



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

División de Estudios de Posgrado

**Maestría en Desarrollo Tecnológico en
Sistemas de Producción Animal**

**REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA POSPARTO,
CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA Y METABOLITOS
DE LÍPIDOS EN VACAS LECHERAS SUPLEMENTADAS
CON ACEITE VEGETAL**

TESIS DE MAESTRÍA

Que Presenta:

M.V.Z. ALEJANDRA MINERVA MARÍN AGUILAR

Para Obtener el Grado de Maestro en Ciencias

ASESORES:

Dr. José Herrera Camacho

MC. Antonio García Valladares

MORELIA, MICH., FEBRERO DEL 2006

RESUMEN

El presente trabajo de investigación constó de dos experimentos, en el experimento I (EXP I) se evaluaron los cambios de condición corporal, de peso vivo y concentración de NEFAs, cuatro semanas previas con respecto a las cuatro semanas posteriores al parto; se utilizaron 12 vacas de la raza Holstein con un peso promedio (613.0 ± 9.1 Kg de p.v. y una condición corporal de 3.5 ± 0.1) en el experimento II, el objetivo fue determinar el reinicio de la actividad ovárica posparto, metabolitos de lípidos y concentración de progesterona (P_4) plasmática en vacas lecheras suplementadas con aceite vegetal. Se utilizaron 18 vacas de la raza Holstein (529.1 ± 103 Kg de p.v. y una condición corporal al parto de $3.5 \pm .4$) distribuidas en un grupo control (SG) al que no se le suplemento con aceite vegetal ($n=9$) y un grupo experimental (CG) al que se le adicionaban 500 gr por día (250 gr en la mañana y 250 gr en la tarde) de aceite de maíz ($n=9$). Se determinó la concentración sanguínea de colesterol, lipoproteínas de alta y baja densidad, triglicéridos, lípidos totales y P_4 durante ocho semanas posparto. Mientras que la concentración sanguínea de NEFAs fue durante 4 semanas preparto y 4 semanas posparto. para este experimento se utilizaron 12 vacas de la raza holstein en buen estado de salud y no recibieron ningún tratamiento,. En lo referente a las concentraciones de NEFAs, estas fueron de 0.763 ± 0.4 Mmol/l y en el posparto de 0.864 ± 0.3 Mmol/l. El reinicio de actividad ovárica posparto (RAO) fue considerado como tiempo posparto en el cual las vacas presentaron concentraciones de progesterona >1 ng/ml durante dos semanas consecutivas. La concentración de P_4 durante el periodo de estudio (8 semanas) fue determinada por RIA, en muestras sanguíneas colectadas semanalmente. El RAO no fue diferente ($P>0.05$) entre ambos tratamientos, no obstante haber observado una reducción de siete días en el grupo CG que en el SG (23.3 ± 12.8 vs 29.6 ± 12.4 días, respectivamente). La concentración media ($\pm ee$) de P_4 durante el periodo de estudio fue similar entre tratamientos observando 1.48 ± 0.31 vs 1.15 ± 0.31 ng/ml en el SG vs CG. En la concentración de P_4 , no se encontraron diferencias ($P>0.05$) en los días 7, 14 y 21 de suplementación, pero si se encontró un efecto sobre los días 28, 35, 42, 49 y 56, donde la concentración hormonal fue superior ($P<0.01$) en el SG respecto al grupo CG. Respecto a la concentración media de colesterol se observa una diferencia significativa ($P<0.05$) entre el grupo con suplementación grasa (135.7 ± 9.9 mg/dl) y el grupo sin suplementación (109.3 ± 9.9 mg/dl); mientras que la concentración media ($\pm ee$) de las lipoproteínas de alta densidad fue de 116.5 ± 27.7 mg/dl para el grupo con suplementación vs 120.9 ± 27.7 mg/dl para el grupo que no fue suplementado; no encontrándose diferencias significativas ($P>0.05$) entre ambos tratamientos. Algo similar ocurrió con la concentración media ($\pm ee$) de las lipoproteínas de baja densidad en el caso de las vacas a las cuales se les suplemento con aceite de maíz, fue de 143.5 ± 12.8 mg/dl y para las vacas sin suplementación grasa fue de 134.3 ± 12.8 mg/dl; donde no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre ambos grupos. Para los lípidos totales La concentración media ($\pm ee$) fue de 434.2 ± 50.3 para el grupo con suplementación grasa, mientras que para el grupo que no recibió suplementación fue 366.2 ± 50.3 , encontrando diferencias significativas ($P<0.05$); entre tratamientos en las semanas 3, 4, 5, 6, 7 y 8, siendo mayor en el grupo de vacas que recibieron suplementación con aceite vegetal comparada con las

que no recibieron suplementación; y finalmente en la concentración media de triglicéridos no se observaron diferencias significativas ($P > .05$) entre el grupo SG y el grupo CG, siendo la media ($\pm ee$) de 41.3 ± 7.9 mg/dl y 29.3 ± 7.9 mg/dl respectivamente. En base a estos resultados, se concluye que la suplementación con aceite vegetal incrementa la concentración de algunos metabolitos de lípidos, necesarios para la síntesis de P_4 ; sin embargo, la concentración de dicha hormona no presentó diferencias significativas, lo cual puede ser un indicador de que pueden existir factores adicionales involucrados, como condición corporal y balance energético entre otros.

Palabras clave: metabolitos de lípidos, ácidos grasos no esterificados, lípidos, reinicio de actividad ovárica posparto.

I INTRODUCCIÓN

Desde los años 1920-1930, se ha observado que la nutrición tiene efecto sobre la función reproductiva en los rumiantes; en relación a ello, se han desarrollado diversas investigaciones encaminadas a identificar los mecanismos fisiológicos a través de los cuales la nutrición influye sobre la actividad reproductiva, siendo los más sobresalientes los mencionados por (Randel, 1990; Dunn y Moss, 1992; Robinson, 1996; Boland *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2002) y que hacen referencia a que la restricción en el consumo de cualquier nutriente puede afectar la eficiencia reproductiva.

La reproducción es el mayor componente de la eficiencia reproductiva para un sistema lechero, y una de las principales causas que afectan la eficiencia reproductiva es el intervalo entre partos, cuando es directamente influenciado por el anestro posparto. La duración del anestro posparto es principalmente afectado por el estado nutricional y el amamantamiento (Short y Adams, 1988; Randel, 1990). Una nutrición adecuada es esencial para recuperar la actividad ovárica posparto en vacas (Robinson, 1990). Cuando el consumo de nutrientes es inadecuado y las reservas de energía corporal son reducidas, el intervalo parto-primer estro es extendido; de este modo, para establecer la relación entre nutrición y eficiencia reproductiva, será necesario estimar el estado nutricional de las vacas y evaluar la condición corporal durante el período del preparto y posparto (Wettemann, 1994; Butler y Elrod, 1995).

La relativa importancia de la nutrición durante el período posparto no ha sido claramente establecida; sin embargo, la condición corporal es el mayor regulador del metabolismo que permite tener una clara idea de las reservas energéticas en las vacas para poder determinar la amplitud del intervalo parto a primera ovulación (Westwood *et al.*, 2000); así, la manipulación en las dietas, permite influir sobre algunas de las expresiones metabólicas, tales como: colesterol, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de alta densidad y triglicéridos; lo cual es un factor importante en la regulación de la función reproductiva (Cunningham *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2002).

De acuerdo a lo planteado, surge la hipótesis de que la suplementación con aceite vegetal en las vacas lecheras puede servir como una estrategia que permite mejorar el comportamiento reproductivo. Sin embargo se han realizado trabajos donde utilizan una variedad de grasas que en ocasiones son incosteables. Por tal motivo, el problema a resolver, es conocer la respuesta a la suplementación con aceite de maíz en una proporción de 500 g por día para disminuir los días al reinicio de actividad ovárica posparto.

II REVISIÓN DE LITERATURA

El reinicio de la actividad ovárica posparto, corresponde al número de días abiertos, es decir, días promedio entre el último parto y la fecha del servicio fértil; siendo el indicador más importante de la función reproductiva, y la meta razonable es que cada una de las hembras no exceda de 90 días abiertos, para poder lograr un parto por vaca por año (Espinoza, 1995).

El periodo posparto se define como el tiempo entre el parto y el restablecimiento de la actividad ovárica cíclica y ciclos estrales regulares. Durante este periodo, las hembras bovinas presentan una capacidad limitada para quedar gestantes; la duración de este período depende de la involución uterina, el anestro posparto y los cuerpos lúteos de corta duración (Pérez-Hernández *et al.*, 2001).

Dentro de los eventos fisiológicos que tienen mayor relevancia en la eficiencia biológica y económica del ganado bovino productor de leche, es la reproducción, y dentro de ella, el anestro posparto, representa el principal factor que afecta a dicha eficiencia (Edgerton, 1980).

2.1 Nutrientes que afectan la reproducción

Los nutrientes, considerados componentes básicos de los alimentos y que afectan directa o indirectamente la capacidad reproductiva del ganado, son principalmente, la

energía, la proteína, la grasa y las vitaminas y los minerales; y las principales vías por las cuales dichos nutrientes se relacionan con la reproducción son:

- Metabólica.- mediante esta vía se aportan los precursores o intermediarios necesarios; mayor aporte de grasa repercute en mayores niveles de progesterona.
- Hormonal.- esta vía estimula los mecanismos necesarios a nivel hormonal; mayor nivel de energía desencadena el mecanismo de producción de gonadotropinas.

Estudios realizados demuestran que ambas vías (metabólica y hormonal) están estrechamente relacionadas y a través de ellas la alimentación puede ejercer su influencia que bien puede ser positiva o negativa sobre la reproducción (Martinez y Sánchez, 2001).

El comportamiento reproductivo en las vacas lecheras la mayoría de las veces depende del reinicio de la actividad ovárica la cual tiene una estrecha relación con las demandas energéticas destinadas a la producción de leche (Boland *et al.*, 2001).

En los animales que han tenido alimentaciones deficientes y que presentan excesiva pérdida de la condición corporal durante el posparto temprano se presenta un antagonismo entre producción de leche y fertilidad, según lo reportado por Ferguson, (1991); esto dado principalmente por el incremento que la demanda de energía destinada

a la producción de leche tiene sobre las destinadas a la reproducción (Boland *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2002).

Después del parto, las hembras bovinas deben reiniciar su función reproductiva para poder gestar nuevamente; para que ésta se restablezca rápidamente, es necesaria la normal involución del útero y el rápido restablecimiento de la actividad ovárica (Slama, 1996). Durante la involución uterina, el útero debe recuperar su estado normal para poder soportar una nueva gestación, por lo que el retraso en este proceso afecta de manera negativa el rendimiento reproductivo de las vacas, incrementando el intervalo entre partos. La involución del útero se presenta más tardíamente en vacas viejas o en aquellas que han padecido alteraciones posparto, como distocias, partos gemelares, retención placentaria, metritis, entre otras (Mateus *et al.*, 2002).

Durante los últimos 50 años la marcada selección para conseguir una elevada producción de leche ha venido acompañada de un dramático descenso en el comportamiento reproductivo del ganado productor de leche; esto dado principalmente por el incremento en la demanda de energía destinada a la producción de leche (Boland *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2002); sin embargo, el incremento en el consumo de energía por manejo alimenticio puede reducir la duración del anestro posparto (Blache, 2003).

La nutrición es uno de los factores con mayor influencia sobre la reproducción en los animales domésticos; elementos específicos como la proteína y la energía pueden modificar la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Thomas *et al.*, 1997, Cansino

et al., 2003). Un inadecuado consumo de nutrientes, principalmente energía, incrementa el intervalo parto-primer estro posparto, lo cual disminuye la tasa de gestación a primer servicio posparto (Salas *et al.*, 1997).

La influencia que la alimentación tiene sobre la reproducción ha sido estudiada ampliamente (Butler, 2000); dada la importancia que representa en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas; ya que una deficiente alimentación, provoca una disminución en la síntesis de GnRH, lo que afecta la liberación de FSH y la frecuencia pulsátil de LH; provocando la disminución de la función ovárica, lo cual origina retraso en la ovulación y en consecuencia aumento en el período de anestro (Jimeno *et al.*, 1998). Una deficiente nutrición afecta la disponibilidad de colesterol, principal precursor de las hormonas esteroideas, y que tiene su sitio de acción en el ovario primordialmente (Staples *et al.*, 1998).

2.2 Balance energético negativo y alteraciones metabólicas

Como resultado del parto se presenta una abrupta disminución de las reservas corporales como consecuencia de un incremento en las demandas metabólicas para producción de leche. En las vacas lecheras el rápido aumento en los requerimientos de energía por el resultado de la lactación; llevan al animal a un estado de balance energético negativo (NEBAL, por sus siglas en inglés) que inicia pocos días antes del parto y generalmente alcanza su punto máximo (nadir) alrededor de 2 semanas después (Butler, 2000).

La actividad reproductiva se ve afectada por diversos factores externos, siendo uno de los más importantes el balance de energía, debido a que la reproducción es muy demandante de energía; en diversos estudios, el NEBAL se presenta durante las primeras tres semanas de lactación y está altamente correlacionado con el intervalo a primera ovulación posparto, que generalmente ocurre alrededor de los 30 días después (Butler, 2000; Spain, 1996).

El balance de energía se define como la diferencia entre la energía disponible y la energía utilizada. Dentro de la energía disponible se incluye la que proviene de la nutrición y la almacenada en los tejidos corporales, principalmente la del tejido adiposo. La energía utilizada varía en cada animal y depende de la edad y del estado fisiológico; y es utilizada para el mantenimiento de la homeostasis y necesidades fisiológicas como las de crecimiento y reproducción (Blache, 2003; Gallardo *et al.*, 2004).

El balance en la energía se puede ver afectado por factores externos como la disponibilidad de alimento. Las modificaciones en el balance de energía, puede repercutir en cualquiera de los tres niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, así como en los mecanismos reguladores de retroalimentación (Butler, 2000).

Estudios realizados por Barton y Carroll, (1992) y Chandler, (1997) mencionan que un balance energético negativo deprime la liberación del factor liberador de las hormonas gonadotrópicas en el hipotálamo y la posterior liberación de hormona luteinizante (LH) en

la hipófisis; lo cual afecta el patrón normal de liberación de LH requerido para la maduración de folículos, ovulación y formación del cuerpo luteo del ovario, y por tanto, reduciendo la eficiencia reproductiva de las vacas.

2.3 Técnica para evaluar la condición corporal

Oldick y Firkins, (2003) mencionan que existe una relación muy estrecha entre el consumo de materia seca, el balance energético y la condición corporal en la vaca; además establecen que la pérdida de condición corporal, la cual es un indicativo del estado de energía, está altamente relacionado con la eficiencia reproductiva de la vaca.

La determinación del estado corporal de los animales representa una práctica de manejo que permite mejorar la eficiencia del ganado ya que este evalúa el balance energético del animal y sus reservas corporales (Gallardo *et al.*, 2004).

Los cambios en la condición corporal de una vaca a lo largo del ciclo productivo son muy dinámicos pero pueden evaluarse en forma confiable mediante la determinación del "score" ó "grado de gordura", a través de la palpación y observación de ciertas áreas anatómicas de las zonas del lomo, la grupa y la base de la cola. De esta manera se determina, empíricamente y según las escalas de referencia (grados 1 a 5) como se muestra en la tabla 1, o de 1 a 9 (cuadro 1) la cantidad de tejido graso subcutáneo presente en esas áreas (Gallardo *et al.*, 2004).

1.25	1.5	1.75	2.25	2.5	2.75	3.25	3.5	3.75	4.25	4.5	4.75
1			2			3			4		5
Muy flaca			flaca			normal			gorda		obesa

Tabla 1. Escala de referencia para determinar condición corporal

Edmonson *et al.* (1989) concluyeron que la exactitud de un sistema de calificación de la condición corporal es incrementada por el uso de un instructivo que guíe a los usuarios en la observación de ocho zonas del lomo, pelvis y región de la base de la cola de la vaca.

Escala del 1 al 5	Escala del 1 al 9	% de grasa corporal
1	1	5.0
1.5	2	9.4
2	3	13.7
2.5	4	18.1
3	5	22.5
3.5	6	26.9
4	7	31.2
4.5	8	35.6
5	9	40.0

Fox *et al.* (1992).

Cuadro 1. Porcentaje de grasa corporal en relación con la condición corporal en diferentes sistemas de calificación.

2.4 Procedimiento para la determinación de la condición corporal

Gallardo *et al.*, (2004) recomiendan realizar una rutina, que debe efectuarse con los animales parados sobre una superficie plana, evitando todo tipo de tensiones que obligan a que las vacas adopten posturas contraídas. La persona que realiza la evaluación debe ubicarse detrás del animal para poder palpar de manera efectiva todas las regiones anatómicas que ésta metodología propone y la cual se describe a continuación:

La palpación se realiza ejerciendo una leve pero consistente presión con la yema de los dedos, en cada uno de los puntos señalados en la figura 1, y la cual se realiza primero en la región de la base de la cola, incluyendo la grupa, los huesos de la cadera y las últimas costillas. Posteriormente se evalúa la zona del lomo, que además sirve para hacer ajustes que pueden ir de un cuarto de punto a medio punto.

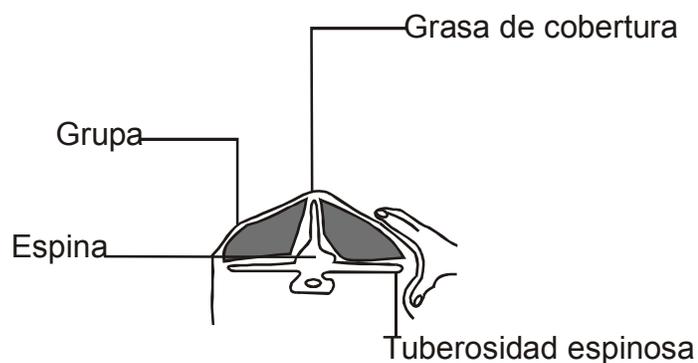


Figura 1. Puntos de observación en la base de la cola.

Los momentos de mayor relevancia para llevar a cabo la evaluación de condición corporal son los siguientes:

- Al parto.
- Durante el examen reproductivo (en promedio 30 días posteriores al parto).
- Durante el examen reproductivo para diagnóstico de preñez.
- Al secado.

2.5 Efecto de la condición corporal en la reproducción

Una marcada pérdida en la condición corporal después del parto, conduce a una reducción en la actividad ovárica y un aumento en el número de días a la concepción (Staples *et al.*, 1992). Por otra parte Padrón *et al.*, (1993) encontraron que la pérdida de 0.25 unidades de condición corporal, resulta en un incremento en 5.5 días de período

abierto en las vacas. Domecq *et al.*, 1995 encontraron que las vacas que pierden un punto de condición corporal durante el primer mes de lactancia, tiene 1.5 veces menos probabilidad de concebir que las que tienen una evolución normal de pérdida de peso corporal.

Para que la reproducción no se vea afectada por el balance energético negativo y la condición corporal, es necesario comenzar la lactancia en una condición corporal de 3.5, la cual disminuye durante los dos siguientes meses (dicha caída no deberá ser mayor de 0.5 por mes). Entre los 50-60 días posparto la vaca deberá estar en una condición corporal no menor de 2.5 y en los meses posteriores deberá llegar a una condición corporal de 3.5 hacia el final de la lactancia, y la cual deberá mantener durante el período seco para volver a parir con este valor (Grummer *et al.*, 1995). Este mismo autor recomienda que para poder mantener este esquema de condición corporal, es necesario maximizar el consumo de materia seca, lo que representa una buena alimentación durante el período de transición; el cual se define como las 2 a 3 últimas semanas antes del parto y las primeras semanas posteriores al parto. El período de transición coincide con el tiempo en que la vaca experimenta cambios metabólicos y hormonales para iniciar el parto y la producción de leche.

El consumo de materia seca y agua en el periodo próximo al parto, esta generalmente limitado por el propio estrés del parto y la disponibilidad de alimento; mientras que el consumo de alimento se reduce en un 30-35 % en las últimas tres semanas preparto (Grummer *et al.*, 1995).

Para maximizar el consumo de materia seca posparto, y evitar una mayor pérdida de condición corporal que afecte la reproducción en las vacas, se recomienda suministrar forrajes de alta calidad, y que estos representen entre el 50 y el 60% de la ración total Weiss *et al.*, (2003).

Ante la crisis de la industria lechera de México es necesario buscar una alternativa que permita incrementar la disponibilidad de ácidos grasos no esterificados (NEFAs), ya que es en principio el estado energético del organismo lo que determina la capacidad reproductiva (Muñoz, *et al.* 1995; Castelan y Matthewman 1996). En los sistemas de producción a pequeña escala, la variabilidad de la dieta es una de las limitaciones más importantes, especialmente en el periodo posparto (Randel, 1990).

Para evaluar el estado nutricional de las vacas es importante el aporte y consumo de nutrientes , así como la cantidad y calidad de los mismos; sin embargo, el estado nutricional de las vacas también puede evaluarse por la calificación de la condición corporal (CC) y por los cambios que se presentan en la misma (Villa-Godoy *et al.*, 1988). Algunos autores afirman que para valorar el estado nutricional de los animales es importante considerar el monitoreo de algunos perfiles metabólicos que indiquen la dinámica del estado nutricional (Kronfeld y Medway 1980; Church y Pond, 1997). Así, Kronfeld y Medway, 1980; Gagliostro y Cocimano, 1987; coinciden en señalar que las concentraciones y movilización de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) que ocurren en el posparto temprano permiten conocer el estado nutricional del animal.

Grummer *et al.*, (1995) y Stevenson, (1997) consideran que la vaca debe tener de 3 a 3.5 puntos de condición corporal durante el parto y en la lactación temprana. Otros autores plantean, que generalmente la pérdida de CC no debe exceder de 0.5 en la lactancia temprana para minimizar los efectos reproductivos negativos (Staples *et al.*, 1992; Ruegg y Milton, 1995).

Domecq *et al.*, (1995) y Yabuta *et al.*, (1997) plantearon que la calificación de la CC permite estimar la grasa total almacenada en el interior del cuerpo, en dependencia de lo que ocurra con la acumulación de grasa subcutánea. Lucy (1990), Randel (1990), Villa-Godoy *et al.*, (1990), Butler (1995), Ruegg y Milton (1995) y Domínguez (1997) coincidieron en señalar que la CC es un buen indicador del estado energético del animal. Sin embargo, la medición del balance energético o de hormonas y de metabolitos específicos es un indicador más preciso.

Canfield y Butler (1990), informaron una alta correlación negativa entre el balance energético y los niveles de NEFAs en plasma.

Durante las últimas 4 semanas de gestación se produce un aumento de las necesidades energéticas debido al desarrollo fetal y a la síntesis de calostro; estas situaciones generalmente se acompañan de una disminución en la ingestión de materia seca, principalmente en la semana previa al parto; sin embargo, en algunos estudios previos reportados por Grummer *et al.*, 1995; Goff y Horst, 1997, se menciona que el

ganado vacuno tiene la capacidad de compensar los déficit alimentarios de energía a través de la movilización de grasa corporal, y que un exceso en la movilización de grasa conduce a problemas productivos y reproductivos, dados por una disminución en los niveles de glucosa e insulina en sangre, lo cual promueve la movilización de grasa. Dicha movilización resulta en un aumento en los NEFAs en sangre que son utilizados por el hígado.

Las reservas energéticas corporales pueden ser movilizadas cuando una vaca recibe una menor cantidad de nutrientes de los que se necesita durante la preñez o la lactación (Wettemann, 1994). El incremento en las concentraciones plasmáticas de NEFAs, son un indicador de liberación de grasa del tejido adiposo, debido a un balance energético negativo (Rasby *et al.*, 1992).

Los NEFAs, son el resultado de la lipólisis y proteólisis que se produce para satisfacer los requerimientos de los animales durante el período de balance energético negativo (Rukkwamsuk *et al.*, 1999).

En un estudio realizado por Spitzer *et al.*, 1995, se menciona que las vacas con una alta nutrición posparto se tienden a incrementar las concentraciones de NEFAs durante el período de apareamiento, comparadas con las vacas con una moderada nutrición posparto y que el incremento en las concentraciones pueden estar relacionadas con el incremento en la producción láctea.

En los animales con balance energético negativo, generalmente los NEFAs se ven alterados (Canfield y Butler, 1991; Whitaker *et al.*, 1993). Dichas alteraciones en los niveles de NEFAs son indicativo de la disponibilidad de energía y pueden proveer signos sobre el eje hipotálamo-pituitaria-ovario mediante efectos de desnutrición (Bishop y Wettemann., 1992).

La movilización de grasa resulta en el aumento de los ácidos grasos no esterificados en sangre. Esta se duplica en plasma entre los días -17 y +2 respecto al parto y el contenido de triglicéridos, en el hígado se triplica el día del parto respecto a 28 días preparto (Calsamiglia, 2000). Aunque la mayor parte de dicha movilización se debe al estado endocrino del animal, la disminución en la ingesta de materia seca es el factor más importante (Grummer *et al.*, 1991; Bertrics *et al.*, 1992).

El incremento en las concentraciones de NEFAs puede tener una influencia negativa sobre la función ovárica (Bossis *et al.*, 1999). Sin embargo, el aumento de las reservas energéticas corporales estimula el incremento pulsátil en la liberación de LH iniciando de esta manera la función ovárica.

Siendo la nutrición uno de los principales factores que regulan el inicio de la actividad ovárica posparto, se convierte en una necesidad el determinar el estado nutricional de un animal a través de la medición de la condición corporal, la cual es una herramienta que nos puede permitir predecir con bastante confianza, el tiempo que una vaca puede tardar para reiniciar su actividad ovárica. De manera que las vacas que paren con una baja condición

corporal, tardan más tiempo en reiniciar la actividad ovárica, comparadas con aquellas que paren con una buena condición corporal (Bishop y Wettemann, 1992).

Cuando la movilización de ácidos grasos es excesiva, se saturan las vías de metabolización de lípidos y se generan vías hepáticas alternas, entre las que la formación y almacenamiento hepático de triglicéridos son las más frecuentes (Grummer *et al.*, 1995).

La mayor atención se centra generalmente en la movilización de grasa en el período posparto, donde el balance energético es importante; sin embargo, el balance energético comienza en las semanas previas al parto, y la saturación hepática generada es una causa predisponente importante.

Por otra parte una deficiencia de energía, causada por baja ingesta o por gasto excesivo, disminuye la secreción de GnRH; contrariamente un restablecimiento de los patrones normales de consumo alimenticio, invierte la deficiencia de gonadotropinas (Cameron, 1996).

En las hembras, la ovulación puede ser regulada por cambios en el balance de energía; las señales involucradas en este proceso, actúan principalmente a nivel de ovario, y en menor grado en el sistema neuroendocrino, que es quien controla la ovulación.

La vía principal en la cual se lleva a cabo la función reproductiva es el eje gonadal hipotalámico-pituitario. La GnRH, controla la secreción de las hormonas en las gónadas; LH y FSH, las cuales regulan la producción de óvulos (Blache *et al.*, 2000).

La red neuronal que controla la secreción de GnRH se cree es la vía en la cual muchos factores influyen en la actividad gonadal, incluyendo el estado metabólico. La frecuencia en los pulso de GnRH y de LH son el código utilizado por el sistema nervioso para controlar la función en las gónadas (Martin *et al.*, 1994).

Durante la lactancia existe una fuerte relación, entre el balance energético y el restablecimiento de los ciclos reproductivos. El retorno a un balance energético positivo, consecuencia del consumo de alimento y de las reservas corporales que exceda los gastos de la lactancia, está fuertemente correlacionada con la duración del posparto y el retraso de la primera ovulación (Beam y Butler, 1999). Un incremento en el consumo de energía por manejo en la nutrición, puede reducir el balance energético negativo, y en consecuencia disminuir el anestro posparto.

Diskin *et al.*, (2003), mencionan que una sub-alimentación crónica, no necesariamente afecta la secreción pulsátil de LH; más bien, aumenta la concentración de FSH, tal vez por la reducción en la concentración de estradiol, y por consiguiente una disminución en los mecanismos de retroalimentación negativos en la secreción de GnRH.

La primera fase de la lactancia coincide con condiciones metabólicas adversas originadas en el déficit energético ocasionado por los bajos consumos de energía y la alta producción lechera. El balance energético negativo (NEBAL) provoca cambios en las concentraciones de glucosa y de las hormonas relacionadas con el metabolismo intermediario de la energía (Miettinen, 1995).

En rumiantes, las concentraciones de ácidos grasos en plasma aumentan, cuando se incrementa el régimen alimenticio. En vacas lactantes, las concentraciones de NEFAs y cetonas en el plasma se afectan por los cambios en la nutrición (Holtenius, 2001).

2.6 Triglicéridos (TGC) y la síntesis de lipoproteínas en el hígado

Durante la última fase de la gestación y en la lactación temprana se requiere de una mayor ingesta de glucosa; pero como sólo pequeñas cantidades son absorbidas desde el intestino, los rumiantes dependen de otros alimentos para satisfacer sus necesidades de energía.

Cuando las vacas experimentan un período de balance energético negativo, ocurren cambios en un considerable número de hormonas, por ejemplo, la insulina, el glucagón, las somatotropinas; e inducen cambios en la neoglucogénesis y en la cetogénesis. Este estado de lipólisis característico de la fase de homeorrexis en el inicio de la lactación, hace que el tejido graso se convierta en ácidos grasos libres o (NEFAs) y glicerol: el cual puede ser usado para la producción de glucosa o para ser recombinado

con los NEFAs para formar TGC, los cuales pueden ser depositados en el hepatocito o descargados a la circulación sanguínea en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD) (Grummer *et al.*, 1995).

Los ácidos grasos libres, se pueden degradar a través de la β -oxidación y convertirse en acetil-CoA, el cual se combina con el ácido oxalacético y entra en el ciclo de Krebs para producir ATP. En este momento, el metabolismo de las grasas compite con la neoglucogénesis ya que ambas requieren del oxalacetato, el cual, si no existe en cantidades suficientes, no puede ser introducido en el ciclo de Krebs y por lo tanto se convierte en cuerpos cetónicos (Gerloff y Herdt, 1995).

La determinación de concentraciones séricas de NEFAs es un buen indicador para evaluar la movilización de reservas corporales, que con base en lo reportado por Canfield y Butler (1990), existe una relación negativa (a medida que aumenta la CC, se incrementan los niveles de NEFAs) elevada entre el balance energético y los niveles de NEFAs en plasma (Salas *et al.*, 2003). Diversos estudios afirman que un importante indicativo para valorar el estado nutricional de los animales es monitorear los perfiles metabólicos, los cuales indican la dinámica del estado nutricional; igualmente mencionan que las concentraciones y movilizaciones de ácidos grasos no esterificados, que por lo regular se presenta en el posparto temprano, también permite determinar el estado nutricional de las vacas (Kronfeld y Medway 1980, Church y Pond, 1997).

Los metabolitos de lípidos, son una de las primeras moléculas que se afectan por una variación en el balance de energía, y representan uno de los primeros pasos en una cadena de eventos que constituyen el enlace entre el balance energético y el eje reproductivo.

Con la intención de mejorar el comportamiento reproductivo posparto en vacas lecheras, se han diseñado diversas estrategias, que incluyen la manipulación hormonal o el manejo alimenticio a través de la inclusión de ingredientes específicos (energía o proteína) en la dieta, no obstante los resultados han sido poco alentadores y consistentes.

En la alimentación animal, las grasas y los aceites funcionan de manera parecida a los carbohidratos, en el sentido de que sirven como fuente de calor y energía, y para la formación de tejido adiposo. Sin embargo, debido a su mayor proporción de carbono e hidrógeno, las grasas y los aceites, liberan más energía que los carbohidratos al ser digeridas, aportando al oxidarse, aproximadamente 2.25 veces más calor o energía por kg que los carbohidratos (Esminger *et al.*, 1990). Sin embargo, Williams (1996) y Thomas *et al.* (1997), señalan que el efecto de la suplementación grasa sobre la actividad reproductiva es un efecto independiente de la ganancia de peso o de cambios en la condición corporal.

Además del efecto positivo que los ácidos grasos poliinsaturados ejercen sobre algunos procesos reproductivos, otros autores los han relacionado también con un incremento en las concentraciones plasmáticas de metabolitos de lípidos como las

lipoproteínas de alta y baja densidad, además del colesterol (Herrera *et al.*, 2001) que actúa como el principal sustrato para la síntesis de progesterona (P_4) en el cuerpo lúteo (Bao *et al.*, 1997), e incrementando consecuentemente las concentraciones de la hormona en el plasma sanguíneo (Kuran *et al.*, 1999; Aranda *et al.*, 2002).

El principal sustrato de la esteroidogénesis es el colesterol (COL), el cual, en condiciones normales es sintetizado por el hígado y transportado en forma de lipoproteínas hacia tejidos esteroidogénicos como la corteza adrenal, el cuerpo lúteo, el folículo y los testículos (Bauchart y Levieux, 1985).

Se conocen tres fuentes principales para la síntesis de colesterol que puede ser usado como sustrato para la producción de esteroides:

1. Lipoproteínas de alta densidad (HDL).
2. Lipoproteínas de baja densidad (LDL).
3. Hidrólisis de ésteres de colesterol (Wuttke *et al.*, 2001; Devoto *et al.*, 2000; Devoto *et al.*, 2002; Kotwica *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2002).

La primera ovulación posparto, refleja la reanudación de la condición hormonal después de una gestación. La ovulación de un folículo dominante durante la lactación temprana depende del reestablecimiento de la secreción de hormona folículo estimulante FSH y LH necesarias para el crecimiento y maduración folicular así como en la ovulación. El balance energético negativo, que espontáneamente se desarrolla en vacas lecheras,

representa un estado fisiológico de desnutrición que perjudica la secreción de LH y detiene la ovulación como se detalla en revisiones previas (Butler, 2000). La liberación episódica de LH por la glándula pituitaria anterior es el prerrequisito para el reestablecimiento de la ovulación y los ciclos estrales durante el período posparto en el ganado vacuno, pero son inhibidos en la vaca desnutrida (Sinclair *et al.*, 2002).

La energía es el nutriente más limitante en el principio de la lactación; el consumo de energía no compensa las necesidades de mantenimiento y de producción durante las primeras semanas de lactación debida a la alta demanda energética para producción de leche ya la limitada capacidad de consumo de alimentos; en consecuencia las vacas movilizan sus reservas corporales de grasa y proteína, esta última en menor medida, para minimizar el déficit (Martínez y Sánchez, 2001).

El periodo que las vacas permanezcan en balance energético negativo varía en función de la velocidad con que se incremente el consumo de alimentos después del parto, el cual depende de factores como: alimentación recibida durante el período seco, patologías en el periparto y calidad de la ración (Montiel y Ahuja, 2005).

La duración del balance energético negativo, es el principal factor que determina el retorno de los ovarios a su función normal después del parto. Martínez y Sánchez (1999), mencionan que la ovulación se retrasa 2.75 días por cada 1 Mcal de balance energético durante los primeros 20 días posteriores al parto.

2.7 Metabolismo de los lípidos

Los lípidos son compuestos solubles en solventes orgánicos y casi insolubles en agua. La mayor parte de los organismos los utilizan como reservorios de moléculas fácilmente utilizables para producir energía, un gramo de grasa produce 9.4 kcal en las reacciones metabólicas de oxidación, mientras que las proteínas y glúcidos solo producen 4.1 kcal/g; la mayoría de las funciones de los lípidos se deben a su propiedad de autoagregación, lo que le permite unirse a otras biomoléculas, de aquí que no es frecuente encontrarlos en estado libre, generalmente están unidos a otros compuestos como los carbohidratos, formando glucolípidos o a proteínas formando lipoproteínas (Vázquez, 1994).

2.7.1 Lipólisis

Después que los animales ingieren los lípidos esterificados de las plantas, estos son hidrolizados por las lipasas bacterianas y en consecuencia liberando ácidos grasos (Jenkins, 1993).

Los productos finales de la hidrólisis son los ácidos grasos libres y el glicerol (Hawke y Silcock, 1970). Los ácidos grasos insaturados libres tienen una vida relativamente corta, debido a que son biohidrogenados rápidamente por los microbios del rumen a productos más saturados; dicha biohidrogenación da como resultado la adición

de hidrógeno a los ácidos grasos con doble ligadura y así proporcionar un medio a través del cual los microorganismos del rumen puedan disponer de hidrógeno. Si dicha biohidrogenación se completa, todas las dobles ligaduras se convierten en ligaduras simples y el ácido graso es saturado (Jenkins, 1993, Thomas, 1994).

2.7.2 Transporte y absorción de lípidos en los rumiantes

El intestino recibe los ácidos grasos de forma exógena a través de la digesta y de manera endógena por vía circulación sanguínea, los cuales son esterificados para formar triglicéridos (TG), fosfolípidos y ésteres de colesterol (Palmquist y Mattos, 1978).

Estos compuestos, unidos a ciertas proteínas, forman las lipoproteínas que son secretadas a la linfa del intestino y transportadas a través de la sangre; y cuya función principal es el transporte de lípidos desde el intestino y el hígado hacia los tejidos periféricos (Bauchart, 1993).

Las lipoproteínas son complejos moleculares solubles en los fluidos vasculares (plasma y linfa) y en los fluidos del intestino y líquido folicular. Dependiendo de su tamaño y densidad, se dividen en cuatro clases principales según Bauchart, 1993:

1. Quilomicrones
2. Lipoproteínas de muy baja densidad
3. Lipoproteínas de baja densidad

4. Lipoproteínas de alta densidad

2.7.3 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL en los rumiantes, son el producto final de la degradación de las lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD), y están implicadas en la distribución del COL en los tejidos; cuantitativamente representan alrededor del 10% de las lipoproteínas en el plasma (Laplaud *et al.*, 1990); Las HDL están formadas por COL en un 48% y fosfolípidos en un 27%, además de dos componentes menores: colesterol libre en 10% y triglicéridos en un 15%, según lo mencionan Laplaud *et al.*, (1990).

2.7.4 Lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Las LDL representan alrededor del 80% de todas las lipoproteínas. Su principal función es la de liberar el colesterol hacia los tejidos para llevar a cabo la esteroidogénesis primaria, la cual se realiza en el hígado, ovario, glándula mamaria y testículos (Bauchart y Levieux, 1985).

En los rumiantes, las lipoproteínas de baja densidad son sintetizadas y secretadas por el hígado y el intestino delgado. Las partículas de LDL son las mayormente implicadas en el transporte de colesterol.

La absorción de los ácidos grasos en el intestino delgado es lenta, lo cual permite que favorecido con el pH se lleve a cabo la lipólisis. Los ácidos grasos son partículas insolubles, que se componen principalmente de partículas de alimento, células microbianas y de descamación del endotelio del intestino (Doreu y Ferlay, 1994).

2.8 Metabolismo de los lípidos y su relación con las hormonas metabólicas

Son dos las principales hormonas que han sido implicadas en el metabolismo de los lípidos: la insulina (INS) y la hormona del crecimiento (GH). La GH incrementa el uso de ácidos grasos como fuente de energía, incrementa la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo y disminuye la utilización de glucosa en el cuerpo, a diferencia de la INS, que favorece la utilización de glucosa y la síntesis de ácidos grasos en el hígado y en el tejido adiposo.

Los esteroides son lípidos simples no saponificables; y el COL es el esteroide más abundante en los animales. Este esteroide es también abundante en lipoproteínas del plasma sanguíneo y del cual, aproximadamente el 70 % es esterificado por ácidos grasos de cadena larga. El colesterol es el precursor metabólico de las hormonas esteroides, las cuales regulan una gran variedad de funciones fisiológicas que incluye el metabolismo de los carbohidratos y el desarrollo sexual. Los ácidos grasos son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de tipo lineal, y con un número par de átomos de carbono (Luengo, 2001).

El COL es el principal precursor de las hormonas esteroideas; una vez finalizado el parto, las contracciones uterinas se mantienen, aunque a medida que transcurre el tiempo disminuyen en frecuencia e intensidad (Slama, 1996). Estas contracciones son estimuladas por la acción de la oxitocina, y de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Risco *et al.*, 1994; Arthur *et al.*, 1996). En el posparto normal la duración y liberación de prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$) está correlacionada negativamente con el tiempo necesario para completar la involución uterina, transformándose en positiva cuando el puerperio no es normal (Kindhal *et al.*, 1992 ; Del Vecchio *et al.*, 1992; Del Vecchio *et al.*, 1994).

Mattos *et al.*, (2002) demuestran la importancia que la suplementación con ácidos grasos tiene sobre la fertilidad en el ganado lechero; y mencionan que tres son los ácidos grasos que tienen un efecto positivo en la reproducción; el ácido linoleico, conocido como (omega 6) y los conocidos (como omega 3) el eicosapentanoico (EPA) y el decosahexanoico (DHA); estos dos últimos presentes principalmente en los aceites de pescado y productos del mar.

La base fisiológica sobre el efecto de éstos ácidos para mejorar la fertilidad está relacionada con la conversión del ácido araquidónico en prostaglandina $\text{PGF}_{2\alpha}$; los cuales reducen la síntesis de prostaglandinas al competir por un sistema enzimático, las cuales juegan un importante papel en el reinicio del ciclo estral después del parto (Vazquez, 1989).

Petit *et al.*, (2003), establece que se debe prestar importancia al momento de adición de los ácidos grasos para no afectar la reproducción; ya que como lo menciona este mismo autor, los ácidos grasos están relacionados con la disminución en la mortalidad embrionaria y al número de servicios por concepción, esto dado por su efecto sobre las prostaglandinas.

2.9 Endocrinología de la reproducción

2.9.1 Regulación neuroendocrina del ciclo estral

Aunque Malpighi (1628-1694) fue el primero en proponer la existencia del cuerpo luteo (CL), de Graff (1641-1673) reportó la presencia de cuerpos globulares ováricos después de la fertilización de conejas, los cuales permanecían en las estructuras ováricas hasta después del parto, observando una estrecha relación entre el número de CL con el tamaño de la camada (Niswender *et al.*, 2000). La importancia del CL como un elemento glandular indispensable para mantener la gestación fue sugerido por Prenant en 1898 y confirmada por Fraenkel y Quirk en 1903, quienes al remover ya sea los ovarios o los CL en conejas gestantes, observaron la presencia de abortos o reabsorciones embrionarias. Ese mismo año, Magnus inició el estudio del factor biológicamente activo presente en los extractos lúteos, el cual fue cristalizado y caracterizado en forma simultánea por cuatro grupos independientes de investigadores en 1934. Dicho factor bio-activo del CL, el cual era indispensable para el mantenimiento de la preñez, resultó ser una hormona esteroide, la cual fue denominada progesterona (Niswender *et al.*, 2000; Spencer y Bazer, 2002).

2.10 Acciones de la progesterona

Durante el ciclo estral, el ovario desarrolla la dos glándulas endocrinas, el folículo y el CL. Debido a que el CL es derivado de tejido folicular, el folículo puede ser considerado la unidad funcional del ovario. La primera etapa de la foliculogénesis incluye la proliferación mitótica de las células germinales primordiales (oogonias), la cual inicia poco después de que dichas células migran hacia el ovario fetal. Todas las oogonias que inician las etapas tempranas de la meiosis se transforman en oocitos primarios, los cuales son rodeados de una capa simple de células granulosas para formar folículos primarios (Buffet y Bouchard, 2001).

Una vez que los folículos primordiales inician su desarrollo en la etapa posnatal, éstos tendrán dos posibles destinos; uno, si el medio hormonal es el apropiado, continuarán su desarrollo y eventualmente liberarán un óvulo maduro en el oviducto en un proceso denominado ovulación. Dos, otros folículos, los cuales incluyen la mayoría (99.9 %), nunca ovulan y degeneran mediante un proceso genéticamente controlado referido como atresia, apóptosis o muerte celular programada. El desarrollo folicular está asociado al desarrollo de un grupo de folículos en diferentes fases de crecimiento, de los cuales un número específico, dependiendo de la especie, es seleccionado para continuar su desarrollo ((Buffet y Bouchard, 2001; Eppig, 2001; Erickson y Shimasaki, 2001; Richards *et al.*, 2002).

Un folículo maduro contiene tres tipos de células: las células de la teca, las células de la granulosa y el oocito. Las células de la teca conforman la capa externa del folículo y se divide a su vez en dos tipos celulares: una capa externa fibrosa (teca externa) y una capa interna altamente vascularizada (teca interna). Las células de la granulosa son el mayor constituyente celular del folículo y realizan importantes funciones nutritivas y endocrinas. Al centro del folículo se localiza el oocito, el cual concentra la información genética de la hembra. Finalmente, existe una cavidad rellena de fluido folicular, la cual es evidente en folículos maduros (Buffet y Bouchard, 2001; Erickson y Shimasaki, 2001; Richards *et al.*, 2002).

Las oleadas características del desarrollo folicular observadas durante el ciclo estral de los mamíferos, están asociadas no solamente a cambios morfológicos y funcionales en las células de la teca y granulosa, sino también a cambios en el sistema vascular y en el sistema nervioso del folículo en desarrollo. El desarrollo folicular puede dividirse en tres etapas diferentes: 1) Reclutamiento, etapa durante la cual un grupo de folículos en desarrollo inician un crecimiento acelerado, 2) Selección, etapa en la cual sólo ciertos folículos son seleccionados para continuar su desarrollo y 3) Dominancia, etapa en la cual el folículo dominante refleja un rápido desarrollo, mientras que cesa el desarrollo de los folículos subordinados (Buffet y Bouchard, 2001; Eppig, 2001; Erickson y Shimasaki, 2001; Richards *et al.*, 2002).

El establecimiento de la dominancia folicular esta controlada por un número de mecanismos que actúan de manera coordinada. Entre éstos se incluyen las alteraciones en

las concentraciones periféricas de FSH, las cuales son reguladas por el folículo dominante mediante la secreción de estradiol e inhibina, así como también mediante la secreción intraovárica de ciertos factores con capacidad de inhibir directamente el desarrollo de los folículos subordinados (Armstrong y Webb, 1997; Albertini *et al.*, 2001; Buffet y Bouchard, 2001; Erickson y Shimasaki, 2001).

Previo a la ovulación, el folículo está conformado por distintos tipos celulares. El *antrum* del folículo es una cavidad que contiene fluido folicular recubierto por una capa de células de la granulosa (GC), a la vez que las GC y el oocito están separados del resto del folículo por una membrana basal (BM); al exterior de la BM se localizan los grupos celulares teca interna (TI) y teca externa (TE). Mientras que las GC y TI sintetizan y secretan esteroides, las TE no son esteroideogénicas. Los capilares del tejido vascular que rodean los folículos están presentes tanto en la TI y la TE, pero están ausentes en la GC ya que la BM actúa como una barrera a la vascularización (Murphy, 2000; Reynolds *et al.*, 2000; Kotwicka *et al.*, 2002; Niswender, 2002; Webb *et al.*, 2002).

El pico preovulatorio de LH promueve una cascada de eventos que causan el rompimiento de la pared folicular y promueven la liberación del oocito durante la ovulación. Posterior a la ovulación, la TI y sus capilares asociados cruzan la degradada membrana basal e invaden la capa celular de la granulosa conforme los remanentes del tejido folicular se transforman en tejido lúteo. De esta forma, el CL tiene su origen de los remanentes de las células foliculares y se conforma de una población celular heterogénea altamente vascularizada, las cuales difieren tanto morfológicamente como fisiológicamente. En la

mayoría de los mamíferos, las células lúteas derivadas de la granulosa se denominan células lúteas largas (LLC), mientras que las células lúteas cortas (SLC) son derivadas de la teca interna (Grazul-Bilska *et al.*, 1997; Murphy, 2000; Kotwicka *et al.*, 2002)

2.11 Esteroidogénesis y síntesis de progesterona

El sustrato para la esteroidogénesis es el colesterol, el cual bajo condiciones normales es sintetizado por el hígado y transportado en la forma de lipoproteínas hacia tejidos esteroidogénicos como la corteza adrenal, el folículo, el cuerpo lúteo, y los testículos; bajo condiciones de hipolipoproteinemia, las células lúteas son capaces de sintetizar colesterol de acetato. Existen tres fuentes principales de colesterol que puede ser utilizado como sustrato para la producción de esteroides: 1) Lipoproteínas de baja densidad (LDL), 2) Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y 3) Hidrólisis de ésteres de colesterol. Una vez formado el colesterol, éste es transportado a la mitocondria con un aparente involucramiento del citoesqueleto (Devoto *et al.*, 2000; Wuttke *et al.*, 2001; Devoto *et al.*, 2002; Kotwica *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2002).

El transporte de colesterol del citoplasma a la membrana interna de la mitocondria, es el evento limitante en la síntesis de P_4 así como el evento más estrechamente influenciado por el sistema de los segundos mensajeros. En efecto, tanto la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) como los receptores periféricos del tipo benzodiazepines (PBR), están involucrados en el transporte del colesterol. Mientras que la StAR enlaza el colesterol en el citosol y lo transporta hacia la membrana mitocondrial, los

PBR están involucrados en su paso de la membrana externa a la interna de la mitocondria (Niswender, 2002). Una vez adentro de la mitocondria, el colesterol es convertido a pregnenalona mediante la participación de la enzima Citocromo P-450-scc, para ser transportada al exterior de la mitocondria y convertida a progesterona por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa / $\Delta^5\Delta^4$ isomerasa (3 β -HSD), la cual está presente en el retículo endoplásmico liso (Wuttke *et al.*, 2001; Kotwica *et al.*, 2002; Niswender, 2002; Webb *et al.*, 2002).

2.12 Concentraciones séricas de progesterona

Las concentraciones séricas de P₄ dependen del volumen de tejido lúteo, la tasa de flujo sanguíneo y la capacidad esteroidogénica del tejido lúteo para sintetizar P₄, mientras que el volumen de tejido lúteo depende a su vez del número y tamaño de las células lúteas, las cuales incrementan conforme avanza la fase lútea, en forma paralela la tasa de flujo sanguíneo también se ve incrementada. En el mismo sentido, también se observan cambios en las concentraciones del mRNA de los componentes codificadores, tanto de componentes esteroidogénicos LDL, HDL, StAR, P-450scc, 3B-HSD, así como de hormonas luteotrópicas y luteolíticas junto con sus receptores, como son las hormonas LH, GH, IGF-1 y PGF_{2 α} . En general se reporta una estrecha asociación entre la tasa de flujo sanguíneo, el peso del tejido lúteo y la cantidad de P₄ en suero. Aun cuando las concentraciones de P₄ incrementan hasta 25 veces y el peso lúteo hasta 4 veces, no se observan cambios dramáticos en las concentraciones basales de cualquiera de las especies de mRNA, excepto del mensaje que codifica el receptor a LH, el cual incrementa

hasta 5 veces su expresión. Por ello, la capacidad esteroidogénica de las células lúteas, junto con su habilidad para responder a la hormona luteotópica LH, incrementan durante el proceso de luteogénesis (Webb y Armstrong, 1997; Díaz *et al.*, 2002; Niswender, 2000; Webb *et al.*, 2002).

2.13 Acciones de la progesterona

Los principales objetivos de la P₄ son el tracto reproductivo y el eje hipotalámico-hipofisiario. En general, como su nombre lo indica, la P₄ es una hormona progestacional, por lo que una de sus principales actividades es la de preparar al tracto reproductivo para la iniciación y mantenimiento de la gestación. La P₄ ejerce la mayoría de sus efectos al regular en forma directa la transcripción génica mediante receptores nucleares específicos que actúan como factores de transcripción inducidos por P₄. Una vez que dichos receptores han sido enlazados, modularán la expresión de genes al realizar un enlace específico de elementos de DNA sensibles a P₄. Previo a la acción de P₄ en el tracto reproductivo, se requiere la exposición de éste a la acción de los estrógenos, los cuales inducen la expresión de receptores a P₄. En contraste, P₄ muestra claras acciones antiestrogénicas en el tracto reproductivo al regular en forma negativa los receptores a estradiol (E2), bloqueando las acciones mitogénicas de dicha hormona (Chabbert-Buffeta, 2000; Niswender, 2000; Tavaniotou *et al.*, 2002).

Mientras que durante la fase folicular, el estradiol (E2) induce la proliferación de células endometriales, hacia la fase lútea P₄ inhibe la mitosis endometrial; sin embargo,

induce la diferenciación del estroma, estimula la secreción del epitelio glandular y cambia los patrones de secreción de proteínas por las células endometriales, con objeto de proveer un ambiente uterino que soporte el desarrollo embrionario temprano. Con respecto al miometrio, P₄ inhibe los movimientos uterinos además de reducir el ingreso de Ca extracelular, el cual es requerido para la contracción de células miometriales, y bloquea la habilidad de E2 para inducir la expresión de receptores α -adrenérgicos cuya activación causa contracciones miometriales (Chabbert-Buffeta *et al.*, 2000).

La P₄ está también parcialmente involucrada en modular la duración del ciclo estral; durante la fase folicular, el tejido endocrino dominante del ovario es el folículo y la ruta esteroidogénica privilegia la síntesis de E2 por lo que los niveles circulantes de P₄ son bajos. Dicho escenario de altos niveles de E2, actúan en el eje hipotálamo-hipofisiario para estimular un patrón de pulsatilidad de baja-amplitud y alta-frecuencia de LH, lo cual resulta en elevadas concentraciones circulantes de LH que llevan al desarrollo folicular hasta el punto de ovulación (Chabbert-Buffeta *et al.*, 2000; Buffet y Bouchard, 2001; Pate y Landis-Keyes, 2001).

Posteriormente, conforme inicia el proceso de luteogénesis, las altas concentraciones de P₄ restringen el patrón de secreción de LH a un perfil de baja-frecuencia y alta-amplitud, generando una reducción en la concentración media de LH en la fase lútea. Este decremento sérico de LH por parte de la P₄ es el resultado de su acción sobre el eje hipotalámico-hipofisiario, ya que mientras en el hipotálamo bloquea la secreción pulsátil de GnRH, en la hipófisis reduce el número de receptores a GnRH, al

regular negativamente la expresión del mRNA que los codifica, además de reducir la expresión de los genes que codifican el ensamble tanto de LH como FSH (Niswender *et al.*, 2000).

2.14 Luteolisis

La luteolisis es definida como la ruptura o muerte estructural del cuerpo lúteo, que conlleva la pérdida de la capacidad para sintetizar y secretar P_4 , seguida de la pérdida de las células que conforman el CL. La prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) es la principal luteolisina secretada por el útero, la cual entra a la arteria ovárica procedente de la vena ovárica mediante un mecanismo de intercambio a contracorriente, lo cual permite que la $PGF_{2\alpha}$ viaje a la arteria ovárica evitando su entrada a la circulación pulmonar en donde podría ser inactivada enzimáticamente en los pulmones (Pate, 1994; Reynolds y Redmer, 1999; Niswender *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2002).

Se ha sugerido que los incrementados niveles de estradiol en los folículos preovulatorios disparan la señal que promueven la secreción de oxitocina (OX) por la hipófisis quien a su vez estimula la secreción de pequeñas cantidades de $PGF_{2\alpha}$ uterina. Posteriormente, la $PGF_{2\alpha}$ inicia una retroacción positiva que involucra la liberación adicional de OX lútea y de $PGF_{2\alpha}$ tanto de origen uterino como de origen lúteo, lo cual parece amplificar la señal luteolítica en una acción autocrina o paracrina (Wuttke *et al.*, 1998; Hoyer, 1998; Vaskivuo y Tapanainen, 2003).

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ reducen el flujo sanguíneo a CL, reduciendo el aporte de nutrientes, substratos para la esteroidogénesis así como decrementando el soporte luteotrópico. Debido a que las células endoteliales poseen receptores para $\text{PGF}_{2\alpha}$, éstas se ven afectadas al reducirse la densidad capilar y, en consecuencia, el aporte sanguíneo al parénquima lúteo.

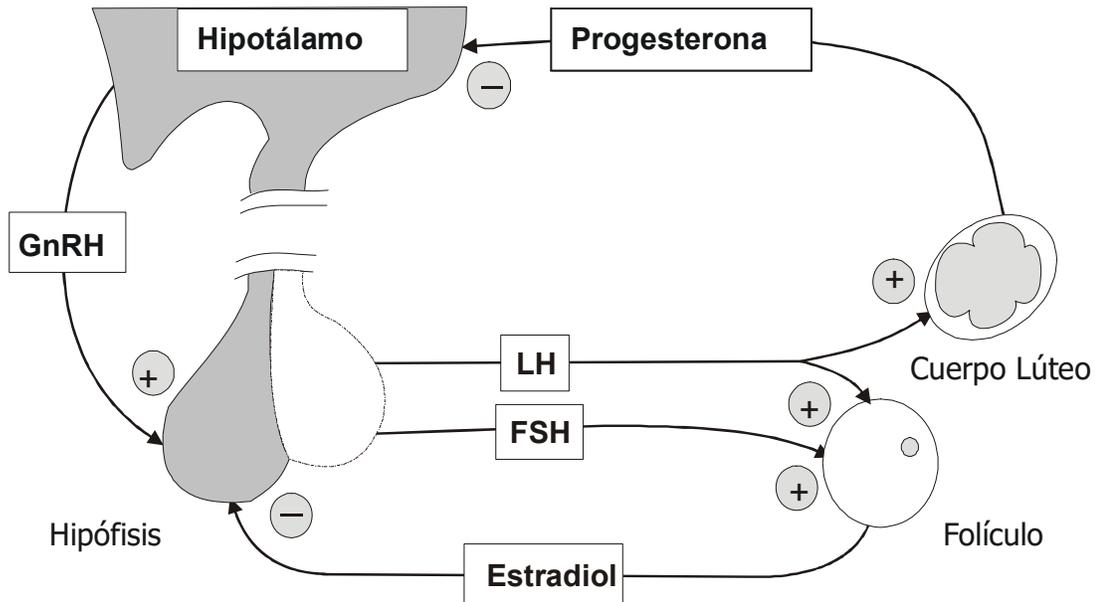
La $\text{PGF}_{2\alpha}$ además de promover las síntesis de endotelina-1 que además de ser un potente vasoconstrictor muestra una elevada actividad anti-esteroidogénica, en células endoteliales de capilares del CL promueve dramáticos cambios morfológicos con claros indicios de apoptosis. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ puede reducir la síntesis de P_4 mediante otros mecanismos que incluyen: 1) Regulación negativa en receptores de hormonas luteotrópicas, 2) Reducción en la tasa internalización de colesterol. 3) Decrementos en el transporte de colesterol hacia la mitocondria, y 4) Reducción de la actividad de las enzimas requeridas en la síntesis de P_4 (McCracken *et al.*, 1999; Meidan *et al.*, 1999; Reynolds *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 2002)

Según Buffet y Bouchard (2001), el ciclo estral está regulado por la retroacción ejercida entre mensajes endocrinos liberados por los componentes del eje hipotalámico-hipofisiario-ovárico. Dichas señales, de origen hipotalámico e hipofisiario, son enviadas para generar el establecimiento de una fase folicular y otra lútea, las cuales en conjunto dan como resultado un ciclo estral de 17 días en la oveja y 21 días en la cabra y en la vaca. La función ovárica es controlada por las hormonas gonadotróficas luteinizante y foliculo estimulante, secretadas por la pituitaria (Wuttke *et al.*, 1998). Por su parte, el patrón de

secreción de LH y FSH es gobernado principalmente por la frecuencia del pulso de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) secretada por el hipotálamo, cuyo patrón de secreción (pulso y frecuencia) es modulado por la retroacción de señales endocrinas ováricas (figura 2). Sin embargo, debido a la naturaleza cíclica de la función ovárica, los efectos tanto de LH como FSH en la función ovárica dependerán de la etapa del ciclo estral, ya que conforme éste progresa, el tejido endocrino dominante cambia de un folículo (fase folicular) a un cuerpo lúteo (fase lútea) (Buffet y Bouchard, 2001; Erickson y Shimasaki, 2001; Webb *et al.*, 2002).

En efecto, las variaciones cíclicas de las hormonas FSH y LH están a su vez bajo el control de las hormonas esteroideas ováricas estradiol (E₂) y P₄, así como otras peptídicas (inhibina). La interacción de las cascadas de señales de dichas hormonas esteroideas y peptídicas a nivel ovario, son críticas para que ocurra, en forma secuenciada, el desarrollo folicular, la ovulación, el proceso de luteinización, la síntesis y secreción de P₄ y el proceso de reconocimiento materno de la preñez (Buffet y Bouchard, 2001; Richards *et al.*, 2002, Spencer y Bazer, 2002).

Figura 2. Retroacción entre los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios para el control de la secreción tónica de LH, FSH, estradiol y progesterona durante las fases folicular y lútea



Meza, 2003

La fisiología reproductiva en las hembras es un proceso biológico complejo ya que éstas llevan a cabo dos funciones reproductivas distintas: 1) El desarrollo de los gametos, y 2) El mantenimiento de un feto hasta tenga la capacidad de sobrevivir fuera del útero. Para controlar estas dos funciones, el ovario contiene dos sistemas endocrinos relacionados. El sistema responsable de la oogénesis consiste de una estructura, el folículo, dentro del cual ocurre el proceso de oogénesis y se sintetiza su principal hormona, el E2 y el CL, que es el responsable del mantenimiento de la preñez y tiene como principal compuesto endocrino a la P₄ (Niswender *et al.*, 2000; Buffet y Bouchard, 2001).

Estos dos sistemas funcionan en secuencia de eventos entre los sistemas foliculares y lúteos, lo que da lugar a un ciclo estral de 21 días en la vaca. Durante la fase folicular, el sistema produce un folículo maduro listo para la fertilización; posteriormente durante la fase lútea, la P_4 secretada por el CL, prepara al sistema reproductivo para una posible fertilización del óvulo liberado. Si éste no es fertilizado, entonces ocurre la destrucción del CL y se inicia otro ciclo estral (Smith *et al.*, 1996; Hoyer, 1998; Reynolds y Redmer, 1999).

Las concentraciones séricas de P_4 dependen del volumen de tejido lúteo, la tasa de flujo sanguíneo y la capacidad esteroidogénica del tejido lúteo para sintetizar P_4 , mientras que el tejido lúteo depende a su vez del número y tamaño de las células lúteas, las cuales se incrementan conforme avanza la fase lútea, en forma paralela la tasa de flujo sanguíneo también se ve incrementada (Chabbert-Buffeta, 2000; Niswender, 2000; Tavaniotou *et al.*, 2002).

La P_4 está también parcialmente involucrada en modular el largo del ciclo estral; durante la fase folicular, el tejido endocrino dominante del ovario es el folículo y la ruta esteroidogénica privilegia la síntesis de E2 por lo que los niveles circulantes de P_4 son bajos. Dicho escenario de altos niveles de E2, actúan en el eje hipotálamo-hipofisario para estimular un patrón de pulsatilidad de baja-amplitud y alta-frecuencia de LH, lo cual resulta en elevadas concentraciones circulantes de LH que llevan al desarrollo folicular hasta el punto de ovulación (Chabbert-Buffeta *et al.*, 2000; Buffet y Bouchard, 2001; Pate y Landis-Keyes, 2001).

Posteriormente, conforme inicia el proceso de luteogénesis, las altas concentraciones de P₄ restringen el patrón de secreción de LH a un perfil de baja-frecuencia y alta-amplitud, generando una reducción en la concentración media de LH en la fase lútea. Este decremento sérico de LH por parte de la P₄ es el resultado de su acción sobre el eje hipotalámico-hipofisiario, ya que mientras en el hipotálamo bloquea la secreción pulsátil de GnRH, en la hipófisis reduce el número de receptores a GnRH (Niswender, 2002).

III JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios afirman que un importante indicador para valorar el estado nutricional de los animales es monitorear los perfiles metabólicos (metabolitos de lípidos, insulina IGF-I, leptina), los cuales indican la dinámica del estado nutricional; igualmente mencionan que las concentraciones y movilizaciones de ácidos grasos no esterificados, que por lo regular se presenta en el posparto temprano, también permite determinar el estado nutricional de las vacas (Kronfeld y Medway, 1980; Gagliostro y Cocimano, 1987; Church y Pond, 1997).

Con la intención de mejorar el comportamiento reproductivo posparto en vacas lecheras, se han diseñado diversas estrategias, que incluyen la manipulación hormonal o el manejo alimenticio a través de la inclusión de ingredientes específicos (energía o proteína) en la dieta. En este sentido, diversos estudios han reportado efectos positivos de la suplementación con lípidos, especialmente ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, sobre la capacidad reproductiva en diversas especies de animales domésticos, como vacas (Thomas *et al.*, 1997, Fahey *et al.*, 2002) y ovejas (Herrera *et al.*, 2001; Cansino *et al.*, 2003); específicamente sobre la dinámica del crecimiento folicular (Thomas *et al.*, 1997), en la tasa de concepción, en la tasa de gestación, reducción en los días abiertos y disminución en el número de servicios por concepción (Fahey *et al.*, 2002). Otros estudios (Espinoza, 1995; Boland *et al.*, 2001) han reportado que la inclusión de aceite vegetal en la dieta de vacas lecheras puede mejorar el comportamiento reproductivo, promoviendo un retorno más rápido al balance energético positivo durante el periodo posparto y facilitando

con esto el reinicio de la actividad ovárica e incrementando las tasas de concepción al primer servicio.

3.1 HIPÓTESIS

La suplementación con aceite vegetal, rico en ácidos grasos poliinsaturados, modifica el perfil de lípidos y la concentración de progesterona plasmática, permitiendo así un pronto reinicio de la actividad ovárica posparto, lo que representa una alternativa viable que permite optimizar la eficiencia reproductiva de las vacas en lactación.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación con aceite vegetal sobre el reinicio de la actividad ovárica posparto a través de los niveles sanguíneos de P_4 , la concentración sanguínea de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) y metabolitos de lípidos en vacas lecheras suplementadas con aceite vegetal.

3.2.2 Objetivos particulares

I

- a) Determinar la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) en vacas lecheras en diferente estadio fisiológico (preparto y posparto temprano).
- b) Determinar la concentración de P_4 en el posparto de vacas lecheras estabuladas, suplementadas con aceite vegetal.
- c) Determinar el reinicio de actividad ovárica posparto a través de los niveles sanguíneos de P_4 .
- d) Determinar los niveles sanguíneos de metabolitos de lípidos, en vacas lecheras suplementadas con aceite vegetal, durante el posparto.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de investigación.- El presente estudio se realizó en la Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en el Municipio de Tarímbaro Michoacán, México; localizada a 19° 48'' de latitud norte y 101° 11'' de longitud oeste, a una altura de 1860 msnm, con una temperatura media de 18.4° C y una precipitación pluvial anual de 777.5 mm (García, 1988).

El estudio se dividió en dos experimentos:

Experimento 1. El objetivo fue determinar cambios en la condición corporal (CC), peso vivo (PV) y la concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) en el parto y en el posparto temprano en vacas lecheras.

Animales.- se utilizaron 12 vacas de la raza Holstein, en buen estado de salud y sin problemas reproductivos; con una condición corporal promedio de 3.5 ± 0.1 en la escala de 1 a 5 y con un peso corporal promedio de 559.11 ± 101.98 Kg.

Alimentación.- La dieta suministrada fue de ensilado de maíz y de alfalfa fresca como fuente de forraje y de concentrado elaborado en la institución, el cual se suministraba en el comedero a las 8:00 y 14:00 h.

Colecta de muestras sanguíneas.- Las muestras de sangre (10 ml) fueron recolectadas una vez por semana durante los 30 días previos y 45 días posteriores al parto; mediante punción de la vena coccígea en tubos vacutainer con ácido tetraaminodiacético (EDTA) al 10%, se mantuvieron en refrigeración durante su transporte al laboratorio y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y el suero se mantuvo en congelación a -20° C hasta su análisis.

Determinación de ácidos grasos no esterificados .- La determinación de NEFAs se realizó utilizando un kit comercial de reacción enzimática (GPO-PAP, Randox Laboratories LTD Ardmore Diamond Road, Crumlin, Co, Antrim, United Kingdom.) de acuerdo a la metodología descrita en el kit comercial (ver anexos) y los cambios de color en cada una de las muestras se midió en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Perkin Elmer, Lambda 40, UV/VIS Spectrometer).

Determinación de la condición corporal y peso vivo.- La condición corporal se determinó a través de la observación directa de los animales en regiones específicas en el tren posterior. Los animales fueron clasificados en las categorías de 1 a 5, donde 1 es emaciado y 5 es muy obeso (Wattiaux, 1998). El peso vivo de los animales se registró una vez por semana durante las 4 semanas previas y 4 semanas posparto de las vacas, el pesaje se realizó en una báscula fija tipo plataforma con cajón de una capacidad de 1500Kg.

Diseño experimental y análisis estadístico.- para determinar si hubo diferencias antes y después del parto en las variables de NEFAs, CC y PV, se utilizó un diseño apareado, usando el promedio de las cuatro mediciones antes el parto y el promedio de las cuatro mediciones posparto, y para probar las diferencias se utilizó una prueba de “t”.

El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, versión 2000).

Experimento 2. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de suplementación de aceite vegetal sobre:

- a) El reinicio de actividad ovárica posparto (RAO) mediante la concentración de P_4 en vacas tanto suplementadas como sin suplementar con el aceite vegetal.
- b) Determinar los niveles sanguíneos de metabolitos de lípidos: Colesterol (Col), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), triglicéridos (TG) y lípidos totales (LT) en vacas lecheras suplementadas con aceite vegetal.

Animales.- Se utilizaron 18 vacas Holstein con un peso promedio de 597 ± 18.8 y una condición corporal promedio de 3.2 ± 0.1 , las cuales se distribuyeron al azar en dos grupos: grupo testigo o control (SG; n= 9) sin suplementación de aceite vegetal y un grupo experimental (CG; n= 9) con suplementación de aceite vegetal.

Alimentación.- El suministro del alimento (BS) fue del 2.5% del peso vivo de los animales, que consistió en forraje y concentrado en una proporción de 60:40. El forraje proporcionado fue heno de alfalfa mitad de floración y ensilado de maíz (sin grano). El concentrado se suministró dos veces al día, a las 08:00 y a las 14:00 h de manera individual. En el cuadro 2 se muestran los ingredientes utilizados, sus porcentajes y el contenido nutricional estimado del concentrado.

Cuadro 2. Ingredientes utilizados y contenido nutricional en los concentrados con y sin aceite vegetal (BS)

Ingredientes utilizados			Aporte estimado de nutrientes en las dietas		
Ingrediente	Inclusión de ingredientes (%)		Elemento nutritivo	Sin aceite	Con aceite
	Sin aceite	Con aceite			
Gluten	18.54	26.07	Proteína cruda (%)	18.00	21.85
Sorgo	78.11	70.54	Energía metabolizable (MCal/kg)	3.0	3.0
Ortofosfato	0.66	1.05	Fibra cruda %	2.1	2.2
Carbonato de calcio	2.09	1.75	Calcio %	1.0	1.0
Vitaminas	0.2	0.2	Fósforo (%)	0.50	0.57
Sal	0.4	0.4			

La suplementación con aceite vegetal inició el día 15 posparto y hasta el día 60 posparto y se ofertaron 500 g/día/vaca.

Se cuidó que la ingesta de energía y proteína aportado por el concentrado fuera similar tanto para las vacas que recibieron suplementación, como para las que no lo

recibieron; para lograr esto, las vacas que recibían la suplementación de aceite de maíz se les suministraba 1.21 kg (MS) menos de concentrado para ajustar la energía comparado con las vacas que no recibían suplementación, aunado a que el concentrado tenía mayor concentración de proteína para compensar la reducción en el suministro de concentrado.

Colecta de muestras sanguíneas.- La toma de muestras se realizó con la misma metodología expuesta para el experimento 1. Las muestras se colectaron desde la primera semana posparto, una vez por semana y hasta el final de la suplementación.

Determinación de progesterona (P_4)

La determinación de P_4 se realizó través de radioinmunoanálisis de fase sólida utilizando la metodología descrita en el kit comercial (ver anexo 2) (Coat-A-Count; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), una vez que se colectaron el total de muestras en cada una de las vacas. Los ensayos hormonales fueron realizados en el departamento de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Determinación de metabolitos de lípidos

La determinación de metabolitos de lípidos (colesterol, lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja densidad, triglicéridos y lípidos totales), se realizaron en el laboratorio de nutrición del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, utilizando un kit comercial de reacción enzimática (GPO-PAP, Randox Laboratories LTD Ardmore Diamond Road, Crumlin, Co, Antrim, United Kingdom.) y siguiendo los procedimientos descritos en él. Los cambios de color en cada una de las muestras se midió en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Perkin Elmer, Lambda 40, UV/VIS Spectrometer).

Diseño experimental y análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la concentración plasmática de metabolitos de lípidos y progesterona se analizaron mediante un análisis de varianza en un modelo mixto con medidas repetidas, donde el efecto fijo fue el tratamiento y el efecto aleatorio fue cada una de las vacas dentro del estudio y la medida repetida cada una de las muestra colectadas semanalmente.

Los análisis de los datos se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, versión 2000, mediante el procedimiento Mixed).

Se consideró el RAO como el día en que el nivel de P_4 determinado en sangre fue mayor a 1 ng/ml y la comparación entre ambos tratamientos se realizó mediante una prueba de X^2 .

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los nutrientes, componentes básicos de los alimentos, que afectan de una manera directa o indirecta la capacidad reproductiva de los animales domésticos son principalmente la energía y la proteína; y las vías por las cuales estos nutrientes se relacionan con la reproducción son: - Vía metabólica, aportando los precursores como el colesterol, necesarios para la síntesis de hormonas esteroideas (estradiol y progesterona); - Vía hormonal, estimulando los mecanismos de síntesis hormonal en diferente nivel del eje hipotálamo hipófisis gónadas (ej energía>gonadotropinas). Ambas vías están estrechamente relacionadas y es a través de ellas que la nutrición puede ejercer una influencia positiva o negativa sobre algunos indicadores reproductivos.

5.1 Ácidos grasos no esterificados (NEFAs)

La concentración media (\pm ee) de ácidos grasos no esterificados durante el parto fue de 0.71 ± 0.09 Mmol/l y en el posparto de 0.89 ± 0.09 Mmol/l; sin embargo, estas diferencias no fueron significativas, no obstante, se observó que a medida que se incrementa la concentración sanguínea de este metabolito, la condición corporal y el peso vivo tienden a disminuir. La concentración media observada en el presente estudio fue ligeramente superior a lo reportado por Cevallos *et al* (2002), quienes encontraron una media de NEFAs de 0.6 y 0.7 mMol/L en el parto y posparto en vacas Holstein, sin que las diferencias que observaron entre los dos estados fisiológicos fueran significativas.

En la figura 3, se muestra el comportamiento en la concentración sanguínea de NEFAs, donde los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que el ganado bovino mantenido en confinamiento y en producción de leche, inicia con el balance energético negativo, una semana previa al parto, ya que es el momento donde se observó un incremento en la concentración de NEFAs de alrededor de 0.30 Mmol/l, respecto a las tres semanas previas, esta situación se mantuvo durante las dos primeras semanas posparto, a partir de las cuales la concentración del metabolito disminuye, indicando una menor severidad en el balance energético negativo, debido posiblemente a la suplementación de buena calidad que se les proporciona a las hembras en producción láctea.

Un comportamiento similar fue reportado por Andresen (2001), Correa (2002), y Butler (2003) donde dichos autores observan un comportamiento similar al encontrado en el presente trabajo, donde la concentración de NEFAs se incrementan al doble o más entre las 2 a 3 semanas previas al parto; a partir de ese día hay un incremento dramático hasta la culminación del parto, y los niveles caen después del mismo. Pate (1999) menciona que durante las 2 a 4 semanas antes del parto se produce un aumento sustancial de las necesidades energéticas debido al desarrollo fetal y a las necesidades de síntesis de calostro.

Otros estudios realizados por Canfield y Butler (1990) reportaron una correlación negativa elevada entre el balance energético negativo y los niveles de NEFAs en plasma; lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde a mayor

pérdida de condición corporal, el balance energético negativo se torna más intenso y en consecuencia los niveles sanguíneos de NEFAs se incrementan como consecuencia de la movilización de reservas corporales.

Por otra parte, De Luca (2003) reporta que entre el final de la gestación y el inicio de la lactancia, se presentan cambios endocrinológicos que promueven la neoglucogénesis, la cetogénesis y la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo; disminuyendo la concentración sérica de insulina y aumentando la concentración de glucagón. Este mismo autor, sugiere que durante los días previos al parto, se incrementan las concentraciones de lactógeno placentario y de prolactina, y en el posparto los valores de somatotropina sérica aumenta de manera importante.

Estos cambios hormonales requieren de una elevada cantidad de energía, que si no es provista en el alimento proporcionado a las hembras, trae como consecuencia la movilización de las reservas corporales, incrementando la liberación de los ácidos grasos libres o no esterificados (NEFAs) del tejido adiposo, invirtiendo la relación lipogénesis/lipólisis.

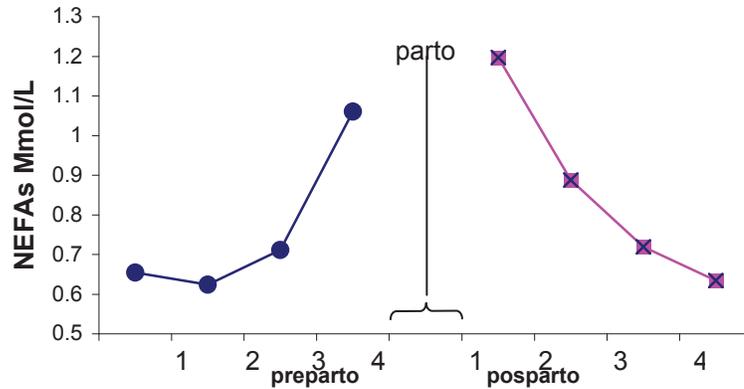


Figura 3. Concentración de ácidos grasos no esterificados cuatro semanas previas al parto y cuatro semanas posparto.

5.2 Condición corporal (CC) y peso vivo (PV)

En la CC se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), observando reducción de 3.4 ± 0.09 puntos durante el preparto a 3.1 ± 0.09 puntos en el posparto. Una respuesta similar fue observada en el PV (Figura 4), variable que presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ambos estados fisiológicos, observando un peso promedio de 580.7 ± 29.63 vs 537.5 ± 29.63 kg durante el preparto y el posparto, respectivamente.

Es importante señalar que de manera natural las vacas, desde el momento del parto, pierden PV debido principalmente por la pérdida de líquidos, membranas fetales y la

cría, lo que representa alrededor del 10% del PV de la hembra, pérdida que puede ser superior, si se no se provee de una alimentación de calidad en el parto, que puede incluso afectar la CC y en consecuencia, comprometer la productividad láctea y el reinicio de la actividad ovárica, como consecuencia de una inactividad del eje hipotálamo hipófisis gónadas provocada por el ambiente hormonal que precede al parto.

El intervalo parto reinicio de actividad ovárica (anestro posparto) es controlado por varios factores, incluyendo la recuperación de las gonadotrofos de los efectos de retroalimentación negativa que ejercen las altas concentraciones de estrógenos placentarios circulantes (Williams y Stanko, 1999), la severidad de la pérdida en la condición corporal o reservas corporales al momento del parto (Randel, 1990, Short et al., 1990), y la frecuencia del amamantamiento (Williams y Griffith, 1995). Estos factores de manera aislada o conjunta, ejercen una marcada influencia negativa para que el eje hipotálamo hipófisis, generen la síntesis de GnRH y LH, ambas hormonas necesarias para el desarrollo de un folículo preovulatorio con actividad estrogénica y la ovulación.

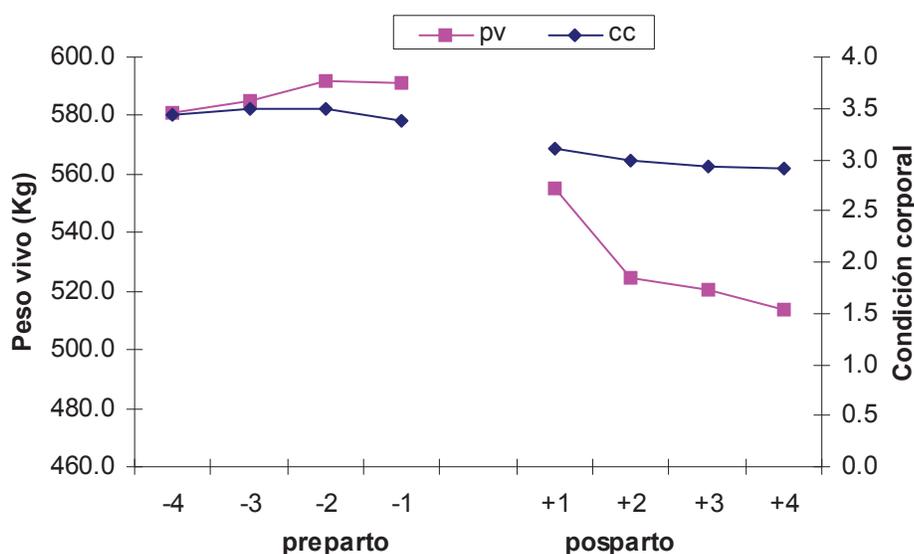


Figura 4. Peso vivo y condición corporal durante el preparto y el posparto en vacas lecheras estabuladas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, coinciden con lo reportado por Cevallos *et al* (2002), quienes observaron una respuesta similar ya que encontraron diferencias significativas en la CC entre el preparto y el posparto (3.5 vs 3.0 puntos, respectivamente) en vacas lecheras de la raza Holstein, dichos cambios fueron atribuidos a una disminución en el consumo de materia seca y al aumento en los requerimientos nutricionales, lo que obliga a las vacas a recurrir a sus reservas energéticas para mantener la producción de leche, mediante cambios metabólicos caracterizados por un aumento de la lipólisis y una disminución en la lipogénesis, lo que provoca pérdida de peso y baja de la condición corporal, lo que es característico al inicio de la lactancia.

Igualmente los trabajos realizados por Nebel y McGuilliard (1993) observaron que durante los primeros días de lactación, las vacas lecheras presentan un balance

energético negativo, lo que se traduce en una disminución en el PV y en la CC; lo que puede deberse a que la alimentación recibida durante este periodo no cubre las necesidades para la lactación o también a que los niveles de producción son de una magnitud tal, que obliguen a las vacas a remover las reservas corporales.

Wherman et al., (1991) reportan un incremento de hasta el 18% de vacas que ciclaron cuando fueron suplementadas con 360 g de grasa en forma de semilla de algodón. El mismo efecto fue observado por Espinoza (1995) en gando *Bos taurus* de carne (Angus y Hereford), suplementado con grasas protegida (Megalac) quien encontró una disminución en la condición corporal posparto en vacas que no recibieron la fuente de grasa adicional, comparado con el grupo que recibió 125 g de Megalac por día, donde la CC a los 35 y 50 días posparto para el grupo control y con grasa fue de 3.40 ± 0.13 vs 4.10 ± 0.12 y 2.25 ± 0.11 vs 3.60 ± 0.10 , respectivamente. Estos resultados indican que la suplementación con elementos nutritivos específicos como la grasa, ya sea natural o protegida, pueden amortiguar la pérdida de la condición corporal durante el posparto y en consecuencia revertir el anestro posparto (Williams y Stanko, 1999).

5.3 Concentración de progesterona plasmática

En cuanto a la P_4 , se encontró una concentración media ($\pm ee$) similar ($P > 0.05$) entre ambos grupos (1.48 ± 0.3 ng/ml vs 1.15 ± 0.3 ng/ml, SG y CG, respectivamente); sin embargo, al comparar entre semanas de muestreo los resultados presentaron una

tendencia diferente, ya que si bien no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre tratamientos en las semanas 1, 2 y 3, estas diferencias ($P<0.01$) si fueron evidentes a partir de la semana 4 y hasta la semana 8 de suplementación.

Esta respuesta puede ser debido a que las vacas en las primeras tres semanas posteriores al parto presentaron una gran movilización de reservas corporales y coincide con la pérdida más severa de peso y condición corporal, y aunque la suplementación con aceite vegetal inició desde la semana dos posparto, la respuesta se observa partir de la semana cuatro donde las hembras comienzan a recuperar el balance energético que puede ser atribuido a la suplementación grasa, por lo que la energía circulante puede ser utilizada para la síntesis de hormonas esteroideas, principalmente progesterona (Fahey et al., 2002).

Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo han sido presentados por Fahey et al 2002, quienes no observaron diferencias significativas en la concentración media de progesterona en las vacas que fueron suplementadas con grasa, respecto a las que recibieron suplementación (1.79 ± 0.15 vs 1.83 ± 0.16).

Lammoglia *et al.* (1996) reportan resultados similares a los encontrados en el presente trabajo, donde la concentración media de P_4 fue menor en las vacas suplementadas. En otro estudio, Lammoglia *et al* (2000), trabajando con novillas encontraron una concentración mayor de la hormona en aquellas hembras que fueron suplementadas con 4.4% de grasa, respecto a las que recibieron 1.9% de grasa del total

de la materia seca de la dieta. Por el contrario, Robinson *et al* (2002), encontraron una menor concentración de progesterona en vacas en lactación, suplementadas con dos tipos de ácidos grasos poliinsaturados (linolénico y linoleico), respecto al grupo que no recibió grasa en la dieta (control), lo cual coincide con el presente estudio donde las vacas que no fueron suplementadas con grasa presentaron una mayor concentración de la hormona.

Petters y Lamming (1986) y McDougall y Hampson (1992), reportaron que el incremento en los niveles de P₄ circulante que se presenta a partir de las cuatro semanas posparto puede estar relacionado con un incremento de los niveles de metabolitos circulantes, así como al incremento en el nivel de energía disponible, lo cual es posible lograr con la suplementación de aceites vegetales. Estos mismos autores, al igual que Francisco (2002) y Diaz *et al* (2002) mencionan que cuando el nivel sérico de P₄ alcanza concentraciones mayores a 1 ng/ml se reinicia la actividad ovárica seguida de ovulación.

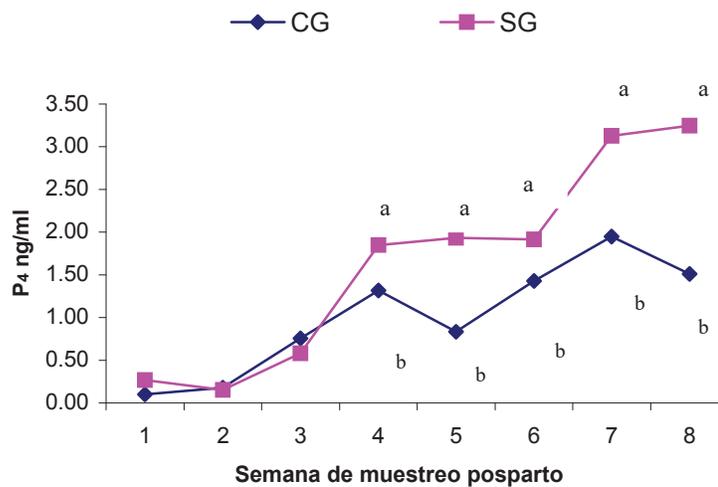


Figura 5. Concentración plasmática de progesterona en vacas lecheras suplementadas sin (SG) y con aceite vegetal (CG). Distinta literal en el mismo punto de muestreo indica diferencias significativas entre tratamientos.

Lucy y Crooker (2001), mencionan que es posible observar bajos niveles de progesterona, en vacas lecheras de alta producción, como consecuencia de un incremento en el metabolismo hepático para la producción de leche. Mientras que Hawkins *et al* (1995), sugieren que el incremento en la concentración de progesterona en vacas suplementadas con grasa, se debe a una disminución en la tasa de eliminación y no necesariamente a un incremento en la síntesis de la hormona.

Diversos estudios han demostrado que es posible aumentar la concentración energética de las raciones cuando se suplementa con aceites vegetales y con ello promover la producción de hormonas de naturaleza esteroide, debido principalmente, a un aumento de los precursores como el colesterol (Aranda *et al.*, 2002).

5.3 Reinicio de actividad ovárica posparto (RAO)

En el intervalo del parto al RAO no se encontró diferencia ($P > 0.05$) entre tratamientos; sin embargo, se observó una reducción de alrededor de siete días (Figura 6) en el grupo suplementado con grasa con respecto al grupo que no recibió grasa en la dieta ($23.3^a \pm 12.8$ d, vs $29.6^a \pm 12.4$ d, respectivamente). Por otra parte, es importante mencionar que una de las hembras del grupo suplementado con grasa, en ninguno de los

muestreos realizados durante el posparto, se detectaron concentraciones de progesterona ≥ 1 ng/ml, por lo tanto fue retirada del estudio, de esta manera, se observó que el total de las vacas de ambos tratamientos reiniciaron actividad ovárica antes de los 60 días posparto.

En la figura 6, se muestra la distribución de el reinicio de actividad ovárica durante el periodo de trabajo, y es posible detectar que el 50% de las vacas suplementadas con grasa, reiniciaron actividad ovárica dentro de las primeras dos semanas posparto, mientras que en el grupo sin suplementación el RAO se concentro entre la semana 3 y 4 posparto. Es preciso señalar que estos últimos datos no fueron sometidos a un análisis estadístico, dado el pequeño numero de ellos.

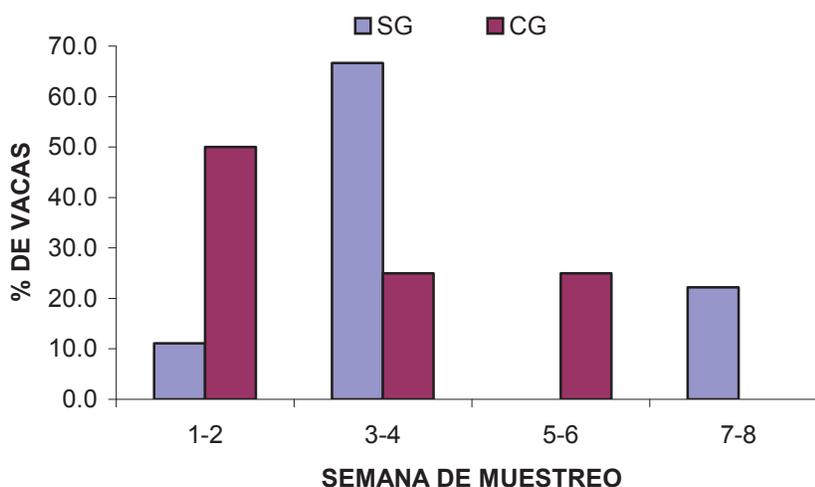


Figura 6. Distribución del momento del reinicio a actividad ovárica posparto en vacas lecheras sin suplementación (SG) y con suplementación con aceite vegetal (CG).

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo presentado por Sepúlveda et al (2001), quienes encontraron que las vacas lecheras adultas reinician su actividad ovárica a los 23 ± 5 días posparto. Fahey et al (2002), al igual que en este estudio no encuentran diferencias en el intervalo parto primer servicio, entre novillas con y sin suplementación grasa (61.2 ± 5.2 vs 57.1 ± 5.3 d, respectivamente), una respuesta similar es observada por estos mismos autores trabajando con vacas multíparas, donde los valores de dicho intervalo son de 63.0 ± 2.5 vs 62.3 ± 2.5 , para el grupo sin y el grupo con suplementación grasa respectivamente. Es importante hacer notar, que si bien no existen diferencias significativas en el intervalo parto primer servicio, existe una tendencia de los grupos suplementados con grasa a presentar respuesta más temprana que los grupos no suplementados. Villagómez et al (2003), trabajando con vacas Indobrasil suplementadas con grasas protegidas (jabones de calcio de ácidos grasos), encontraron que tuvieron menores intervalos del parto a la primera ovulación y al primer estro posparto, en comparación con las que recibieron la dieta testigo.

El mecanismo mediante el cual la suplementación grasa reduce el intervalo anestro posparto, no es del todo claro; sin embargo, la información existente, indica que puede ser mediante dos mecanismos, uno promoviendo la actividad ovárica a través del desarrollo de folículos capaces de lograr la ovulación o bien por un ajuste en los requerimientos energéticos suficientes para provocar la liberación de LH y en consecuencia la ovulación.

En un estudio realizado por Hightshoe et al (1991), encontraron que las vacas suplementadas con jabones de calcio de ácidos grasos, presentaron un mayor número de folículos preovulatorios respecto al grupo control, lo que indica un efecto favorable de la grasa sobre la actividad del ovario en el posparto.

El suministrar dietas suplementadas con grasa, tanto en ganado lechero como de carne, puede resolver parcialmente el balance energético negativo posparto permitiendo la liberación hipofisiaria de LH y estimular la función ovárica (Lucy et al., 1989, Lucy et al., 1991). Al respecto, en un estudio se observó que la concentración media de LH durante tres periodos alrededor del destete de la cría, fue mayor en vacas que recibieron grasa saponificadas en comparación con las vacas testigo (Hightshoe et al., 1991). Así mismo, Lucy et al (1989), demostraron que vacas lecheras que recibieron el mismo tipo de grasa presentaron una mayor concentración de LH basal durante el posparto temprano, y en un estudio con vacas ovariectomizadas que recibieron grasas protegidas durante el posparto temprano, se observó una mayor concentración de LH en respuesta a la GnRH exógena.

Lucy *et al* (1994) observaron que la magnitud en la deficiencia energética afecta los procesos de crecimiento y desarrollo folicular principalmente en la primera ovulación posparto; lo que ocurre por combinación de eventos relacionados con el balance energético negativo y que se caracteriza por cambios en la concentración de hormonas y metabolitos circulantes, así como interacción entre los centros del cerebro con el hipotálamo y la pituitaria, dando como resultado que la vaca con un balance energético muy severo es muy probable que permanezca en anestro.

Aunque esto se da en respuesta a un proceso cíclico que comienza en el hipotálamo a recibir señales hormonales y nerviosas, lo que lo lleva a secretar GnRH, la cual estimula a la pituitaria anterior para que se lleve a cabo la síntesis y secreción de FSH que a nivel de ovarios estimulan el crecimiento folicular y, en consecuencia, la secreción de estrógenos, los cuales se incrementan a medida que los folículos crecen. Los estrógenos, en el folículo preovulatorio, promueven el incremento de receptores a LH y actúan además sobre el hipotálamo para que libere GnRH, la cual actúa sobre la pituitaria estimulando la síntesis y secreción de LH; esta hormona actúa sobre el ovario, induciendo a la ovulación del folículo y posterior formación del cuerpo lúteo, donde se sintetizan y secreta progesterona, que actúa sobre el hipotálamo para que secrete más GnRH, y este a su vez estimule la síntesis y secreción de más LH (Lucy *et al.*, 1994). El cuerpo lúteo, es lisisado por la secreción endometrial de PGF2_α , se reduce la secreción de progesterona y nuevamente se incrementa la síntesis y secreción de FSH, para reiniciar el ciclo (Correa, 2002).

Por otra parte, algunos estudios han demostrado que la suplementación con grasa puede incrementar, la liberación de PGF2_α , lo cual se ha postulado que funciona como un importante modulador en el reinicio de los ciclos estrales durante el posparto en ganado bovino (Lucy *et al.*, 1989), efecto que también ha sido observado en cerdas (Chartrand *et al.*, 2003).

5.4 Metabolitos de lípidos

En la concentración sérica de metabolitos de lípidos (Cuadro 3) se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en colesterol y lípidos totales, observando una concentración media de 109.3 ± 9.9 vs 135.7 ± 9.9 y de 366.2 ± 50.3 vs 434.2 ± 50.3 para el grupo de vacas que no recibieron suplementación grasa y con suplementación grasa, respectivamente. Las lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 3. Concentración media (\pm ee) de metabolitos de lípidos en vacas lecheras sin suplementación grasa (SG) o con suplementación grasa (CG).

Metabolito de lípido	Tratamientos	
	Sin Grasa (n=9)	Con Grasa (n=9)
Colesterol	109.3 ± 9.9 ^a	135.7 ± 9.9 ^b
Lipoproteínas de alta densidad	120.9 ± 27.7	116.5 ± 27.7
Lipoproteínas de baja densidad	134.3 ± 12.8	143.5 ± 12.8
Triglicéridos	29.3 ± 7.9	41.3 ± 7.9
Lípidos totales	366.2 ± 50.3 ^a	434.2 ± 50.3 ^b

^{ab} Distinta literal en la misma fila indica diferencias significativa ($P < 0.05$)

Resultados similares a los obtenidos en este estudio respecto al colesterol, fueron obtenidos por Lammoglia *et al* (1996), quienes observaron que en vacas con diferente concentración de grasa en la dieta (3.74%, 5.20% y 6.55% de la materia seca de la dieta); la concentración media de colesterol durante las primeras semanas posparto fue mayor en las vacas que recibieron la dieta con alta concentración de grasas respecto de las que

recibieron las otras dos dietas. En novillas de carne Lammoglia et al (2000), encontraron una respuesta similar a la observada en este estudio, donde se encontró un efecto significativo de la suplementación con dos niveles de aceite (1.9 vs 4.4 % del total de la MS) sobre la concentración plasmática de colesterol (109.8 ± 2.6 vs 169.8 ± 2.3 , respectivamente).

En otro estudio, Aranda et al (2002), encontraron una respuesta similar a la observada en el presente trabajo, al suplementar vacas multiparas suplementadas con 4% d grasa del total de la materia seca de la dieta, los autores mencionados encontraron una mayor concentración de colesterol en vacas suplementadas con grasa (125.12 mg/dl) respecto a las que no recibieron grasa en la dieta (83.84 mg/dl), así mismo no encontraron diferencias en la concentración media de HDL ni LDL.

En ganado de carne en pastoreo, Espinoza (1995), encontró que la suplementación con grasa protegida (Megalac) a razón de 125 g por vaca por día, modifica significativamente las concentraciones medias de metabolitos de lípidos tales como el colesterol, LAD, LBD, LMBD y triglicéridos, lo cual coincide con el presente trabajo en lo referente al colesterol, es posible que la diferencia en los resultados entre nuestros resultados y los observados por espinoza (1995) sea consecuencia de la severidad en el balance energético negativo, el cual puede ser mayor en el ganado de carne que en el ganado lechero estabulado.

Pate y Condon (1982), mencionan que el colesterol es el precursor principal de la progesterona en el cuerpo lúteo y que ésta estructura puede obtener el colesterol de la síntesis *de novo* a partir del acetato, de esteres de colesterol almacenados dentro de la célula o de las lipoproteínas circulantes en el torrente sanguíneo. Al respecto, algunos estudios realizados *in vitro* han demostrado que las células lúteas bovinas pueden usar lipoproteínas de alta y baja densidad como una fuente de colesterol y que la máxima producción de progesterona requiere la presencia de lipoproteínas (Pate y Condon 1982; Grummer y Carroll, 1988), más que de colesterol libre. Durante la fase luteal del ciclo estral, se presenta una reducción en la concentración sanguínea de colesterol, donde el tejido luteal capta y utiliza el colesterol endógeno para producir progesterona, la cual es regulada por la presencia y disponibilidad de dicho metabolito, y , que al estar disminuido puede afectar la producción de progesterona con los consecuentes efectos sobre la fertilidad (Correa, 2002).

En este sentido, Staples et al., (1998), señalan que la concentración de HDL, raramente se disminuye en vacas sanas, y que pequeños incrementos en la concentración media de colesterol tienen un pequeño efecto sobre la síntesis de progesterona, lo que puede deberse a que las células lúteas utilizan el colesterol almacenado antes que el circulante; sin embargo, la disminución prolongada del colesterol en sangre puede tener un impacto negativo sobre la síntesis de la hormona.

Kuran et al (1999) encontraron que en ovejas suplementadas con jabones de calcio de ácidos grasos, existe una mayor cantidad de lipoproteínas de alta densidad, de baja

densidad y colesterol, en el líquido folicular, que pueden actuar como reservas celulares de colesterol para la síntesis de hormonas esteroideas.

Estudios previos indican que el consumo de grasas en rumiantes promueve un aumento en los niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad (De Luca, 2003; Gerloff y Herdt, 1995). La suplementación de aceite vegetal incrementa de manera importante el transporte de lipoproteínas a partir del intestino delgado, sitio donde se sintetiza la mayor parte del colesterol a partir del acetato en los rumiantes.

Correa (2002), menciona que los bovinos tienen escasa capacidad para sintetizar y secretar lipoproteínas de baja densidad, necesarias para producir triglicéridos en el hígado, pero en el momento del parto se produce un incremento de ellos en el hepatocito, especialmente cuando la vaca se ceba en el período de transición o se le suministra más de 2 kg. de concentrado/día, o el animal presenta un lapso mayor de dos meses en estado no lactante durante el parto.

Las lipoproteínas son agentes esenciales para el transporte de colesterol, necesario para la esteroidogénesis. Carroll *et al.*, 1992_b, demostraron que niveles elevados de LDL y HDL aumentaban la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo en el vacuno lechero. Además de participar en los aportes de colesterol, las lipoproteínas participan en la estimulación directa de la secreción de IGF-I por parte de las células luteales (Bao *et al.*, 1997).

Como lo mencionan algunos autores como Aranda *et al.*, 2002, la grasa de la dieta puede influir sobre la concentración de colesterol y a través de éste, sobre las hormonas esteroideas antes del parto; además de influir sobre la población folicular posparto. También mencionan que la adición de grasa en la dieta aumenta la energía, reduce el balance energético negativo y tiene un efecto positivo sobre la capacidad reproductiva. Entre los principales efectos que representa la adición de grasa en la dieta son: a) Mayor concentración plasmática de progesterona, b) Aumento en el tamaño del folículo ovulatorio, c) Incremento en el número de folículos ováricos, d) Control sobre la regresión del cuerpo lúteo y e) Mejora los índices de concepción y preñez.

Los triglicéridos son el producto de la esterificación de las grasas endógenas y exógenas, que unidas con ciertas proteínas forman complejos llamados lipoproteínas, las cuales son secretadas a la linfa y transportadas a través de la sangre y cuya función principal es el transporte de los lípidos desde el intestino y el hígado hacia los tejidos periféricos. De aquí la importancia que tiene la determinación de las concentraciones de triglicéridos en vacas suplementadas con aceite vegetal sobre las que no fueron suplementadas; encontrando una diferencia en la concentración media de dicho metabolito (41.3 ± 7.9 mg/dl vs 29.3 ± 7.9 mg/dl) a favor de las vacas que recibieron el tratamiento con grasa vegetal, aunque dicho margen no presentó diferencias significativas estadísticamente.

Grummer (1995) y Gerloff y Herdt (1995) reportaron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo, donde a partir del día 6 al 12 se observa la mayor

concentración de triglicéridos y a partir de los días 40 al 45 se estabiliza dicha concentración. De igual forma, Harrison (1990) encontró que del día 5 al día 15 los niveles en la concentración de triglicéridos aumenta de manera considerable; sin embargo del día 15 al día 30, estos valores comienzan a descender, como sucedió en el presente trabajo.

Una revisión realizada por Galvis et al (2005) pone de manifiesto que el papel de los lípidos en la eficiencia reproductiva del ganado, se relaciona no sólo con su utilización como sustrato energético para la síntesis de hormonas proteicas o como precursor de hormonas esteroides, sino también con la disminución del efecto detrimental del BEN que se presenta durante el posparto temprano en el ganado vacuno.

Respecto a los lípidos totales, no existe información que indique su importancia, pero en esencia representan la suma de los metabolitos estudiados en el presente trabajo, más otros de menor densidad, y representan una referencia de la reservas circulantes de lípidos en los animales domésticos; sin embargo, dada su naturaleza, se espera que las vacas suplementadas con grasa presenten valores superiores en la concentración media, que las vacas no suplementadas, por incremento en cualquiera de los metabolitos que incluye.

VII ANEXOS

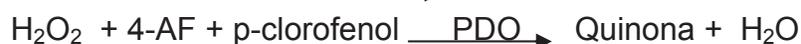
ANEXO 1

TRIGLICÉRIDOS

Test enzimático-colorimétrico (GPO-PAP). Conservar de 2 a 8°C.

FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

Los triglicéridos son hidrolizados enzimáticamente a glicerol, el cual mediante GK y GPO, libera el peróxido de H que se valora mediante la reacción de Trinder, de acuerdo a las siguiente reacciones.



La cantidad de esta quinona formada es proporcional a la filtración de triglicéridos.

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo 1	Tampón GOOD pH 7.5 p-clorofenol	50 mmol/L 2 mmol/L
Reactivo 2	Lipoproteinlipasa	150000 U/L
Vial enzimas	Glicerol kinasa	500 U/L
	Glicerol P-oxidasa	2500 U/L
	Perxidasa	440 U/L
	4-aminofenazona	0.1 mmol/L
	ATP	0.1 mmol/L
Standard	Sol.Triglicéridos	200 mg/dl

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD

Ref: 1001310. disolver el contenido del vial enzimas R.2 con 10 ml de solución tampón R.1.

Ref.1001311, 1001312, 1001313 y 1001314 disolver el contenido del vial enzimas R.2 en el frasco de solución tampón R.1

El reactivo al uso es estable 6 semanas a 2-8⁰C o una semana a 15-25⁰C.

MUESTRA

Suero, plasma heparinizado o con EDTA.

Los triglicéridos son estables en suero 3 días a 2-8⁰C.

TÉCNICA

	Blanco	Standard	Muestra
Standard	--	10 μ L	--
Muestra	--	--	10 μ L
Reactivo al uso	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

Mezclar e incubar 5 min a 37⁰C o 10 min a T^a ambiente.
Medir a D. Op. A 505 nm (490-550), frente al blanco de reactivos.
El color es estable 30 min.

Cálculo

D. Óptica muestra

————— X conc standard = conc muestra

D. óptica standard

Factor de conversión: mg/dL x 0.0113 = mmol/L

Conc. standard: 200 mg/dL

Linealidad

El método es lineal hasta valores de 1000 mg/dL (11.3 mmol/L)

Para concentraciones superiores se deberá diluir la muestra a 1:2 con solución salina, multiplicando el resultado por 2.

VALORES NORMALES

Valores sospechosos a partir de 150 mg/dL (1.7 mmol/L)

Valores elevados a partir de 200 mg/dL (2.26 mmol/L)

Bibliografía

Young D. Pestaner, L. Clin. Chem.. 21, 5 (1975)

Printer, J. Hayasni, J. Arch. Biophy 121, 404 (1966)

Control de calidad

SPINTROL. Normal y patológico

PRESENTACIÓN

Ref: 1001310 5x10mL

Ref: 1001311 10x20mL

Ref: 1001312 10x50mL

Ref: 1001313 4x125mL

Ref: 1001314 4x250mL

ANEXO 2

Coat-A-Count Progesterona

Utilidad del análisis: Coat-A-Count Progesterona es un radioinmunoensayo ¹²⁵I en fase sólida diseñado para la medición directa y cuantitativa de progesterona en suero o plasma. Está diseñado estrictamente para uso diagnóstico *in vitro* en el diagnóstico y tratamiento de desórdenes ováricos ó de placenta.

Referencia: TKPG1 (100 tubos), TKPG2 (200 tubos), TKPG5 (500 tubos), TKPGX (1000 tubos)

El estuche de 100 tubos contiene menos de 5 microcurios (185 kilobequerelios) de progesterona radioactiva ¹²⁵I; el estuche de 200 tubos contiene menos de 10 microcurios (370 kilobequerelios); el estuche de 500 tubos contiene menos de 25 microcurios (925 kilobequerelios); y el estuche de 1000 tubos contiene menos de 50 microcurios (1850 kilobequerelios).

Resumen y Explicación del Test

La progesterona es una hormona esteroide que juega un importante papel en la preparación y vigilancia del embarazo. Está sintetizada a partir del colesterol por medio de la pregnenolona y luego rápidamente metabolizada a pregnandiol, en gran parte, en el hígado.^{2,9,13} El ovario y la placenta son los sitios de mayor producción; pero una pequeña parte también es sintetizada por la corteza suprarrenal tanto en hombres como en mujeres.

Los niveles de progesterona circulante, que son característicamente bajos durante la fase folicular, aumentan intensamente durante la fase lútea de los ciclos menstruales, alcanzando un máximo de 5 a 10 días después del pico LH a mitad del medio ciclo.^{12 A}

menos que se produzca el embarazo, se produce una aguda declinación hasta niveles foliculares, hasta aproximadamente 4 días antes del siguiente periodo menstrual. Este patrón confirma la utilización de las medidas de los niveles de progesterona como un método simple y fiable para detectar la ovulación.^{3,4,16}

Cada vez hay más literatura sobre trastornos de la fase lútea.^{5,8,11,17,18} Los niveles diarios de progesterona son considerados el medio más exacto para documentar una fase lútea alterada.^{5,8} Sin embargo, algunos investigadores han encontrado que tres muestras^{1,10} e incluso una sola muestra^{14,16} (si se planea bien), puede proporcionar una valiosa información sobre la fase lútea.

Las mediciones de progesterona en suero también han sido usadas para revisar la efectividad de la inducción de ovulación,¹⁶ para monitorizar la terapia de reemplazo de progesterona,⁶ y para detectar y evaluar a pacientes con riesgo de aborto durante las primeras semanas del embarazo.^{6, 15} Por otro lado, aunque los niveles de progesterona aumentan durante el embarazo, no son considerados como un criterio apropiado para monitorizar el bienestar fetal durante el tercer trimestre.⁹

Principio del análisis

El ensayo Progesterona Coat-A-Count Progesterona es un radioinmunoensayo de fase sólida, donde la progesterona marcada con I^{125} compete por un tiempo fijo con progesterona de la muestra del paciente por sitios de unión al anticuerpo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar con la competencia y aislar la fracción unida al anticuerpo de la progesterona marcada con I^{125} . La lectura del tubo en un contador gamma, proporciona entonces, un número que se convierte por medio de una curva de calibración, en una medida de la progesterona presente en la muestra del paciente.

No Extracción: Las determinaciones de progesterona con el método Coat-A-Count no requieren ni extracción ni predilución.

Reactivos a pipetear: 1

Tiempo total de incubación:

Procedimiento Básico: 3 horas a temperatura ambiente (15-28°C).

Procedimiento Alternativo: 1 hora a 37°C.

Cuentas totales de la iodación: aproximadamente 70 000 cpm

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Almacenar de 2-8°C en una cámara preparada para almacenar material radioactivo. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

No usar los reactivos después de su fecha de caducidad.

Algunos componentes suministrados en el kit pueden contener material de origen humano y/o otros componentes potencialmente peligrosos que necesiten ciertas precauciones.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al HIV 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sódica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante.

Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Radioactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EEUU se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radioactivo. Estos materiales radioactivos pueden adquirirse por cualquier cliente con la licencia específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radioactivos pueden adquirirse solo por médicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y hospitales - y estrictamente para la clínica *in vitro* o test de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radioactivo o su radiación a humanos u otros animales. Su adquisición, recepción, almacenaje, uso, transferencia y desecho están regulados y se expenderá una licencia (general o específica) de la Comisión Nuclear de EEUU o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radioactivos de acuerdo a los requerimientos de su licencia general o específica. Para minimizar la exposición a la radiación, el usuario debe adherirse al cuarto conjunto de guías publicadas por el National Bureau of Standards con el nombre *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) Y en las consiguientes publicaciones de las autoridades Federales o Estatales.

Limpiar y descontaminar rápidamente las superficies afectadas. Evitar la generación de aerosoles. Eliminar los residuos sólidos radioactivos de acuerdo con los requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radioactivos como residuos no radioactivos, después de retirar las etiquetas. Licencias específicas (NRC Form 313) se deben referir al Título 10, Código de Regulaciones

Federales; Parte 20. Las licencias en Estados Unidos deben referirse a las normativas de su correspondiente Estado. Licencias generales pueden eliminar sus residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido, quitando las etiquetas de los contenedores y procesándolos como residuos sólidos. Licencias específicas pueden eliminar pequeñas cantidades de residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

Materiales Suministrados: Preparación Inicial

Tubos Recubiertos con Anticuerpos anti-Progesterona (TPG1)

Tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos de conejo anti-progesterona y empaquetados en bolsas con cierre.

Almacenar refrigerados y protegidos de la condensación, cerrando cuidadosamente las bolsas después de su uso. Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa. Color: terracota.

TKPG1: 100 tubos. TKPG2: 200 tubos. TKPG5: 500 tubos. TKPGX: 1000 tubos.

I^{125} progesterona (TPG2)

105 ml de progesterona yodada, con conservante. Estable a 2-8°C durante 30 días después de abrir ó hasta la fecha de caducidad señalada en la etiqueta. Color: claro.

TKPG1: 1 vial. TKPG2: 2 viales. TKPG5: 5 viales. TKPGX: 10 viales.

Calibradores de Progesterona (PGC3-9)

Siete viales de calibradores de progesterona, listos para usar, en matriz de suero humano, con conservante. El calibrador cero A contiene 4,0 ml, mientras que los calibradores restantes, de B a G, cada uno contiene 2 ml. Almacenar refrigerado: estable a 2-8°C durante 30 días después de abrir o hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta.

TKPG1: 1 juego. TKPG2: 1 juego. TKPG5: 2 juegos- TKPGX: 3 juegos.

Los calibradores representan, respectivamente 0, 0,1, 0,5, 2, 10, 20 Y 40 nanogramos de

progesterona por mililitro (ng/ml), equivalentemente: 0, 0,3, 1,6, 6,4, 31,8, 63,6 Y 127,2 nanomoles por litro (nmol/l).

Materiales Requeridos pero no suministrados

Contador Gamma compatible con los tubos de 12x75 mm.

Vortex

Radioinmunoensayo

Tubos de polipropileno de 12x75 mm para usar como tubos NSB, disponibles en DPC.

Micropipetas: 100 µl Y 1 000 µl.

Baño María - capaz de mantener 37°C requerido sólo para el Procedimiento Alternativo.

No son apropiados ni horno ni parrilla.

Rack de decantación - disponible en DPC.

Papel para gráfica logit-log - disponible en DPC (número de catálogo: ZP797)

Tres niveles de control del inmunoensayo, con matriz de suero humano, conteniendo progesterona como uno de más de los 25 constituyentes sujetos a ensayo, disponibles en DPC (número de catálogo: CON6).

Recogida de la muestra

El paciente no necesita estar en ayunas así como tampoco cualquier otro tipo de preparación. Obtener sangre por venopunción²³ en tubos secos, heparinizados o con EDTA y separar el suero o el plasma de las células.* Se debe anotar la hora de la extracción.

Los estudios muestran que la lipemia puede interferir con el ensayo, por lo que se deber usar una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra antes de ser recibida por el laboratorio; en este caso, los resultados deben interpretarse con

precaución.

Las muestras contaminadas debido a la administración de radioactividad al paciente no se deben usar.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activado res de la coagulación y/o anticoagulantes. El Progesterona Coat-A-Count no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativos.

Volumen requerido: 100 μ l de suero o plasma por tubo.

Almacenamiento: 2-8°C durante 7 días²⁴, o hasta 3 meses congeladas a -20°C.²⁴

Antes del ensayo, llevar todas las muestras a temperatura ambiente (15-28°C) y mezclar por inversión. Alicuotar, si es necesario, para evitar la repetición de congelación y descongelación. No intentar la descongelación de muestras congeladas calentándolas en un baño de agua.

* Se han encontrado disminuciones en los niveles de progesterona en función del tiempo, en muestras de suero tomadas y almacenadas en Tubos con Gelosa.^{20.21.22}

Procedimiento básico del Radioinmunoanálisis

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente (15-28°C) antes de su uso.

1 Tubos de ensayo: Marcar cuatro tubos de ensayo de polipropileno (sin recubrir) 12x75 mm. Tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica) en duplicado.

Al ser característicamente baja la unión no específica en el ensayo Coat-A-Count, los tubos NSB pueden ser omitidos sin comprometer la precisión y control de calidad del ensayo.

Tubos Recubiertos: Marcar con A (unión máxima) catorce Tubos Recubiertos con anticuerpos anti-Progesterona y de B a G por duplicado. Adicionalmente, marcar tubos recubiertos con anticuerpo, también por duplicado, para controles y muestras de pacientes.

Calibradores	ng/ml	nmol/l
A (MB)	0	0
B	0,1	0,3
C	0,5	1,6
D	2	6,4
E	10	31,8
F	20	63,6
G	40	127,2

2 Pipetear **100 µl** del calibrador cero A en los tubos NSB y A Y **100 µl de** cada uno de los calibradores B a G en tubos marcados correspondientemente. Pipetear **100 µl** de cada control y muestra de paciente en los tubos preparados.

Debido a que la progesterona tiene una tendencia de adsorción al plástico y aún más al vidrio, es importante recubrir la punta de la pipeta enjuagando unas cuantas veces en la muestra antes de hacer la transferencia. Es recomendable el uso de micropipeta con punta desechable, cambiando la punta entre muestra y muestra, para evitar la contaminación por arrastre.

Las muestras de pacientes susceptibles de contener concentraciones de progesterona mayores a la del calibrador más alto (40 ng/ml), deben ser diluídas con calibrador O antes de ser analizadas.

3 Añadir 1,0 ml I¹²⁵ Progesterona a cada tubo. Agitar en vórtex.

No se debe tardar más de 10 minutos en la dispensación del trazador. Los laboratorios equipados con dispensador "pipe11or-diluter" pueden realizar los pasos 2 y 3

simultáneamente, pero se deben tomar precauciones para evitar arrastre de una muestra a otra. Dejar los tubos T a un lado para su contaje (paso 6); no requieren más procesamiento posterior.

4 Incubar durante 3 horas a temperatura ambiente (15-28°C).

5 Decantar.

Eliminar toda la humedad visible para mejorar la precisión. Decantar o aspirar el contenido de todos los tubos (excepto los tubos T) y dejar escurrir durante 2 o 3 minutos. Golpear los tubos contra papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

6 Leer durante 1 minuto en un contador gamma.

Procedimiento alternativo

Se puede utilizar una incubación de 1 hora a 37°C en contextos donde es necesaria una respuesta rápida y donde la precisión en la parte baja de la curva no es crítica. El procedimiento es idéntico al Procedimiento Básico detallado arriba, excepto por la incubación modificada en el paso 4:

4 Incubar durante 1 hora a 37°C.

Utilizar un baño María; no son adecuados ni horno ni parrilla.

Cálculo de resultados

Para obtener resultados en términos de concentración a partir de una representación logit-log de la curva de calibración, primero hay que calcular para cada pareja de tubos las cuentas medias por minuto corregidas con el NSB:

Cuentas netas '= (Media CPM) menos
(Media NSB CPM)

Entonces, determinar la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima (MB), tomando las cuentas corregidas con el NSB de los tubos A como 100%:

Porcentaje de Unión = (Cuentas netas / Cuentas MB netas) x 100

(El cálculo puede simplificarse omitiendo la corrección de las uniones no específicas; las muestras dentro del rango de calibración van a dar virtualmente el mismo resultado cuando el porcentaje de unión es calculado directamente a partir de la media de las CPM).

Usando papel gráfico Logit-log, representar el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador no cero y dibujar la línea que pase por esos puntos aproximadamente. Los resultados de las muestras pueden ser leídos en la curva por interpolación.

Es una buena práctica inspeccionar los resultados para comprobar la concordancia entre los replicados, y realizar una gráfica de la curva de calibración (aunque los cálculos se realicen por ordenador) para ver la transformación más apropiada a usar y las posibles desviaciones en los puntos de calibración. También, recomendamos mantener un registro de los siguientes parámetros de la reducción de datos:

$T = \text{Cuentas totales (como cuentas por minuto)} \quad \%NSB = 100 \times (\text{Media cuentas NSB} / \text{cuentas totales})$

$\%MB = 100 \times (\text{Cuentas netas} / \text{Cuentas totales})$

y las "intersecciones" 20, 50 Y 80 por ciento, donde

20% = Concentración al 20 por ciento de unión, etc.

Otras aproximaciones, por ejemplo, logística 4-parámetros, también son aceptables. Ver Dudley AA, et al. "Guidelines for immunoassay data reduction". Clin Chem 1985;31 :1264-71.

Ejemplo:

Procedimiento Básico/ Procedimiento Alternativo

Sólo como ilustración. No se puede utilizar para calcular resultados. (Ver tablas "Procedimiento Básico" y "Procedimiento Alternativo")

Control de Calidad

Los controles (o pool es de suero), con al menos dos niveles de concentración de progesterona - bajo y alto - deberán ser sujetos a ensayo rutinariamente como muestras desconocidas.

Informar de los resultados de los pacientes sólo si los resultados de los controles para este ensayo están dentro de los criterios de aceptabilidad establecidos por su laboratorio.

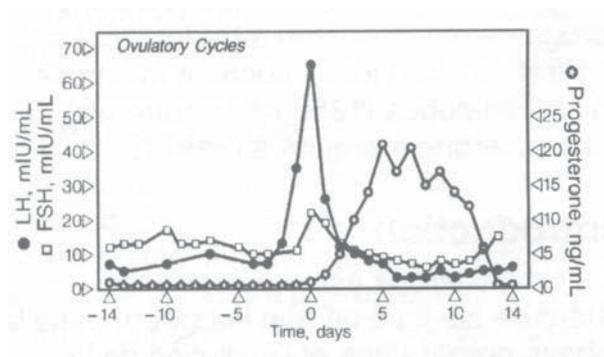
Es una buena práctica de laboratorio registrar para cada ensayo los números de lote de los componentes usados, así como las fechas en las que fueron abiertos por primera vez y reconstituidos. También recomendamos el uso de gráficos diarios de los controles - como se describe, por ejemplo, en Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981 ;27:493-501. Las muestras repetidas pueden servir como una herramienta de valor adicional para monitorizar la precisión interensayo, y que las parejas de los tubos del control pueden espaciarse a lo largo de la tanda de ensayo para verificar la ausencia de deriva significativa.

Valores Esperados: Suero

Los estudios de rango de referencia fueron llevados a cabo utilizando el kit de Progesterona Coat-A-Count. Las poblaciones fueron seleccionadas excluyendo a mujeres con problemas de fertilidad. Los resultados se muestran abajo en *ng/ml* y *nmol/l*. (Observar que las muestras de la fase lútea media constituyen un sub grupo del grupo fase lútea.)

Grupo de Referencia	Mediana ng/ml	Rango Absoluto ng/ml	Rango Central 95% ng/ml	n
Hombres	0,58		0,10-1,2	100
Mujeres				
Fase Folicular	0,41		0,15--1,4	95
Fase Lútea	6,8		1,6-21	85
Fase Lútea Media	13	5,2-23		32
Post Menopausia	0,27	0,11-0,90		20
Anticonceptivos Orales	0,34	0,18-0,64		60
Mujeres Embarazadas				
Primer Trimestre	21	7,4-71		20
Segundo Trimestre	46	18-106		20
Tercer Trimestre	77	41-110		20
Fase Follicular	1,3		0,48-4,5	95
Fase Lútea	22		5,1-67	85
Fase Lútea Media	41	17-73		32
Post Menopausia	0,86	0,35-2,9		20
Anticonceptivos Orales	1,1	0,57-2,0		60
Mujeres Embarazadas				
Primer Trimestre	67	24-226		20
Segundo Trimestre	146	57-337		20
Tercer Trimestre	245	130-350		20

Ciclo Menstrual: El rango de referencia para una mujer en edad fértil (no utilizando anticonceptivos) es una función de su lugar en el ciclo menstrual. Correspondientemente, a quince mujeres ovulando normalmente se les hizo un seguimiento a lo largo de un ciclo utilizando los kits DPC de radioinmunoensayo para FSH, LH y progesterona. Las mujeres gozaban de buena salud y tenían perfiles de FSH y LH normales. Se tomaron muestras en los días 0, 10, 13, 14, 15, 17, 20, 22, 24 y 28, contando a partir del último periodo menstrual. Se logró la normalización del pico de LH, designando para cada mujer el momento con el resultado de LH más alto como día cero. Los perfiles de progesterona así normalizados fueron entonces trazados: la gráfica de abajo describe los resultados medios de FSH, LH y progesterona obtenidos en estas muestras.



Los resultados indican que los valores de progesterona temporalmente aumentan considerablemente durante la mitad de la fase lútea del ciclo menstrual.

Embarazo: En el embarazo la tendencia general es que los valores aumenten. Hay una considerable variación interpersonal en los valores de progesterona, particularmente en grupos asociados con niveles elevados. (Observar que la medición de los niveles de progesterona es generalmente considerado no apropiado para la monitorización del bienestar fetal en las últimas semanas del embarazo.⁹)

Estos límites han de considerarse sólo como una guía. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Características analíticas

Ver la Tablas y Gráficas de los datos *representativos* del rendimiento del kit de progesterona Coat-A-Count. Los resultados de progesterona de las secciones mostradas abajo están expresados en ng/ml. A menos que esté indicado, los resultados de las siguientes secciones se obtuvieron con muestras de suero, utilizando el Procedimiento Básico.

Factor de Conversión:

ng/ml x 3,18 -> nmol/l

Intervalo de calibración: 0,1 - 40 ng/ml (0,3 -127 nmol/l)

Sensibilidad analítica

Procedimiento Básico:

0,02 ng/ml (0,06 nmol/l)

Procedimiento Alternativo:

0,03 ng/ml (0,10 nmol/l)

Precisión intraensayo (dentro del mismo run): Las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos en un solo ensayo. Los resultados son expresados en ng/mL.(Véase la tabla "Precisión intraensayo".)

Precisión interensayo (entre diferentes run): La estadística fue calculada para las muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos en diferentes ensayos de la técnica. Los resultados se expresan en ng/mL. (Véase la tabla "Precisión interensayo".)

Especificidad: El antisuero Coat-A-Count Progesterona es altamente específico para progesterona, con una reactividad cruzada particularmente baja con otros esteroides de producción natural o drogas terapéuticas que puedan estar presentes en las muestras de los pacientes. (Véase la tabla "Especificidad".)

Linealidad: Las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Véase la tabla "Linealidad" para resultados representativos.)

Efecto deriva: Ninguno hasta aproximadamente 500 tubos. (Ver tabla "End-of-Run Effect").

Recuperación: Se han analizado las muestras cargadas 1 a 19 con cinco soluciones (44, 20, 100, 300 Y 500 ng/ml) de progesterona. (Ver la tabla "Recuperación" para resultados representativos.)

Bilirrubina: La presencia de bilirrubina, en concentraciones hasta 200 mg/l, no tiene ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Hemólisis: La presencia de eritrocitos hasta concentraciones de 30 _l/ml no tiene efecto en los resultados, en lo concerniente a la precisión del ensayo.

Lipemia: Puede interferir con el ensayo. (Ver tabla "Lipemia").

Tipo de Muestra Alternativa: Para determinar si los anticoagulantes interfieren con el ensayo, se tomó sangre a 38 voluntarios en tubos vacutainer secos, heparinizados y con EDTA. Todas las muestras fueron sujetas a ensayo con el kit Progesterona Coat-A-Count. Por regresión lineal:

(Heparina) = 0,99 (Suero) - 0,03 *ng/ml*

r = 0,997

(EDTA) = 0,98 (Suero) + 0,01 *ng/ml*

r = 0,997

Medias:

12,8 *ng/ml* (Suero)

12,7 *ng/ml* (Heparina)

12,6 *ng/ml* (EDTA)

Los resultados muestran que el plasma heparinizado y el EDTA proporcionan virtualmente los mismos resultados que el suero con el ensayo Progesterona CoatA-Count.

Comparación de Método: Trescientas cuarenta muestras de suero de pacientes fueron sujetas a ensayo con el procedimiento Progesterona Coat-A-Count y con el kit de Progesterona IMMULITE de DPC, con concentraciones de progesterona que van desde aproximadamente 0,17 a 18 ng/mL. (Ver gráfica "Method Comparision".) Por regresión lineal:

$$(CAC) = 1,05 (IML) + 0,13 \text{ ng/ml}$$

$$r = 0,993$$

Medias:

2,1 *ng/ml* (Coat-A-Count)

1,9 *ng/ml* (IMMULITE)

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

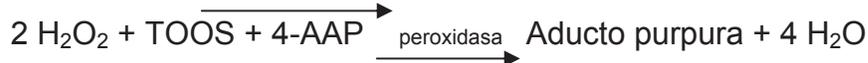
ANEXO 3

NEFAS (Randox) Y METABOLITOS DE LÍPIDOS

Test enzimático-colorimétrico (GPO-PAP). Conservar de 2 a 8⁰C.

FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

Los triglicéridos son hidrolizados enzimáticamente a glicerol, el cual mediante GK y GPO, libera el peróxido de H que se valora mediante la reacción de Trinder, de acuerdo a las siguientes reacciones.



4-AAP = 4-aminoantipirina

TOOS = N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina

MUESTRA

Suero, plasma.

No usar plasma heparinizado ya que la heparina interfiere en el análisis. Los anticoagulantes adecuados son los siguientes:

EDTA, Citrato de Sodio, Fluoruro de Sodio y Oxalato.

REACTIVOS

componentes	concentración de la solución
1. Tampón	
tampón fosfato	0.04 mol/l, pH 6.9
surfactante	3 mmol/l
2. Enzima/Coenzima	
Acil Coenzima A sintetasa	≥ 0.03 U/ml
Ascorbato oxidasa	≥ 1.5 U/ml
Coenzima A	0.9 mmol/l
ATP	5.0 mmol/l
4 amino antipirina	1.5 mmol/l

3. Diluyente de enzimas

Fenoxietanol 0.3% (w/v)

Surfactante

3^a. Maleimida 10.6 mmol/l

4.- Enzima reactivo

Acil Coenzima A Oxidasa ≥ 10 U/ml

Peroxidasa 7.5 U/ml

TOOS 1.2 mmol/l

5. Patrón 1 mmol/l

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Tampón

listo para usar. Estable hasta la fecha de caducidad cuando se conserva entre +2 y +8°C

2. Enzima/Coenzima

Reconstituir un vial de enzima/coenzimas 2 con 10 ml de Tampón 1. Estable durante 5 días entre +2 y +8°C. No congelar. Proteger de la luz.

3. Diluyente de enzimas

listo para usar. Estable hasta la fecha de caducidad cuando se conserva entre +2 y +8°C

3^a. Maleimida

reconstituir el contenido de una botella de Maleimida 3^a con el contenido entero de una botella de diluyente del enzima 3. asegurarse de que la maleimida está completamente disuelta. Usar inmediatamente para reconstituir la botella 4.

4.- Reactivo enzima

reconstituir el contenido de un vial de reactivo enzima 4 con una botella de solución 3^a reconstituida.

Estable durante 5 días entre +2 y +8°C. No congelar. Proteger de la luz.

5. Patrón

Listo para usar. Estable hasta la fecha de caducidad cuando se conserva entre +2 y +8°C.

PROCEDIMIENTO

Longitud de onda:	550 nm
Cubeta:	1 cm de espesor
Temperatura	37°C
Medición:	frente al reactivo blanco

Pipetear en la cubeta:

	Reactivo blanco	Patrón	Muestra	*Muestra blanco
Agua destilada	50 μ L	----	----	----
Patrón	----	50 μ L	----	----
Muestra	----	----	50 μ L	----
Solución 2	1.0 ml	1.0 ml	1.0ml	1.0 ml

Mezclar e incubar a 37°C durante 10 min.

Solución 4	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
Muestra	-----	-----	-----	50 μ L

Mezclar e incubar a 37°C durante 10 min. Leer la absorvancia de la muestra ($A_{muestra}$) y del patrón (A_{patron}) frente a reactivo blanco a 550 nm.

*la muestra blanco solo se requiere en muestras con niveles elevados de bilirrubina o hemoglobina ver nota.

N.B.: tiempo de lectura debe ser exactamente 10 min

CALCULOS

1. utilizando una curva de calibración

La curva de calibración debe ser confirmada para cada nuevo lote de reactivos de la forma siguiente:

No de tubo	1	2	3	4
Nombre	Blanco	Patrón bajo	Patrón normal	Patrón elevado
NEFAs patrón	-----	25 μ L	50 μ L	100 μ L
Agua	50 μ L	25 μ L	-----	-----
Solución 2	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Mezclar e incubar a 37°C durante 10 min.

Solución 4	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
------------	--------	--------	--------	--------

Mezclar e incubar a 37°C durante 10 min.

Abs	0.000	(leer)	(leer)	(leer)
NEFAs conc. (mmol/l)	0.000	0.50	1.00	1.91

Representar la absorvancia (A_{550nm}) frente a concentraciones de NEFAs (mmol/l). Debe ser una línea recta, ya que sigue la ley de Beer y es lineal entre 0. y 2.0 mmol/l.

1. Utilizando patrón

la concentración de NEFAs en una muestra puede ser determinada por medio de la siguiente ecuación.

$$\text{Mmol/l} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{muestra blanco}}}{A_{\text{Patrón}}} \times \text{concentración de patrón}$$

Control de calidad

Para un control de reproducibilidad: multisuero bajo, normal y elevado

Linealidad

El método es lineal hasta 2.0 mmol/l. Para muestras con concentraciones superiores, diluir 1+3 con agua bidestilada y repetir la prueba. Multiplicar el resultado por 4.

Rango normal

En ayunas: 0.1-0.9 mmol/l

Notas

1. Muestras visiblemente lipémicas requieren una muestra blanco.
2. Muestras con niveles de bilirrubina o de hemoglobina superiores a los indicados a continuación requieren una muestra blanco:
- 3.

	Niveles máximo permitido para pruebas de exactitud	Efecto sobre el resultado
Bilirrubina	10 mg/dl	Disminuido
hemoglobina	100 mg/dl	Aumentado

Estas muestras requieren una muestra blanco*

($A_{\text{muestra blanco}}$). La concentración de NEFAs se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Mmol/l} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{muestra blanco}}}{A_{\text{Patrón}}} \times \text{concentración de patrón}$$

4. La muestra que va a ser analizada no debe ser heparinizada, ya que esto estimulara la actividad de la lipoprotein-lipasa provocado por la liberación de NEFAs de los triglicéridos asociados a las lipoproteínas sanguíneas. En consecuencia, la sangre extraída de pacientes que están recibiendo tratamiento terapéutico con heparina, o sangre recogida en envases con heparina no es adecuada para esta prueba.
5. Debido a la incorporación de ascorbato oxidasa en el reactivo enzima 4, niveles de ácido ascórbico superiores a 20 mg/dl (es decir ≥ 10 veces el valor normal) no interfieren en la prueba.
6. Las determinaciones de NEFAs deben llevarse a cabo con suero obtenido de individuos en ayunas, de lo contrario los resultados no pueden ser directamente comparados con los rangos normales de controles en ayunas.

7. Si la muestra de suero permanece a temperatura ambiente durante un tiempo considerable, el nivel de NEFAs aumenta debido a la acción enzimática; por tanto, si el análisis no es inmediato las muestras de suero pueden congelarse a -20°C durante un máximo de 24 hrs.
8. Si $A_{\text{Patrón}} - A_{\text{reactivo blanco}} \leq 0.180$, repetir la prueba con reactivo fresco.

Precauciones

Únicamente para diagnóstico *in-vitro*, no pipetear con la boca. Respetar las precauciones normales necesarias, que se requieren al manejar reactivos de laboratorio.

Referencias

1. DeVries, G.H., Mamunes P., Miller, C.D. and Hayward, D.M., Analytical Biochem. 1976; 70: 156-166.
2. Henry, R.J., Clinical Chemistry, Principles and Techniques, 2nd Edition, Harper and Row, 1974: p. 1451.
3. Matsubara, C., Neshikawa, Y., Yoshida, Y. And Tateamura, K., Analytical Biochem. 1983. 130:128-133.
4. Mulder, C.J., Clin. Chem. Clin. Biochem. 1983. 21:823-827.

LIPIDOS TOTALES

Método Colorimétrico

Cato No.

TL100

1. Patrón

1 x 70 ml

3 x 100 ml

2. Reactivo Colorante

3 x 100 ml

Reactivo adicional: ácido sulfúrico concentrado (Requerido pero no suministrado)

MÉTODO COLORIMETRICO

PRINCIPIO⁽¹⁾

Los lípidos reaccionan con ácido sulfúrico, ácido fosfórico y vanilina para formar un complejo de color rosado.

MUESTRA

Suero o plasma heparinizado.

REACTIVOS

Componentes	Concentración en la prueba
1. Patrón	
Lípidos Totales	10 g/l (1000 mg/dl)
2. Reactivo colorante	
Ácido fosfórico	11.7 mol/l
Vanilina	13 mmol/l

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES

Todas soluciones están listas para usar. Estables hasta la fecha de caducidad cuando se conservan entre +15 y +25 °C.

PROCEDIMIENTO

Longitud de onda: Hg 546 nm (530-560 nm)
Cubeta: 1 cm de espesor
Medición: Frente a reactivo blanco
Temperatura de reacción: 100°C
Temperatura de medición: 20-25°C

Pipetear en tubos de ensayo:

	Reactivo		
	Blanco	Patrón	Muestra
Solución	----	10.05 ml	----
Muestra	----	----	0.05 ml
Acido sulfúrico	----	2.00 ml	2.00 ml

Tapar, mezclar por inversión y dejar reposar en un baño de agua hirviendo durante 10 min. Después enfriar en un baño de agua fría y pipetear de nuevo en tubos de ensayo secos:

A partir de las soluciones

Anteriores	----	0.10 ml	0.10 ml
Acido sulfúrico	0.10 ml	----	----
Solución 2	2.50 ml	2.50 ml	2.50 ml

Mezclar, dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 - 25°C). Verter sobre cubetas secas y leer la absorbancia de la muestra (Amuestra) y del patrón (Apatrón) . frente al reactivo blanco antes de 30 minutos.

CALCULOS

Para calcular la concentración total de lípidos en la muestra:

$$\begin{array}{rclcl} \text{g/l} & = & 10 \times & \frac{\text{Amuestra}}{\text{Apatrón}} \\ \text{mg/dl} & = & 1000 \times & \frac{\text{Amuestra}}{\text{Apatrón}} \end{array}$$

VALORES NORMALES⁽¹⁾

Suero: 4-10 g/l (400-1000 mg/dl)

Como puede haber variaciones debido a la edad, sexo, dieta y situación geográfica, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales.

CONTROL DE CALIDAD

Para un control de exactitud y reproducibilidad:

Multisueros normal y elevado ensayados

Para un control de reproducibilidad:

Multisueros bajo, normal y elevado.

LINEARIDAD

Si la concentración de lípidos totales excede 40 g/l (4000 mg/dl) diluir 0.1 ml de muestra con 0.9 ml de NaCl al 0.9% y repetir la prueba. Multiplicar el resultado por 10.

NOTAS

La solución 2 y el ácido sulfúrico son muy viscosos. Se recomienda pipetear cerca de la base del tubo de ensayo y mezclar bien ambas soluciones. Debe tenerse cuidado cuando se llenen las cubetas ya que las burbujas de aire atrapadas tardan en desaparecer. Si el

volumen final no es suficiente para llenar la cubeta, los volúmenes especificados pueden duplicarse sin que los cálculos se vean afectados. Detergentes y grasas interfieren en la determinación.

PRECAUCIONES

Únicamente para diagnóstico in vitro. No pipetear con la boca. Respetar las precauciones normales necesarias, que se requieren al manejar reactivos de laboratorio.

La solución 2 contiene ácido fosfórico que es cáustico. Si la solución entra en contacto con la piel o mucosas, lavar inmediatamente con agua abundante. Si la solución entra en contacto con los ojos lavar inmediatamente con agua y consultar un oftalmólogo. No fumar mientras se usen estas soluciones. Mantener la solución 1 lejos de llamas abiertas, descargas eléctricas y fuentes de calor ya que podrían prender.

REFERENCIAS

1. Zollner, N., and Kirsch, K., Z Ges. Exp. Med., 1962 135: 545.

The logo for RANDOX, featuring the word "RANDOX" in a bold, italicized, sans-serif font with a slight shadow effect.

COLESTEROL LDL con Patrón

Método de Precipitación con Hepárina

Cal. No.

CH 1350A	Reactivo Precipitante	1 x 100 ml
	Patrón de Colesterol	1 x 5ml
CH 1351	Reactivo Precipitante	3 x 100 ml
	Patrón de Colesterol	1 x 5ml

PRINCIPIO

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se precipitan por medio de la heparina en su punto isoeléctrico (pH 5.04) después de la centrifugación las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las de muy baja densidad (VLDL) permanecen en el sobrenadante. Estas se pueden determinar por medio de métodos enzimáticos.

MUESTRA Suero

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

Componentes	Concentración inicial de la solución
Heparin	50,000 IU/l
Citrato sódico	0.064 mol/l, pH 5.04
Patrón	1.29 mmol/l (50 mg/dl)

PREPARACION DE REACTIVOS:

1.- Listo para usar. Estable hasta la fecha de caducidad conservado entre +2 y + 8°C. El estándar está listo para su uso. Estable hasta la fecha de caducidad almacenado entre +2 y +8 °C

DETERMINACION DE COLESTEROL LDL Vease paquete adicional de colesterol CHOD-PAP Cat. CH198, CH199, CH200, CH201

DETERMINACIÓN DEL NO LDL COLESTEROL

Se puede hacer con patrón o con factor

Nota: El patrón de 50 *mg/dl* no debe usarse en el paso de precipitación.

1. Precipitación

Pipetear en tubos de centrifugación:

Suero	100 μ l
Reactivo de precipitación	1 000 μ l

Mezclar y dejar reposar 10 min a temperatura ambiente. Centrifugar durante 15 min a 4.000 rpm determinar la concentración de colesterol del sobrenadante hasta la hora siguiente a la centrifugación.

2. Prueba de Colesterol en el sobrenadante

Longitud de onda:	500 nm. Hg 546 nm
Cubeta:	1 cm de espesor
Temperatura:	20-25°C ó 37°C
Medición:	Frente a reactivo blanco

Pipetear en tubos de ensayo.

	Blanco	Reactivo 50 <i>mg/dl</i>	Patrón Muestra
Agua destilada 50 μ l		----	----
Sobrenadante	----	----	50 μ l
Patrón	----	50 μ l	----
Reactivo	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l

Mezclar, incubar durante 10 min entre +20 y +25°C ó 5 min a 37°C. Medir la absorbancia de la muestra (Amuestra) y del patrón (Apatrón) frente al reactivo blanco antes de 60 min.

1. Calculo del NO LDL con patrón de 50 mg/dl

$$= \frac{\Delta A_{muestra}}{\Delta A_{patrón}} \times 550^*$$

*= Se considera la dilución en el paso de precipitación

2. Calculo del NO LDL con factor

Concentración de colesterol en el sobrenadante

No LDL = Abs de muestra - Abs de blanco x F

	mmol/l	mg/dl
500 nm	32.70	1265
Hg 546 nm	49.63	1920

Calculo de LDL Colesterol

Se requiere cuantificar el contenido de Colesterol total y restar el valor obtenido en el sobrenadante

Colesterol- LDL = Colesterol Total - Colesterol en el sobrenadante

Interpretación Clínica

Rango de valores esperados LDL Colesterol en suero_

	mg/dl	mmol/l
Pronostico favorable	< 150	< 3.9
Rango Sospecha	150 – 190	3.9-4.9
Riesgo aumentado	> 190	> 4.9

NOTAS

Las lipoproteinas de baja densidad y las poco frecuentes aterogenicas precipitan cuantitativamente.

Se da una ligera coprecipitacion de VLDL, pero dado que su contenido de colesterol es bajo, los valores de colesterol LDL no aumentan significativamente y no afecta a la estimación de riesgo cardiovascular.

CONTROL DE CALIDAD

Para un control de exactitud y precisión

Multisueros: Control de Lipidos , bajo, normal y alto

REFERENCIAS:

- 1.- H. Wieland and D. Seidel, J. Lipid Res. 24,904 (1983)
- 2.- G. Assmann, Internist 20,559 (1979)

COLESTEROL HDL DIRECTO

Método de aclaramiento

Cat No.

CH 2652	Reactivo enzimático R1	6x30 ml
	Reactivo enzimático R2	3x20 ml

	Solución patrón HDL	
CH 2652 A	Reactivo enzimático R1	2x30 ml
	Reactivo enzimático R2	1x20 ml
	Solución patrón HDL	

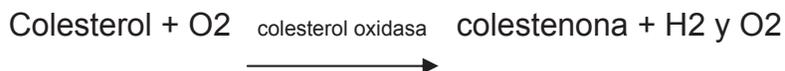
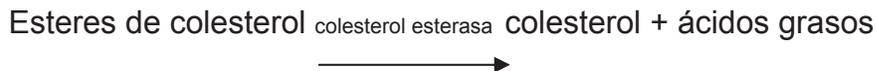
IMPORTANCIA CLÍNICA

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) transportan el colesterol desde las células periféricas hacia el hígado, donde es convertido a ácidos biliares y es excretado hacia el intestino. Se ha comprobado que existe una relación inversa entre los niveles de HDL y la incidencia de enfermedades coronarias⁽¹⁾

PRINCIPIO^{2,3} el ensayo consiste en dos partes:

FASE DE ACLARAMIENTO

1. La eliminación de quilomicrones, VLDL y LDL colesterol por medio de colesterol esterasa, colesterol oxidasa y subsecuentemente catalasa.



FASE DE REACCIÓN

2. La determinación específica de la fracción HDL-colesterol después de la etapa descrita en el paso 1.





La intensidad de quinoneinina producida es directamente proporcional a la concentración de colesterol.

En la segunda reacción la catalasa se inhibe por otros componentes.

MUESTRA:

Suero o plasma heparinizado, no emplear EDTA. El HDL- colesterol es estable 6 días entre +2 y +8°C. La muestra no debe congelarse.

COMPOSICIÓN DE LOS REACTIVOS:

Reactivo enzimático R1 :

solución tampón pH 7.0	100 mmol/L
HDAOS N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3, 5-dimetoxianilina)	0.56 mmol/L
Colesterol esterasa	800 U/L
Colesterol oxidasa	507 U/L
Catalasa	800 KU/L

Reactivo enzimático R2:

Solución tampón pH 7.0	100 mmol/L
4-aminoantipirina	4 mmol/L
peroxidasa	4 KU/L

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

Reactivos R1 y R2: los reactivos están listos para su uso. Estable hasta la fecha de caducidad almacenado entre +2 y +8 °C. Una vez abiertos debe evitarse la contaminación y deben mantenerse los frascos bien tapados.

Evite introducir pipetas o puntas en el reactivo

PROCEDIMIENTO:

Longitud de onda 578 nm
Cubeta 1 cm paso de luz
Temperatura 37 °C

Pipetear en tubos de ensayo:

	Patrón	Muestra
Patrón	10 μ L	---
Muestra	---	10 μ L
Reactivo R1	750 μ L	750 μ L

Mezclar, incubar 5 minutos a 37°C. Medir la absorvancia A1 de la muestra y del patrón contra agua destilada.

Después agregar:

Reactivo R2	0.250 ml	0.250 ml
-------------	----------	----------

Mezclar, incubar 5 minutos a 37°C la absorvancia A2 de la muestra y del patrón contra agua destilada.

CALCULOS:

$$\text{HDL-coles} = \frac{(A2-A1) \text{ muestra}}{(A2-A1) \text{ patrón}} \times \text{concentración del patrón}$$

VALORES ESPERADOS:

Sin riesgo Riesgo moderado Riesgo alto

Hombres	>55 mg/dl	35-55 mg/dl	<35 mg/dl
Mujeres	>65 mg/dl	45-65 mg/dl	<45 mg/dl

De acuerdo al programa nacional de educación de colesterol (NECP) los valores de HDL-colesterol pueden ser afectados por un gran número de factores como fumar, ejercicio, hormonas, edad y sexo. Por lo que se recomienda que cada laboratorio determine los valores de acuerdo a su población.

INTERFERENCIA:

El ensayo no se ve afectado por muestras ictericas con bilirrubinas <30 mg/dl, factor reumatoide <1000 IU/ml, hemoglobina <500 g/dl y triglicéridos <1200 mg/dl. Si se sobrepasan estas concentraciones la muestra debe diluirse 1+9 con solución salina fisiológica. El resultado se multiplica por 10.

LINEARIDAD: hasta 150 mg/dl

REFERENCIAS:

- 1.- National Institutes of Health Concensus Development Conference Statement: Triglycerides, High Density Lipoprotein and Coronary Heart Disease. Washington D.C.
- 2.- Assman G., Europ. Guideline S, Amer. Jcardiol 1990: 65:11F

LITERATURA CITADA

- .- Albertini D.F., Combelles C.M.H., Benecchi E., and Carabatsos M.J.. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 121:647-653.
- .- Andresen S. H. 2001. Vacas secas y en transición. *Rev Inv Vet Perú*. 12(2): 36-48

- .- Aranda-Avila I, Aké-López J.R., Delgado de León R, Herrera-Camacho J. 2002. Resumption of ovarian activity postpartum, serum concentration of lipid metabolites and progesterone in cows supplemented with corn oil in the diet under tropical conditions. Proceedings of the Responding to the Increasing Global Demand for Animal Products. Universidad Autónoma de Yucatán, México. pp. 202-203.
- .- Aranda M.V., Brave N., Casagrande R. 2002. Colesterol en bovinos. Facultad de agronomía y veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, provincia de Córdoba, Argentina.
- .- Arthur J. R., Bermano G., Mitchell J. H. y Hesketh J. E. 1996. Regulation of selenoprotein gene expression and thyroid hormone metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 384–388.
- .- Armstrong D.G., and Webb R. 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reproduction.* 2:139-146.
- .- Bao B, Thomas M.G., Williams G.L. 1997. Regulatory roles of high density and low density lipoproteins in cellular proliferation and secretion of progesterone and insulin-like growth factor I by enriched cultures of bovine small and large luteal cells. *Journal of Animal Science* 75:3235-3245.
- .- Barton B.A., and Carroll D.J.. 1992. Dietary crude protein and reproductive efficiency in dairy cows: considerations when designing or evaluating research protocols. pp. 21 in *Proc. 27th Pacific Northwest Anim. Nutr. Conf.*, Spokane, WA.
- .- Bauchart D. and Leveux D. 1985. lipoproteins plasmatiques du veau preruminant. *Reprod. Nutr. Dev.* 25:243.
- .- Bauchart D. 1993. Lipid absorption and transport in ruminant. *J. Dairy. Sci.* 76:3864.

- .- Beam S.W. y Butler W.R. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54: 411-424.
- .- Bertics S.J., Grummer R.R., Cadorniga-Valino C. y Stoddard E.E. 1992 *J. Dairy Sci.* 75:1914-1922.
- .- Bishop D.K. y Wettemann R.P. 1992. Blood metabolites in steers fed protein supplement daily or at 4-day intervals. *Animal Science Research Report. Oklahoma Agricultural Experiment Station*, 245-250.
- .- Blache D., Celi P., Blackberry M.A., Dynes R.A. and Martin G.B. 2000. Decrease in voluntary feed intake and pulsatile luteinizing hormone secretion after intracerebroventricular infusion of recombinant bovine leptin in mature male sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 12:373-381.
- .- Blache D. 2003. Balance de energía y reproducción en rumiantes: procesos endocrinos y neuroendocrinos. III Curso Internacional de Fisiología de la Reproducción en Rumiantes. pp. 151-167.
- .- Boland M.P., Lonergan P., O'Callahan O.D. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55:1323-1340.
- .- Bossis I., Wetteman R.P., Welty S.D., Vizcarra J.A., Spicer L.J., and Diskin M.G.. 1999. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J. Anim. Sci.* 77:1536-1546.
- .- Buffet N.C., and Bouchard P. 2001. The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. *Chronobiol. Int.* 18:893-919.

- .- Butler W.R. 1995. postpartum negative energy balance, ovarian activity and fertility in dairy cows. Memorias Sexto Curso Internacional de Reproducción Bovina. México. pp.17
- .- Butler W.R. y Elrod C.C., 1995. Reproduction in high-yielding dairy cows as related to energy balance and protein intake. AIBIR, División de Educación Continua, UNAM, FMVZ. (Eds.), Memorias del Sexto Congreso Internacional de Reproducción Bovina, México, D.F., pp. 20-27
- .- Butler W.R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. Animal Reproduction Science, 60-61: 449-457.
- .- Butler W.R. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. Liv. Prod. Sci. 83:211-218.
- .- Calsamiglia S. 2000. Nuevos avances en el manejo y alimentación de la vaca durante el parto. Universidad Autónoma de Barcelona. XVI curso de Actualización. Barcelona España.
- .- Cameron J.L. 1996. Regulation of reproductive hormone secretion in primates by short-term changes in nutrition. Reviews of Reproduction, 1, 117-126.
- .- Carroll D.J., Grummer R.R., and Clayton M.K. 1992_a. Stimulation of luteal cell progesterone production by lipoproteins from cows fed control or fat-supplemented diets. J. of Dairy. Sci. 75:2205-2214.
- .- Carroll D.J., Grummer R.R., and Mao F.C. 1992_b. Progesterone production by culture luteal cells in the presence of bovine low and high-density lipoproteins purified by heparin affinity chromatography. J. Anim. Sci. 70:2516-2526.

- .- Canfield R. y Butler W. 1990. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Domes. Anim. Endoc.* 7:323.
- .- Canfield R.W., y Butler W.R. 1991. Energy balance, first ovulation and the effects of naloxone on LH secretion in early postpartum dairy cows. *J. Anim. Sci.* 69:740.
- .- Cansino A.G., Aké L.R., Herrera C.J., y Segura C.J. 2003. Efecto de la suplementación grasa sobre el crecimiento folicular y la calidad de oocitos en ovejas de pelo. *Memorias Científicas XXVII Congreso Nacional de Buiatria.* Junio 12-14, 2003. Villahermosa, Tabasco. México. Pp. 311.
- .- Castelán O.O. y Matthewman R. 1996. Situación y perspectivas de la industria lechera en México, con énfasis en lechería en pequeña escala. *Centro de Investigación en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.* pp. 7-16.
- .- Cevallos A., Gómez P.M., Vélez M.L., Villa N.A. y López F.L. 2002. Variación de los indicadores bioquímicos del balance de energía según el estado productivo en bovinos lecheros de Manizales, Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 15:13-25.
- .- Correa C.H.J. 2002. La vaca en transición: metabolismo y manejo nutricional. *Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Producción Animal. Seminario nacional de lechería especializada: Bases nutricionales y su impacto en la productividad.* p.p. 1-55.
- .- Cunningham S.D., Anderson T.A., Schwab A.P. y Hsu F.C. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56: 55-114.
- .- Chabbert-Buffeta N., Skinner D.C., Caraty A., and Bouchard P. 2000. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids.* 65:613-620.

- Chartrand R., Matte J.J., Lessard M., Chouinard P.Y., Giguere A. and Laforest J.P. 2003. Effect of dietary fat source on systemic and intrauterine synthesis of prostaglandins during early pregnancy in gilts. *J. Anim. Sci.* 81:726-734.
- Church D.C. y Pond W.G. 1997. Transporte y deposición de los lípidos, metabolismo de los ácidos grasos y triglicéridos e influencia de la frecuencia en el consumo de alimentos sobre el metabolismo. En: Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales. Edit. Acribia. España.
- Dawuda P.M., Eduvie L.O., Esievo K.A.N., Molokwu E.C.I. 1989. Silent oestrus manifestation in Nigerian Bunaji Zebu cows. *Anim. Reprod. Sci.* 21: 79-85.
- De Luca L.J. 2003. Fisiopatología del hígado de las vacas de alta producción. nota técnica de Laboratorios Burnet.
- Del Vecchio R.P., Matsas D.J., Inzana T.J., Sponenberg D.P. and Lewis G.S. 1992. Effect of intrauterine bacterial infusion and subsequent endometritis on prostaglandin F_{2α} metabolite concentrations in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, 70: 3158-3162.
- Del Vecchio R.P., Matsas D.J., Fortin S., Sponenberg D.P. and Lewis G.S. 1994. Spontaneous uterine infections are associated with elevated prostaglandin F_{2α} metabolite concentrations in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 41: 413-417.
- Devoto L., Vega M., Khoen P., Castro O., Christenson L.K., Caravallo P., and Strauss J.F. 2000. Endocrine and paracrine-autocrine regulation of the corpus luteum during the mid-luteal phase. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 55:13-20.
- Devoto L., Kohen P., Vega M., Castro O, Gonzalez R.R., Retamales I., Caravallo P., Christenson L.K., and Strauss J.F.. 2002. Control of human luteal steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 186:137-141.

- .- Diaz, F.J., Anderson L.E., Wu Y.L., Rabot A., Tsai S.J., and Wiltbanck M.C. 2002. Regulation of progesterone and prostaglandin F2alpha production in the CL. *Mol. Cell. Endocrinol.* 31:65-80.
- .- Diskin M.G, Mackey D.R, Roche J.F. and Sreenan J.M. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, 78, 345-370.
- .- Domecq J.J., Skidmore A.L., Lloyd L.W. and Kaneene E. 1995. Validation of body condition scores with ultrasound measurements of subcutaneous fat of dairy cows. *J. dairy Sci.* 78:2308
- .- Dominguez V.I.A. 1997. Manejo nutricional de la vaca: elemento crítico en los sistemas campesinos de producción de leche en pequeña escala. *Memorias. Seminario Taller Nacional en Sistemas de Producción de Leche en Pequeña Escala. Universidad Autónoma del Estado de México. México. P. 52*
- .- Doreau M. and Ferlay A. 1994. Digestion and utilization of fatty acids by ruminant. *Anim. Feed Sci. tech.* 45:379.
- .- Dunn T.G. y Moss G.E. 1992. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *J. Anim. Sci.* 70:1580-1593.
- .- Edgerton L.A. 1980. Effect of lactation upon the postpartum interval. *J. Anim. Sci.* 51(suppl.2):40.
- .- Eppig J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 122:829-838.
- .- Edmonson A.J., Lean I.J., Weaver L.D., Farver T. and Webster G., 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72. 68–78.

- .- Erickson G.F., and Shimasaki S. 2001. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil. Steril.* 76:943-949.
- .- Esminger M.E.; Oldfield J.E. and Heinemann W.W. 1990. *Feeds and Nutrition* . 2nd. Ed. The Esminger publishing Co. California, U.S.A.
- .- Espinoza V.J.L. 1995. Incorporación de grasas en la dieta de rumiantes: su efecto sobre el comportamiento reproductivo, desarrollo de las crías y sobre algunos cambios endocrinos y metabólicos. Tesis de Doctorado. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Pp. 1, 28, 29.
- .- Fahey J, Mee J.F., O'Callaghan D.O., Murphy J.J. 2002. Effect of calcium salt of fatty acids and calcium salt of methionine hydroxy analogue on reproductive responses and milk production in Holstein-Friesian cows. *Animal Science* 74:145-154.
- .- Fox D.G., Sniffen C.J., O'Connor J.D., Russel J.B., and Van Soest P.J., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. *Journal of Animal Science.* 70: 3578.
- .- Francisco C.C., Chamberlain C.S., Waldner D.N., Wettemann R.P. and Spicer L.J. 2002. Propionibacteria Fed to Dairy Cows: Effects on Energy Balance, Plasma Metabolites and Hormones, and Reproduction *J. Dairy Sci.* 85:1738-1751.
- .- Ferguson J.D. 1991. Nutrition and reproduction in dairy cows. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 7:483–507.
- .- Gagliostro G., y Cocimano M.R. 1987. Efecto del nivel nutricional, día y hora del muestreo sobre las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres en vaquillonas. *Rev. Argentina Prod. Anim.* 7:119.

- .- Galvis R.D., Correa H.J. y Ramirez N.F. 2005. Interacciones entre el balance nutricional, los indicadores del metabolismo energético y proteico y las concentraciones plasmáticas de insulina, e IGF-1 en vacas en la lactancia temprana. Rev. Col. Cienc. Pec. 16: 237-248.
- .- Gallardo M., Maciel M., Cautrin A. y Burdisso L. 2004. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Santa Fe, Argentina.
- .- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. UNAM. Instituto de Geografía. México.
- .- Gerloff B.J., Herdt T.H. 1995 Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. J.A.Vet M: A 188:245.
- .- Goff J.P. y Horst R.L. 1997. Effects of the Addition of Potassium or Sodium, but Not Calcium, to Prepartum Rations on Milk Fever in Dairy Cows J. Dairy Sci. 80: 176-186.
- .- Gong J.G., Lee W.J., Garnsworthy P.C., Webb R. 2002. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. Reproduction 123:419-427.
- .- Grazul-Bilska A.T., Redmer D.A., and Reynolds L.P. 1997. Cellular interactions in the corpus luteum. Semin. Reprod. Endocrinol. 15:383-393.
- .- Grummer R.R., and Carroll D.J. 1988. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. J. Anim. Sci. 66:3160-3173
- .- Grummer R.R., and Carroll D.J. 1991. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. J. Anim. Sci. 69:3838.

- .- Grummer R.R., Hoffman P.C, Luck M.L., and Bertics S.J. 1995. Effect of prepartum and postpartum dietary energy on growth and lactation of primiparous cows. J. Dairy Sci. 78:172-180.
- .- Hightshoe R.B., Cochran R.C., Corah L.R., Kiracofe G.H., Harmon D.L. and Perry R.C.1991. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. J. Anim. Sci. 69:4097-4103.
- .- Harrison R.A. 1990. Increased milk yield versus reproductive energy status of high producing dairy cows. J. Dairy Sci. 73:2758–2759
- .- Hawke J.C. and Silcock W.R. 1970. the *in vitro* rates of lipolysis and biohydrogenation in rumen contents, biochim. Biophys. Acta 218:201.
- .- Hawkins D.E., Niswender K.D., Oss G.M., Moeller C.L., Odde K.G., Sawyer H.R. and Niswender G.D. 1995. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. J. Anim. Sci. 73:541-545.
- .- Herrera C.J., Quintal F.J.A., Kú V.J.C., Aguayo A.A.M., Williams L.G. 2001. Dinámica folicular y concentración sérica de lípidos en ovejas Pelibuey suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados en la dieta. Memorias del 2do Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. XI Congreso Nacional de Ovinocultura. Mérida, Yucatán, México. Mayo 22-25, 2001.
- .- Holtenius P. 2001. Peripartum responses of dairy cows fed energy-dense diets for 3 or 6 weeks prepartum. J. Dairy Sci. 84:115–125
- .- Hoyer P.B. 1998. Regulation of luteal regression: the ewe as a model. J. Soc. Gynecol. Investig. 5:49-57.

- .- Jimeno V., Callejo A. y Mazzucchelli F. 1998. Recomendaciones prácticas para el control e la reproducción a través de la alimentación en vacas lecheras. *Bovis*, 82: 41-49.
- .- Jenkins T.C. 1993. Lipid metabolism in the rumen . *J. Dairy Sci.* 76:3851.
- .- Kindahl H., Odensvik K., Aiumlamai S. and Fredriksson G.. 1992. Utero-ovarian relationships during the bovine postpartum period. *Anim. Reprod. Sci.*, 28: 363-369.
- .- Kotwica J., Bogacki M. and Rekawiecki R. 2002. Neural regulation of the corpus luteum. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:299-308.
- .- Kronfel D.S. y Medway W. 1980. Química sanguínea. En: *Patología Clínica Veterinaria*. Edit. UTEHA. México, D.F. pp. 14.
- .- Kuran M, Onal A.G., Robinson J.J., Mackie K., Speake B.K., Mc Evoy T.G. 1999. A dietary supplement of calcium soaps of fatty acids enhance luteal function in sheep. *Journal of Animal Science* 69:385-393.
- .- Lammoglia M.A. 1996. Effects of dietary fat and season on steroid hormonal profiles before parturition and on hormonal, cholesterol, triglycerides, follicular patterns, and postpartum reproduction in Brahman cows. *Journal Dairy Science*, 74 (9): 2253-2262.
- .- Lammoglia M.A., Short R.E., Bellows S.E., Bellows R.A., Macneil M.D., Hafs H.D. 1998. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripuberal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F2a. *J. Anim. Sci.* 76: 1662-1670.
- .- Lammoglia M.A., Bellows R.A., Grings E.E., Bergman J.W., Bellows S.E., Short R.E., Hallfords D.M. and Randel R.D. 2000. Effects of dietary fat and sire breed on puberty, weight and reproductive traits of F₁ beef heifer. *J. Anim. Sci.* 78:2244-2252.

- .- Laplaud P.M., Bauchart D., Durand D. and Chapman M. J. 1990. Lipoproteins and apoproteins in intestinal lymph of the preruminant calf, *Bos spp.* At peak lipid absorption. *J. lipid Res.* 31:1781.
- .- Lucy M.C., Thatcher W., Michel F.J. and Staples C.R. 1989. Effect of dietary calcium soaps of long chain fatty acids (Megalac) on plasma prostaglandin F metabolite (PGFM), LH, energy balance and follicular populations in early postpartum dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 67:385.
- .- Lucy M.C. 1990. Effects of calcium salts of longchain fatty acids, growth factors, and energy balance on ovarian follicular dynamics in postpartum dairy cows. PhD. Thesis. University of Florida. Florida, USA.
- .- Lucy M.C., Staples C.R., Michel F.M. and Thatcher W.W. 1991. Effects of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cow on plasma prostaglandin $F_{2\alpha}$ luteinizing hormone and follicular growth. *J. of Dairy Sci.* 74:483-489.
- .- Lucy M. C. and Crooker B.A. 2001. Physiological and genetic differences between low and high index dairy cows. *J. Anim. Sci.* 26:223-236.
- .- Mattos R., Staples C.R., Williams J., Amorocho A., McGuire M.A., and Thatcher W.W. 2002. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. *J. Dairy Sci.* 85:755–764
- .- Martin G.B., Walkden-Brown S.W., Boukhliq R., Tjondronegoro S., Miller D.W., Fisher J.S., Hötzel M.J., Restall B.J. and Adams N.R. 1994b. Non-photoperiodic inputs into seasonal breeding in male ruminants in: *Perspectives in Comparative Endocrinology.*

- 574-585pp. Eds; KG Davey, RE Peter and SS Tobe. National Research Council of Canada, Ottawa.
- .- Martín Vaquero B. 1996. Efectos de la nutrición en la fertilidad. En: Frisona Española, mayo/junio 1996:108-113.
 - .- Martínez Marín A.L. y Sánchez Cárdenas J.F. 2001. Alimentación y reproducción en vacas lecheras. Revista Mundo Ganadero No. 111: p.p. 1-8.
 - .- Mateus L., Da Costa L.L., Bernardo F., Silva J.R. 2002. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 37:31-53.
 - .- McCracken J.A., Custer E.E., and Lamsa J.C. 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79:263-323.
 - .- McDougall S., Hampson A. 1992. Efficacy of detection of oestrus in a dairy herd. Department of Animal Health. University of Sidney, Camden, New South Wales. *Aust. Vet. J.* 69:96-98.
 - .- Meidan R., Milvae R.A., Weiss S., Levy N., and Friedman A. 1999. Intraovarian regulation of luteolysis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54:217-228.
 - .- Meza H.C.A. 2003. Desarrollo folicular, luteogénesis y esteroidogénesis: arquitectura y función del cuerpo luteo. III Curso Internacional de la fisiología de la reproducción en rumiantes. p.p.189-202.
 - .- Miettinen P.V.A. 1995. Prevention of bovine ketosis with glucogenic substance and its effect on fertility in Finnish dairy cows. *Berl-Münch-Tierärzt-Wsch.*; 108: 14-19.
 - .- Montiel F. and Ahuja C. 2005 Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle. *J. Anim. Sci.* 85:1-26

- .- Muñoz M.N., Odermatt B.P. y Altamirano C.J. 1995. Retos y oportunidades del sistema lechero ante la apertura comercial. Universidad Autónoma de Chapingo. CIESTAAM. México. P.53
- .- Murphy B.D. 2000. Models of luteinization. Biol. Reprod. 63:2-11.
- .- Nevel R.L. and McGliard M.L. 1993. Interaction of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. J. of Dairy Sci. 76:3257-3268.
- .- Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K., and McIntush E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. Physiol. Rev. 80:1-29.
- .- Niswender G.D. 2002. Molecular control of luteal secretion of progesterone. Reproduction. 123:333-339.
- .- Oldick B.S. and Firkins J.L. 2003. Nutrition and reproduction interactions in cattle. Department of Animal Sciences. The Ohio State University
- .- Palmquist D.L., and Mattos W. 1978. Turnover of lipoproteins and transfer to milk fat of dietary (1-carbon-14) linoleic acid in lactating cows. J. Dairy Sci. 61:561-565.
- .- Padron O., Cheli F., Senatore E., Baroli D., and Rizzi R. 1993. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. J. Dairy Sci. 76:2528-2535.
- .- Pate J.L. and Codon W.L. 1982. Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. Mol. Cell. Endocrinol. 28:551.
- .- Pate J.L. 1994. Cellular components involved in luteolysis. J. Anim. Sci. 72:1884-1890.
- .- Pate J.L. 1999. Effects of Energy Balance on Ovarian Function. Dep. of Anim. Sci. Tri-State Dairy Nutrition Conference. The Ohio State University. 20-21: 33-40

- .- Pate J.L., and Landis-Keyes P. 2001. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? *Reproduction*. 122:665-676.
- .- Pérez-Hernández P., Sánchez del Real C., Gallegos-Sánchez J. 2001. Anestro postparto y alternativas de manejo del amamantamiento en vacas de doble propósito en trópico. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad de Animales*, 16: 257-270.
- .- Peters A.R, Lamming G.E. 1986. Regulation of ovarian function in the postpartum cow: an endocrine model. *Vet. Rec.* 118:236-239.
- .- Petit H. V., Germiquet C., and Lebel D. 2003. Effect of Feeding Whole, Unprocessed Sunflower Seeds and Flaxseed on Milk Production, Milk Composition, and Prostaglandin Secretion in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87:3889–3898
- .- Randel R.D. 1990. nutrition and postpartum rebreeding in cattle . *J. Anim. Sci.* pp. 853-862
- .- Rasby R.J., Wettemann R.P., Harms P.G., Lusby K.S. and Wagner J.J., 1992. GnRH in the infundibular stalk-median eminence is related to percentage body fat in carcasses of beef cows. *Domest. Anim. Endocrin.* 9, pp. 71–76
- .- Reynolds L.P., Grazul-Bilska A.T. and Redmer D.A. 2000. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12:1-10.
- .- Reynolds L.P., and Redmer D.A. 1999. Growth and development of the corpus luteum. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54:181-191.
- .- Richards J.S., Russell D.L., Ochsner S., Hsieh M., Doyle K.H., Falender A.E., Lo Y.K., and Sharma S.C. 2002. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent. Prog. Horm. Res.* 57:195-220.

- .- Risco C.A., Drost M., Thatcher W.W., Savio J.J. and Thatcher M.J. 1994. Effect of calving-related disorders on prostaglandin, calcium, ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 42:183-203
- .- Robinson, J.J., 1990. Nutrition in the reproduction of farm animals. *Nutr. Res. Rev.* 3: 267-268.
- .- Robinson J.J. 1996. Nutrition and reproduction. *Animal Reproduction Science* 42: 25-34.
- .- Robinson R.S., Pushpakumara P.G.A., Cheng Z., Peters A.R., Abayasekara D.R.E. and Wathes D.C. 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Soc. Rep. And Fertil.* 124:119-131.
- .- Ruegg P.L. and Milton R. L. 1995. Body condition scores of Holstein cows on prince Edward Island, Canada. Relationships with yield, reproductive performance, and disease. *J. dairy Sci.* 78:552
- .- Rukkwamsuk T, Kruip T.A.M., Meijer G.A.L., Wensing T. 1999. Hepatic fatty acid composition in periparturient dairy cows with fatty liver induced by intake of a high energy diet in the dry period. *J Dairy Sci.* 82:280-287.
- .- Salas R.G., Gutiérrez E., Ortega R., Hernández J. 2003. Acidos grasos no esterificados y condición corporal posparto de vacas Holstein en sistemas de producción a pequeña escala. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 37(2):139-143.
- .- Salas R.G., Gutiérrez V.E. y Ortega-González R. 1997. Condición, peso corporal y producción láctea durante el parto y posparto de vacas bajo sistema familiar de producción de leche. *Memorias. Seminario Taller Nacional en Sistemas de Producción de Leche en Pequeña Escala.* Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. P. 32

- .- SAS. 2000. Statistical Analysis System. Institute Inc. North Caroline. USA.
- .- Sepúlveda N.G., Risopatrón J., Oberg J. And Neumann A. 2001. Suplementación pre y post parto en ovejas: Efectos sobre la pubertad y actividad reproductiva de sus hijas. Facultad de ciencias agropecuarias y forestales, centro de biotecnología de la reproducción. Temuco, Chile.
- .- Short R.E. and Adams D.C., 1988. Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. *Can. Anim. Sci.* 68: 29.
- .- Short R.E., Bellos R.A., Stagmiller R.B. 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cows. *J, Anim. Sci.*68:799-819.
- .- Sinclair K.D., Revilla R., Roche J.F., Quintans G., Sanz A., Mackey D.R. and Diskin M.G. 2002. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 postpartum in suckling beef cows. *Animal Science*, 75, 115-126.
- .- Slama H. 1996. Prostaglandines, leucotriènes et subinvolution utérine chez la vache. *Recueil de Médecine Vétérinaire*. Juillet-Août. 369-381.
- .- Smith L.C., Olivera-Angel M., Groome N. P., Bhatia B., and Price C. A. 1996. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle. *J. Reprod. Fertil.* 106:193-199.
- .- Spain J. 1996. Optimal Body Condition Score at Calving For Production and Health. In: *Advances in Dairy Technology - Focus on the Future Proceedings of the 1996 Western Canadian Dairy Seminar, Red Deer, Alberta.* Volume 8.
- .- Spencer T.E., and Bazer F.W. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front. Biosci.* Sep. 1879-1898.

- .- Spitzer J.C., Morrison D.G., Wettemann R.P., and Faulkner L.C. 1995. Reproductive responses and calf birth and weaning weights as affected by body condition at parturition and postpartum weight gain in primiparous beef cows. *J. Anim. Sci.* 73:1251-1257.
- .- Staples C., Thatcher W.W., García-Borjalil C. M. and Lucy M.C. 1992. Nutritional influence on reproductive function. En: *Large Dairy Herd Management American Dairy Sci. Assoc.* pp. 382.
- .- Staples C.R., Burke J.M., and Thatcher W.W. 1998. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81:856–871.
- .- Stevenson J. 1997. Cuidado de la vaca pre y posparto y su impacto en la reproducción. *Memorias. Conferencia Internacional Sobre Ganado Lechero. México.* pp.26.
- .- Tavaniotou A., Albano C., Smitz J., and Devroey P. 2002. Impact of ovarian stimulation on corpus luteum function and embryonic implantation. *J. Reprod. Immunol.* 55:123-130.
- .- Vaskivuo T.E., and Tapanainen J.S. 2003. Apoptosis in the human ovary. *Reprod. Biomed Online.* 6:24-35.
- .- Tanaka T., Akaboshi N., Inoue Y., Kamomae H. and Kaneda Y.. 2002. Fasting-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy status in ovariectomized goats. *Animal Reproduction Science* 72:185-196.
- .- Thomas M.G. 1994. Dietary fat intake, metabolic hormone secretion and ovarian physiological function in cows. Ph. D. Dissertation. Texas A&M University.
- .- Thomas M.G., Bao B. and Williams G.L. 1997. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. *Journal of Animal Science* 75:2512-2519.

- .- Vazquez-Añon M., Bertics S., Luck M., Grummer R.R. 1994. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J Dairy Sci*; 77:1521-1528.
- .- Vazquez P.M. 1989. Asociación Médica Kousmine, Urano, Barcelona, España. Editorial Ibis, Barcelona.
- .- Villa-Godoy A., Hughes T.L., Emery R.S., Enright W.J., Ealy A.D., Zinn S.A., and Fogwell R.L. 1990. Energy balance and body condition influence luteal function in Holstein heifers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7:135.
- .- Villa-Godoy A., Hughes T.L., Emery R.S., Chapin L.T., and Fogwell R.L. 1988. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71:1063–1072.
- .- Villagómez A.M.E., Zárate M.J., Arellano M.H., Delio H.V. y Fajardo G.J. 2003. Efecto de la estación y la inclusión de grasas saponificadas sobre el anestro posparto y la función tiroidea de vacas cebú. *Tec. Pec. Méx.* 41:239-250.
- .- Wattiaux P.A. 1998. Body condition scores. Babcock Institute for International Dairy Research and Development. University of Wisconsin-Madison. www.babcock.wisc.edu/downloads/de/12.en.pdf.
- .- Wehrman M.E., Welsh Jr T.H. and Williams G.L. 1991. Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics and hastens the onset of postpartum luteal activity. *Biology and reproduction.* 45:514-522.
- .- Wettemann R.P., 1994. Precalving nutrition/birth weight interaction and rebreeding efficiency. Oklahoma State University (Ed.), *Anim. Sci. Res. Report.*

- .- Webb R., Woad K.J., and Armstrong D.G. 2002. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:277-285.
- .- Webb R. and Armstrong D.G. 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reproduction.* 2:139-146.
- .- Weiss D., Reist M. and Bruckmaier R.M. 2003. The Acyclic Period Postpartum in Automatic and Conventional Milking. *Journal of Veterinary Medicine.* 51:268.
- .- Westwood C.T., Lean I.J., Garvin J.K., and Wynn P. 2000. Effects of genetic merit and varying dietary protein degradability on lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2926–2940.
- .- Wettemann R.P., 1994b. Precalving nutrition/birth weight interaction and rebreeding efficiency. Oklahoma State University (Ed.), *Anim. Sci. Res. Report.*
- .- Whitaker D.A., Smith E.J., Rosa G.O. y Kelly J.M. 1993. Some effects of nutrition and management of the fertility of dairy cattle. *Vet. Rec.* 133:61.
- .- Williams G.L. 1996. Influence of dietary fat intake and metabolism on follicular growth in cattle. *Reproduction Domestic Animal* 31:539-542.
- .- Williams G.L. and Stanko R.L. 1999. Dietary fat as reproductive nutraceuticals in beef cattle. *Amer. Soc. of Anim.* p.p. 1-12.
- .- Williams G.L. and Griffith M.K. 1995. Sensory and behavioral control of suckling-mediated anovulation in cows. *J. Reprod. Fertil.* 49:463-475.
- .- Williams G.L., Amstalden M., Garcia M.R., Stanko R.L., Nizielski S.E., Morrison C.D. and Keisler D.H. 2002. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 23: 339-349.
- .- Wuttke W., Theiling K., Hinney B., and Pitzel L. 1998. Regulation of steroid production and its function within the corpus luteum. *Steroids.* 63:299-305.

- .- Wuttke, W., L. Pitzel, D. Seidova-Wuttke, and B. Hinney. 2001. LH pulses and the corpus luteum: the luteal phase deficiency (LPD). *Vitam. Horm.* 63:131-158.
- .- Yabuta A.O., Bouda J., Paasch M.L. 1997. Desarrollo y empleo de diagnóstico preventivo de los trastornos ruminales y metabólicos en bovinos. *Vet. Méx.* 28, 3:189 - 195.