, **77**, 141-145.
- ROBINSON, J. J., SCOTT, D. y FRASER, C. (1973).—Observations on the effect of protein intake and stage of gestation on the proportion of urinary nitrogen excreted as urea in sheep. *J. Agric. Sci. Camb.*, **80**, 363-368.
- RUSSEL, A. J. F., DONEY, J. M. y REID, R. L. (1967).—The use of biochemical parameters in controlling nutritional state in pregnant ewes and the effect of undernourishment during pregnancy on lamb birth weight. *J. Agric. Sci. Camb.*, **68**, 351-358.
- SYKES, A. R. y FIELD, A. C. (1972).—Effects of dietary deficiencies of energy, protein and calcium of the pregnant ewe. III. Some observations on the use of biochemical parameters in controlling energy undernutrition during pregnancy and of the efficiency of utilization of energy and protein for foetal growth. *J. Agric. Sci. Camb.*, **78**, 127-133.
- SYKES, A. R. y FIELD, A. C. (1973).—Effect of dietary deficiencies of energy, protein and calcium on the pregnant ewe. IV. Serum total protein, albumin, globulin, transferrin and plasma urea levels. *J. Agric. Sci. Camb.*, **80**, 29-36.
- TAO, R. C. y ASPLUND, J. M. (1975).—Effect of energy sources on plasma insulin and nitrogen metabolism in sheep totally nourished by infusions. *J. Anim. Sci.*, **41**, 1.653-1.659.
- TORELL, D. T., HUME, I. D. y WEIR, W. C. (1974).—Factors affecting blood urea nitrogen and its use as an index of the nutritional status of sheep. *J. Anim. Sci.*, **39**, 435-440.