

**EFECTO DE LA CONDICIÓN CORPORAL Y NIVEL DE ALIMENTACIÓN
SOBRE LA ACTIVIDAD OVÁRICA, INVOLUCIÓN UTERINA Y
EXPRESIÓN DEL IGF-I EN VACAS MESTIZAS DURANTE EL POSPARTO**

Ana Z. Ruiz, Carlos Domínguez, Nelson Martínez, Livia Pinto-Santini, Karin Drescher, Rafael Pérez M., Jesús A. Rojas U. y Richard Aranedá

RESUMEN

Se evaluó el efecto de condición corporal al parto (CCAP) y nivel de alimentación (NA) sobre el inicio de la actividad reproductiva (AR) hasta los 45 días posparto (DPP), empleándose 18 vacas mestizas (*Bos taurus* × *Bos indicus*), con dos o más partos, asignadas aleatoriamente en cuatro tratamientos (T). T1-BCBA: CCAP baja (<2,5) y NA bajo; T2-BCAA: CCAP baja (<2,5) y NA alto; T3-ACBA: CCAP alta (>2,5) y NA bajo; y T4-ACAA: CCAP alta (>2,5) y NA alto. La AR se evaluó mediante palpación transrectal, ultrasonografía y concentración de progesterona (P_4) en plasma. Los ovarios fueron recolectados de 8 animales beneficiados para clasificar los ovocitos según su calidad en A, B y C. Se evaluó

expresión del receptor del IGF-I en ovario (Ro-IGF-I) y en hígado (Rh-IGF-I) y del IGF-I mediante Western blot. Se aplicó pruebas de correlación no-paramétrica y Kruskal-Wallis y análisis de varianza no paramétrico, detectando efecto del T sobre diámetro cervical (CD; $p<0,05$), cuerpo lúteo ($p<0,05$) y folículo Clase 3 ($\geq 10\text{mm}$; $p<0,01$) y de CCAP sobre ovocitos C (ovocito con cumulus oophurus oscuro; $P<0,05$). El T4 afectó P_4 ($p<0,01$). La mayor expresión del Rh-IGF-I ocurrió en T3 y T4, y para Ro-IGF-I en T2 y T4. Los resultados sugieren que IGF-I modula las gonadotropinas a nivel ovárico y que CCAP es determinante en la reactivación reproductiva de esta especie.

Introducción

El ganado lechero presenta un periodo de balance energético negativo durante las primeras 4-8 semanas

posparto (Drackley, 1999), lo cual conduce a un incremento en los niveles sanguíneos de la hormona de crecimiento (GH) y de los ácidos grasos no esterificados (NEFA)

o β -hidroxibutirato, así como a una disminución en los niveles sanguíneos de insulina, del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), y de la glucosa (Buttler, 2000),

llevando a un retraso en el inicio de la actividad ovárica. En el ganado lechero, el eje somatotrófico, que comprende a la GH, al receptor de la GH y al IGF-I, se en-

PALABRAS CLAVE / Actividad Reproductiva / Calidad Ovocito / Expresión IGF-I / Trópico / Vacas paridas /

Recibido: 15/04/2010. Modificado: 29/07/2010. Aceptado: 30/07/2010.

Ana Z. Ruiz. Médica Veterinaria, Universidad Central de Venezuela (UCV). Ph.D., Universidad de Nebraska-Lincoln, EEUU. Profesora, UCV, Venezuela. Dirección: Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV. Apartado Postal 4563, Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela. e-mail: ruizz11@yahoo.com

Carlos Domínguez. Médico Veterinario y Doctor en Ciencias Agrícolas, UCV, Venezuela. Pro-

fesor, Universidad Experimental Rómulo Gallego (UNERG), Venezuela. Director, Instituto para el Desarrollo Sostenible de Sistemas Agroambiental (IDESSA-UNERG), Venezuela.

Nelson Martínez. Ingeniero Agrónomo y Especialista en Reproducción Animal, UCV, Venezuela. Profesor, UCV, Venezuela.

Livia Pinto-Santini. Ingeniera Agrónoma y Magister en Produc-

ción Animal, UCV, Venezuela. Profesora, UCV, Venezuela.

Karin Drescher. Ingeniera Agrónoma, Magister en Producción Animal y estudiante de Doctorado en Ciencias Agrícolas, UCV, Venezuela. Profesora, UCV, Venezuela.

Rafael Pérez. Médico Veterinario y Magister en Reproducción Animal, UCV, Venezuela. Estudiante de Doctorado en Biotecnología

Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Venezuela. Profesor, UNERG, Venezuela.

Jesús Rojas. Médico Veterinario, UCV, Venezuela. Ph.D., Universidad de Ohio, EEUU. Profesor, UCV, Venezuela.

Richard Aranedá. Ingeniero Químico, Universidad de Carabobo (UC), Venezuela. Profesor, UC, Venezuela.

EFFECT OF BODY CONDITION SCORE AND FEED LEVEL ON OVARIAN ACTIVITY, UTERINE INVOLUTION AND IGF-I EXPRESSION IN CROSSBRED COWS DURING POSTPARTUM

Ana Z. Ruiz, Carlos Domínguez, Nelson Martínez, Livia Pinto-Santini, Karin Drescher, Rafael Pérez M., Jesús A. Rojas U. and Richard Araneda

SUMMARY

Body condition score (BCS) at calving and feed level (FL) effects on reproductive activity were evaluated from 15-45 days post-partum (DPP) in 18 crossbred (*Bos taurus* × *Bos indicus*) cows randomly assigned into four treatments (T). T1 (LFL): low BCS (LBCS; <2.5) and low FL; T2 (HFL): LBCS and high FL; T3: high BCS (HBCS; ≥2.5) and LFL; T4: HBCS and HFL. Reproductive activity and uterine involution were evaluated by transrectal palpation, ultrasound and plasma progesterone (P₄) levels. On 45 DPP, ovaries from eight animals were collected after slaughter, and was used to classify oocyte quality as A, B, and C. Ovarian IGF-I receptor (o-RIGF-I) expression was evaluated by

Western blot. The IGF-I and its receptor expression was evaluated in liver. Non-parametric correlation and Kruskal-Wallis tests were applied, showed T effect on cervical diameter (CD; $p < 0.05$), luteal body ($p < 0.05$) and follicle Class 3 ($\geq 10\text{mm}$; $p < 0.01$), and BCS effect on C oocytes ($P < 0.05$). T4 affected P₄ concentrations. Hepatic IGF-I receptor showed higher expression in animals under T3 and T4; however, o-RIGF-I expression was higher under T2 and T4. Results suggest that BCS is involved in the resumption of reproductive activity, and that IGF-I acts as gonadotrophin function modulator at the ovary level in cow.

EFEITO DA CONDIÇÃO CORPORAL E NÍVEL DE ALIMENTAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE OVÁRICA, INVOLUÇÃO UTERINA E EXPRESSÃO DO IGF-I EM VACAS MESTIÇAS DURANTE O PÓS-PARTO

Ana Z. Ruiz, Carlos Domínguez, Nelson Martínez, Livia Pinto-Santini, Karin Drescher, Rafael Pérez M., Jesús A. Rojas U. e Richard Araneda

RESUMO

O efeito da condição corporal ao parto (CCAP) e o nível da alimentação (NA) foi avaliado sobre a atividade reprodutiva (AR) até 45 dias pós-parto, utilizando 18 vacas mestiças (*Bos taurus* × *Bos indicus*) escolhidas aleatoriamente em quatro tratamentos (T). T1 (BCBA): CCAP baixa (<2,5) e NA baixo, T2 (BCAA): CCAP baixa (<2,5) e NA alto T3 (ACBA): CCAP alta (>2,5) e NA baixo; e T4 (ACAA): CCAP alta (>2,5) e NA alto. AR foi avaliada pela palpação transretal, ultra-sonografia e as concentrações de progesterona (P₄) no plasma. Os ovários foram coletados de 8 animais sacrificados, para classificar os ovócitos

em A, B e C. Avalio-se expressão do receptor do IGF-I no ovário (Ro-IGF-I) e no fígado (Rh-IGF-I) e IGF-I por Western blot. Foram aplicados testes de correlação não paramétrico de Kruskal-Wallis, detectando o efeito T sobre o diâmetro do colo do útero ($p < 0,05$), corpo lúteo ($p < 0,05$) e folículo Classe 3 ($\geq 10\text{mm}$; $p < 0,01$) e CCAP em ovócitos C ($P < 0,05$). O T4 teve efeito sobre P₄ ($p < 0,01$). A maior expressão de Rh-IGF-I ocorreu em T3 e T4, e para Ro-IGF-I em T2 e T4. Os resultados sugerem que o IGF-I modula as gonadotrofinas ao nível ovárico e que CCAP é fundamental na reativação reprodutiva desta espécie.

cuentra desacoplado durante las primeras semanas postparto, lo cual conduce a la secreción de altos niveles de GH y bajos niveles del IGF-I (Lucy, 2008).

Radcliff *et al.* (2003) y Kim *et al.* (2004) sugieren que las deficiencias energéticas durante la lactancia temprana en vacas disminuyen la actividad del promotor del gen del receptor GH-A1, lo cual conduce a una disminución tanto de la síntesis del receptor hepático de la GH, como de la producción del IGF-I. Se ha descrito que vacas lecheras y cerdas que se encuentran sometidas a restricciones nutricionales presentan bajos niveles sanguíneos de insulina y del IGF-I, lo cual, teóricamente, reduce la capacidad de res-

puesta del ovario a las hormonas gonadotróficas (Lucy, 2008). Butler (2000) señala que el reestablecimiento de la actividad ovárica ocurre cuando se produce el NADIR (cambio a balance energético positivo); esto trae como consecuencia una elevación de los niveles del IGF-I, de insulina, de leptina, de hormona luteinizante (LH) y del estradiol (E₂), conduciendo a la producción de folículos dominantes destinados a la ovulación.

La regulación endocrina de la foliculogénesis involucra a las gonadotropinas, además de hormonas y factores de crecimiento producidos localmente (Fortune *et al.*, 2004). Los factores de crecimiento parecidos a insulina (IGF-s) funcionan

como moduladores de la acción de las gonadotropinas a nivel celular. Las actividades autocrinas-paracrinas del IGF-I y del IGF-II incluyen estímulo del crecimiento celular, incremento de la producción de progesterona y del E₂, y un aumento de la sensibilidad de las células de la granulosa al estímulo de la FSH en bovinos (Monget y Monniaux, 1995).

En el postparto, las hembras bovinas deben reiniciar su función reproductiva para poder gestar nuevamente. Para lograr esto son necesarios 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 de la misma influiría negativamente sobre el rendimiento reproductivo del animal, incrementando el intervalo entre partos. En vacas Holstein el tiempo requerido para completar la involución uterina es de 29,6-35,8 días (Lindell *et al.*, 1982; Guilbault *et al.*, 1987). A través del monitoreo con ultrasonido se han observado intervalos de 23-42 días (Kamimura *et al.*, 1993; Hajurka *et al.*, 2005). La primera fase de recuperación se inicia desde la primera semana postparto en vacas que han tenido parto normal o con una buena condición corporal (CC) y que se alimentan equilibradamente; sin embargo, se retrasa en aquellas que han presentado

distocia, retención de placenta, enfermedades metabólicas durante el parto o desbalances nutricionales. Algunas de estas afecciones cursan con infecciones uterinas (Mateus *et al.*, 2002), las cuales provocan trastornos en el tejido uterino (endometritis) que a su vez afecta la regulación hipotalámica de la actividad ovárica; además, repercuten sobre la producción y secreción de prostaglandinas (E y F) y de progesterona (Sheldon y Dobson, 2004, Domínguez *et al.*, 2008). Las vacas con severo balance energético negativo durante las dos primeras semanas posparto están sometidas a un mayor estrés metabólico y celular, que retarda la reparación de los tejidos uterinos reduciendo, en consecuencia, la fertilidad (Wathes *et al.*, 2007).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la condición corporal al parto (CCAP) sobre la involución uterina, presencia de cuerpo lúteo (CL), clases de folículos ováricos, tipos de ovocitos y expresión del IGF-I y su receptor ovárico y hepático, en vacas mestizas hasta los 45 días posparto (DPP).

Materiales y Métodos

Animales y localización

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de la Sección de Bovinos, Instituto de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, en Maracay, estado Aragua. La precipitación promedio anual en la zona es de 800mm, con una temperatura promedio de 27°C. Se utilizó un total de dieciocho (n=18) vacas mestizas (3/4 a 1/2 *Holstein* × *Brahman*), con dos o más partos, las cuales fueron sometidas a los protocolos experimentales aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV. Los animales fueron evaluados desde el día 4 hasta el 45 DPP, una vez por sema-

na antes de la detección del primer celo y dos veces por semana a partir del mismo. Alcanzados los 45 DPP, un grupo de ocho animales (dos animales/tratamiento) fueron faenados en un frigorífico industrial (Matadero Industrial de Turmero, estado Aragua), colectándose muestras de hígado y de los ovarios.

Manejo general y alimentación

Las vacas fueron alojadas en puestos individuales techados ubicados en un corral de 18x2m. Cada puesto fue acondicionado con un comedero y un bebedero automático para el consumo de agua a voluntad. La alimentación se basó en el suministro de aproximadamente 2kg de alimento concentrado (AC), bloque multinutricional (BMN) y pacas de heno de pasto estrella (*Cynodon nlemfluensis*). El AC y el BMN fueron preparados en el laboratorio. El aporte calculado de la energía metabolizable (EM/kg) del AC y del BMN fue de 3,2 y 0,86 respectivamente. En el caso de la proteína cruda (PC) y proteína degradable en el rumen (RDP, por sus siglas en inglés) los aportes fueron de 23,1 y 19,3% para el AC y de 50,9 y 47,9% para el BMN, respectivamente. El pasto aportó 2,01EM/kg, 8,0% de PC y 4,68% de RDP.

Tratamientos y diseño del experimento

Las 18 vacas fueron asignadas al azar a los diferentes tratamientos (T). Los T quedaron conformados de la siguiente manera: T1 estuvo conformado por cuatro (n=4) vacas con condición corporal al parto (CCAP) baja (<2,5) + nivel de alimentación (NA) bajo (BCBA); T2: CCAP baja (<2,5) + NA alto (BCAA) (n=4); T3: CCAP alta (≥2,5) + NA bajo (ACBA) (n=4); y T4: CCAP alta (>2,5) + NA alto (ACAA) (n=4). La aplicación

de los tratamientos se inició a los 4 DPP. La CCAP fue determinada según la escala del 1 al 5 del NIRD (*National Institute of Research in Dairying*) modificado por Fattet y Jaurena (1988). Las vacas de CCAP alta tuvieron valores de CC ≥2,5 y, las vacas de CCAP baja, valores inferiores a 2,5. El NA alto fue asignado según el aporte de energía metabolizable de las dietas experimentales. Los requerimientos de las vacas fueron determinados de acuerdo a las tablas del *National Research Council* (NRC, 1989), en función del peso corporal y la producción de leche (promedio del total diario hasta los 60 días) de la lactancia anterior de cada una de las vacas. Así, en el NA bajo, la dieta cubría el 85% del requerimiento total de energía del animal (mantenimiento) y en el NA alto, las dietas aportaban el 115% del requerimiento total de energía. Se consideró mantener la relación de la cantidad de nitrógeno fermentable en el rumen (NFR) y la materia orgánica degradable (MODR) en el rumen (g NFR/kg MORD) entre 25-30, con el propósito de evitar efectos confundidos debido a la variación entre T por dicha causa.

Actividad ovárica

Las evaluaciones de la actividad ovárica se llevaron a cabo a través de la palpación rectal y del uso de ultrasonido por vía transrectal (Aloka SSD 900 Co. Ltd., Tokyo, Japan), desde el 15 al 45 DPP, usando una sonda transrectal lineal de 7,5MHz, y se realizaron una vez por semana antes de la detección visual del primer celo y dos veces por semana a partir de dicha detección. Las evaluaciones permitieron clasificar el crecimiento folicular en varias clases: Clase 1 (≤5mm), Clase 2 (6-9mm), y Clase 3 (≥10mm; Díaz *et al.*, 1998) y confirmar la presencia de cuerpos

lúteos detectados al examen clínico rectal.

Involución uterina

Se evaluó el proceso de involución uterina desde el 15 hasta el 45 DPP, empleando para esto las mismas técnicas de palpación y ultrasonido antes mencionadas. Para esta evaluación se empleó la clasificación de LeBlanc *et al.* (2002), la cual toma en cuenta la posición del útero (PU) con relación a la pelvis, la simetría de los cuernos uterinos (SCU) y el diámetro del cuerno uterino de la gestación previa y el diámetro del cervix (DC). Se tomaron muestras semanales de las secreciones cervicales utilizando hisopos, para realizar citologías y determinar el porcentaje de leucocitos polimorfonucleares (PMN) presente en la muestra. Las citologías fueron clasificadas en diversos grados que variaron entre de acuerdo a Kasimanickan *et al.* (2004). Además, se evaluaron las características físicas del moco cervical (CMC), empleando la clasificación de LeBlanc *et al.* (2002).

Niveles de progesterona en plasma

Se tomaron muestras de sangre en la vena yugular durante los 3, 15, 22, 33, 37 y 45 DPP para la determinación de la concentración de progesterona (P₄) en el plasma de las vacas en el experimento. Las muestras de sangre fueron analizadas mediante la técnica de RIA (Diagnostic Systems Laboratorios, DSL Inc., TX, EEUU), usando para esto un kit comercial validado (DSL, 2006) en fase sólida. Los niveles de P₄ para considerar el reinicio de actividad ovárica fueron las concentraciones >0,5ng/ml en dos muestras consecutivas, o cuando la concentración de P₄ en la muestra fue >1ng/ml (Meikle *et al.*, 2003). Los coeficientes de variación intra-ensayo e

TABLA I
MATRIZ DE CORRELACIÓN NO PARAMÉTRICA DE LA EVALUACIÓN REPRODUCTIVA DE VACAS MESTIZAS CON DIFERENTES CCAP EN EL 15, 22, 30, 37 Y 45 DPP

	T	CCAP	NA	Cito.	CMC	DC	PU	SCU	F1	F2	F3	CL
DPP 15												
T	1,00	0,772**	0,407	0,017	0,268	-0,097	0,232	-0,325	-0,054	0,00	0,462*	-0,041
CCAP	0,772**	1,00	0,100	0,129	0,021	-0,249	0,228	-0,324	-0,152	-0,162	0,329	0,200
NA	0,407	0,100	1,00	0,000	0,350	0,011	0,000	0,054	-0,076	-0,043	0,598*	-0,400
Cito.	0,017	0,129	0,000	1,00	-0,115	-0,009	-0,216	-0,214	-0,115	-0,167	-0,154	-0,172
CMC	0,268	0,021	0,350	-0,115	1,00	0,098	0,366	-0,098	0,251	0,125	0,160	-0,233
DC	-0,097	-0,249	0,011	-0,009	0,098	1,00	0,326	0,065	0,00	-0,215	-0,220	-0,058
PU	0,232	0,228	0,000	-0,216	0,366	0,326	1,00	0,059	-0,113	-0,020	-0,109	-0,061
SCU	-0,325	-0,324	0,054	-0,214	-0,098	0,065	0,59	1,00	-0,058	-0,047	0,181	0,029
F1	-0,054	-0,152	-0,076	-0,115	0,251	0,00	-0,113	-0,058	1,00	0,123	0,307	-0,178
F2	0,000	-0,162	-0,043	-0,167	0,125	-0,215	-0,020	-0,047	0,123	1,00	-0,116	-0,317
F3	0,462*	0,329	0,598*	-0,154	0,160	-0,220	-0,109	0,181	0,307	-0,116	1,00	-0,239
CL	-0,041	0,200	-0,400	-0,172	-0,233	-0,058	-0,061	0,29	-0,178	-0,317	-0,239	1,00
DPP 22												
T	1,00	0,772**	0,407	0,169	0,00	-0,080	0,131	0,075	-0,117	-0,062	0,611**	-0,304
CCAP	0,772**	1,00	0,100	0,164	-0,062	0,012	0,310	0,15	-0,221	0,00	0,553*	-0,209
NA	0,407	0,100	1,00	0,306	-0,124	-0,344	-0,126	0,195	-0,192	0,044	0,079	-0,209
Cito.	0,169	0,164	0,306	1,00	0,126	-0,193	0,370	0,160	-0,118	0,-507*	0,138	-0,222
CMC	0,00	-0,062	-0,124	0,126	1,00	-0,061	0,302	0,057	0,19	-0,199	-0,130	0,197
DC	-0,080	0,012	-0,344	-0,193	-0,061	1,00	0,158	-0,270	-0,151	0,075	-0,272	-0,029
PU	0,131	0,310	-0,126	0,370	0,302	0,158	1,00	0,168	-0,194	-0,231	-0,024	-0,027
SCU	0,075	0,115	0,195	0,160	0,057	-0,270	0,168	1,00	-0,124	0,050	-0,157-	-0,274
F1	-0,117	-0,221	-0,192	-0,118	0,119	-0,151	-0,194	-0,124	1,00	-0,203	0,213	-0,058
F2	-0,062	0,00	0,044	-0,507*	-0,199	0,075	-0,231	0,050	-0,203	1,00	-0,208	0,183
F3	0,611**	0,553*	0,079	0,138	-0,130	-0,272	-0,024	-0,157	0,213	-0,208	1,00	-0,378
CL	-0,304	-0,209	-0,209	-0,222	0,197	-0,029	-0,027	-0,274	-0,058	0,183	-0,378	1,00
DPP 30												
T	1,00	0,772*	0,322	-0,072	-0,068	0,129	0,203	0,462*	-0,061	-0,027	0,549*	0,134
CCAP	0,722**	1,00	0,169	-0,311	-0,292	0,079	0,500*	0,329	0,159	-0,111	0,663**	0,060
NA	0,322	0,169	1,00	-0,226	-0,164	-0,118	0,240	0,099	-0,032	-0,351	0,271	-0,182
Cito.	-0,072	-0,311	-0,226	1,00	0,399	0,059	-0,267	0,160	0,050	0,208	-0,238	0,306
CMC	-0,068	-0,292	-0,164	0,399	1,00	0,242	-0,278	0,037	-0,351	0,566**	-0,276	0,087
DC	0,129	0,079	-0,118	0,059	0,242	1,00	0,00	0,189	0,030	0,293	-0,322	0,472
PU	0,203	0,500*	0,240	-0,267	-0,278	0,00	1,00	0,120	0,175	0,148	0,561*	0,120
SCU	0,462*	0,329	0,099	0,160	0,037	0,189	0,120	1,00	-0,045	0,066	0,122	0,036
F1	-0,061	0,159	-0,032	0,050	-0,351	0,030	0,175	-0,045	1,00	-0,483*	-0,048	0,034
F2	-0,027	-0,111	-0,351	0,208	0,566**	0,293	0,148	0,066	-0,483*	1,00	0,000	0,199
F3	0,549*	0,663*	0,271	-0,238	-0,276	-0,322	0,561*	0,122	-0,048	0,000	1,00	0,122
CL	0,134	0,060	-0,182	0,306	0,087	0,472	0,120	0,036	0,034	0,199	0,122	1,00
DPP 37												
T	1,00	0,772**	0,407	-0,131	-0,280	0,241	0,225	-0,104	0,141	-0,018	0,252	0,352
CCAP	0,772**	1,00	0,100	-0,172	-0,470	0,148	0,316	-0,255	0,155	-0,022	-0,310	0,598*
NA	0,407	0,100	1,00	0,195	0,057	0,444	0,079	-0,025	-0,203	0,241	0,148	-0,209
Cito.	-0,131	-0,172	0,195	1,00	0,442*	0,395	0,145	-0,070	-0,417*	0,252	0,346	-0,151
CMC	-0,280	-0,470*	0,057	-0,442*	1,00	0,383	-0,024	-0,035	-0,284	0,382	0,432	-0,439
DC	0,241	0,148	0,444	0,395	0,383	1,00	0,128	-0,178	-0,042	0,543*	0,174	-0,322
PU	0,225	0,316	0,079	0,145	-0,024	0,128	1,00	-0,081	0,010	-0,162	0,057	0,189
SCU	-0,104	-0,255	-0,025	-0,070	-0,035	-0,178	-0,081	1,00	0,236	-0,514*	-0,247	0,122
F1	0,141	0,155	-0,203	-0,417*	-0,284	-0,042	0,010	0,236	1,00	-0,322	-0,302	0,162
F2	-0,018	-0,022	0,241	0,252	0,382	0,543*	-0,162	-0,514	-0,322	1,00	0,390	-0,524*
F3	-0,252	-0,310	0,148	0,346	0,432	0,174	0,057	-0,247	-0,302	0,390	1,00	-0,322
CL	0,352	0,598*	-0,209	-0,151	-0,439	-0,322	0,189	0,122	-0,524*	-0,524*	-0,322	1,00
DPP 45												
T	1,00	0,772**	0,407	0,081	0,407	-0,194	0,081	0,545*	-0,222	0,124	0,225	0,79
CCAP	0,722**	1,00	0,100	0,078	-0,400	-0,209	0,200	0,447	-0,147	0,055	0,079	0,194
NA	0,407	0,100	1,00	-0,267	-0,100	0,060	-0,100	0,224	-0,029	0,055	0,079	-0,055
Cito.	0,81	0,078	-0,267	1,00	-0,208	-0,013	-0,074	-0,022	-0,035	0,123	0,035	-0,012
CMC	-0,407	-0,400	-0,100	-0,208	1,00	0,478*	0,200	-0,149	0,117	0,277	0,000	0,055
DC	-0,194	-0,209	0,060	-0,013	0,478*	1,00	-0,239	0,00	0,035	0,033	0,189	-0,331
PU	0,081	0,200	-0,100	-0,074	0,200	-0,239	1,00	0,447	0,104	-0,055	0,00	0,055
SCU	0,545*	0,447	0,224	-0,022	-0,149	0,00	0,447	1,00	-0,116	0,124	0,236	-0,124
F1	-0,222	0,147	-0,029	-0,035	0,117	0,035	0,104	-0,16	1,00	0,087	-0,319	0,130
F2	0,124	0,055	0,055	0,592	0,277	0,033	-0,056	0,124	0,087	1,00	0,439	0,108
F3	0,225	0,079	0,079	0,035	0,00	0,189	0,00	0,236	-0,319	0,439	1,00	-0,439
CL	0,079	0,194	-0,055	-0,012	0,055	-0,331	0,055	-0,124	0,130	0,108	-0,439	1,00

T: tratamiento, CCAP: condición corporal al parto, NA: nivel de alimentación, Cito.: citología, CMC: característica física del moco cervical, DC: diámetro cervical, PU: posición del útero con relación a la pelvis, SCU: simetría de los cuernos uterinos, F1-F3: folículos clase 1-3, CL: cuerpo lúteo.
Nivel de significación de las correlaciones: * (P<0,05) y ** (P<0,01).

inter-ensayo fueron 6,78 y 12,02% respectivamente.

Toma de muestras de tejidos en el matadero

Ocho de los animales fueron faenados a los 45 DPP (2 animales/tratamiento). Inmediatamente después de la faena, se procedió a la toma de muestras de ovario e hígado. En el caso de los ovarios se tomaron muestras tanto para la clasificación de los ovocitos como para la expresión del IGF-I y de su receptor, seleccionando el ovario que en la última evaluación ginecológica hubiese tenido el folículo ovárico de mayor diámetro (Clase 3). Las muestras fueron inmediatamente conservadas en N₂ líquido y almacenadas a -80°C hasta ser procesadas.

Clasificación (calidad) de los ovocitos

Durante el sacrificio de las vacas se recolectaron los ovarios activos, luego de ~20min del sacrificio. La calidad de los ovocitos fue evaluada en el Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Reproducción Animal (IRA), Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV. Los ovarios se disecaron con bisturí y se colocaron en termos que contenían 500ml de medio de transporte (solución salina estéril a temperatura de 37-39°C). Cerca de 4h después de recolectados los ovarios se procedió a la aspiración de los folículos con diámetro >2mm. El contenido aspirado se colocó en tubos cónicos de 50ml (Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU) que contenían el medio de cultivo modificado con líquido folicular humano (HTF, Irvine Scientific, RU) a pH 7,4 y 37°C (Ruiz *et al.*, 2008). Este procedimiento sirvió para clasificar los ovocitos de acuerdo a Boni *et al.* (2002) en ovocitos tipo A (con presencia de un cumulus oophorus claro y compacto y un ooplasma

oscuro), B (ovocitos con un cumulus oophurus oscuro y compacto y un ooplama oscuro) y C (con cumulus oophurus oscuro), usando para esto un estereomicroscopio (Stemi SV8; Zeiss Jena GmbH, Alemania) con aumento de 100X.

Expresión del IGF-I y de su receptor por Western Blot

Se prepararon tres minigeles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (10-5% p/v) del tipo discontinuo (SDS-PAGE). En uno de estos geles, se descargó 200µg de proteínas (BCA; Pierce, Rockford, IL, EEUU) del tejido ovárico de los animales de cada tratamiento, así como los diferentes estándares empleados: estándar precoloreado de proteínas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU), muestras de ovario de rata y oveja (200µg, como controles positivos) y una muestra de ganglio bovino (200µg, como control negativo). En los otros dos geles se descargaron muestras de proteína del tejido hepático, usando como control positivo tejido hepático de oveja. Los procedimientos de electroforesis vertical, transferencia de proteínas a las membranas de nitrocelulosa y bloqueo de las membranas se realizaron siguiendo la metodología descrita por Ruiz y Kittok (2008). Dos de las membranas se incubaron con el primer anticuerpo para el receptor de IGF-I de humano producido en cabra (I-7151; Sigma, S. Louis, MI, EEUU) a una dilución 1:500, durante 16-20h a 4°C. La otra membrana, la cual contenía muestras de tejido hepático, se incubó con el primer anticuerpo para el IGF-I de humano producido en cabra (sc: 1422; Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU) a una dilución 1:50 durante 16-20h. Posteriormente, las tres membranas fueron incubadas con el segundo anticuerpo, IgG (molécula completa) de conejo anti-cabra conjugado con la enzima peroxidasa (A-5420; Sigma St. Louis, MI,

EEUU), durante 1h a 4°C. Este anticuerpo fue usado a una dilución de 1:160000. Las bandas proteicas inmunoreactivas se visualizaron mediante una reacción de quimioluminiscencia (Signal^R West Pico; Pierce, Rockford, IL, EEUU). Finalmente, las membranas se expusieron a películas de rayos X durante 30min.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SPSS versión 10 (Domínguez *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2008). Para evaluar el grado de asociación entre las variables CCAP, NA, población folicular, involución uterina (SCU, DC, PU, CMC y citología), tipo de ovocitos y presencia de CL, por ser todas variables respuesta de tipo cualitativo (discretas), se recurrió a un análisis estadístico del tipo no paramétrico. Primero, se calculó una matriz de correlación no paramétrica de Kendall para cada periodo de muestreo y posteriormente, se realizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, por tener un solo criterio de clasificación. En el caso de la variable clases de folículos, se aplicó el paquete estadístico *Statistix 8.0* tanto para DPP, como para los tratamientos. Las concentraciones de progesterona en plasma (variable continua) fueron analizadas empleando el paquete estadístico SPSS, Versión 10, mediante un modelo GLM para medidas repetidas en el tiempo, donde se estudio el efecto de los seis tratamientos en cada uno de los tiempos evaluados (3, 15, 22, 33, 37 y 45 DPP).

Resultados

Involución uterina y actividad ovárica

Los resultados de la matriz de correlación no paramétrica sobre la involución uterina

y actividad ovárica a los 15, 22, 30, 37 y 45 DPP se muestran en la Tabla I. Al analizar los datos mediante el análisis de varianza no paramétrico se detectó efecto del tratamiento sobre diámetro del cérvix ($p<0,05$), sobre la presencia del CL ($p<0,05$) y sobre el número de folículos Clase 3 (F3; $p<0,01$). Mientras que el tratamiento solo tendió a afectar el número de folículos Clase 1 (F1; $p<0,09$).

Concentraciones de progesterona en plasma

El tratamiento T4 afectó en forma altamente significativa la concentración de P_4 a lo largo de los diferentes

reveló una asociación negativa significativa de -0,816 ($p<0,05$) entre ovocitos tipo C y CCAP. El análisis de varianza no paramétrico detectó un efecto altamente significativo entre CCAP y ovocitos tipo C (Tabla II). Los resultados sobre el efecto del nivel de alimentación sobre el tipo de ovocitos fueron previamente publicados (Ruiz *et al.*, 2008).

Expresión del IGF y de su receptor en hígado y ovario

La expresión del IGF en el tejido hepático de la vaca fue evidenciada mediante la aparición de una banda proteica, expresada como valores de densidad óptica, con un peso

TABLA II
CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS EN VACAS MESTIZAS CON DIFERENTES CONDICIONES CORPORALES AL PARTO

Tratamiento	Nº ovocitos	A	B	C
CCAP alto	9	77,78% a n= 7	22,23% a n= 2	0 a n= 0
CCAP baja	29	72,42% a n= 21	6,90% a n= 2	20,69% b n= 6

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$).

DPP evaluados. En el caso del T3 en 37 y 45 DPP, las vacas con una CCAP alta y NA bajo mostraron una tendencia a que las concentraciones de P_4 fuesen mayores, en comparación con aquellos animales con una CCAP baja y un NA bajo o alto ($0,2344 \pm 0,2161$ vs $1,150 \pm 1,5238$ ng/ml; $P<0,093$) y ($0,2856 \pm 0,22995$ vs $1,3433 \pm 1,68925$ ng/ml; $P<0,081$), respectivamente.

Calidad de los ovocitos

El análisis de la matriz de correlación no paramétrica

molecular de ~18kDa (Figura 1). Se observó una mayor expresión de este factor de crecimiento en el grupo de animales que presentaba una mejor CCAP. La expresión del receptor de IGF-I tanto en el tejido hepático (Figura 2) como ovárico (Figura 3), se evidenció a través de una banda proteica de peso molecular de ~120kDa y ~130 kDa, respectivamente. La expresión del receptor para el IGF-I en las muestras de hígado no parece estar afectado por los tratamientos (Figura 2), mientras que su expresión en las muestras de tejido ová-

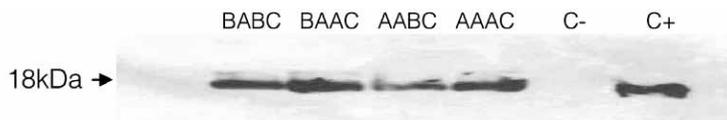


Figura 1. Expresión del IGF-I en el hígado de vacas mestizas con diferentes condiciones corporales y sometidas a dos niveles de alimentación a los 45 DPP. C+: control positivo, C-: control negativo, BABC: nivel de alimentación baja y CCAP baja, BAAC: nivel de alimentación bajo y CCAP alta, AABC: nivel de alimentación alta y CCAP bajo, AAAC: nivel de alimentación alta y CCAP alta.

rico, parece ser mayor en los animales que recibieron una buena alimentación, independientemente de la condición corporal del animal al parto (Figura 3).

poral con que los animales parieron.

En el periodo comprendido entre los 28 y 35 DPP se evidencia la normalización de las características

recolectaron ovocitos de vacas de diferentes condiciones corporales faenadas en matadero, encontrando que en las vacas de condición corporal alta, el 79% de sus ovocitos fueron de buena calidad ($p < 0,05$); en contraste, las vacas con una condición corporal pobre tuvieron bajo rendimiento en el número de ovocitos colectados, lo cual estuvo relacionado con el nivel de energía de la dieta. Los resultados anteriores coinciden con los publicados por nuestro grupo de investigación, en los que se pudo evidenciar que las vacas alimentadas con alto nivel energético presentaron mayor número de ovocitos tipo A, así como mayores niveles de glucosa pospandrial ($p < 0,05$) y menor expresión del receptor de glucosa tipo-1 (Glut-1) en el tejido adiposo (Ruiz *et al.*, 2008).

La condición corporal tiene un significativo efecto sobre el número de folículos y sobre el rendimiento y calidad de los ovocitos (Rhind *et al.*, 1989; Domínguez, 1995). Las observaciones de estos trabajos indican que la calidad de los ovocitos está asociada con la reducción de la fertilidad en las vacas de CC baja al parto, las que probablemente se encuentran en un balance energético negativo.

En el presente estudio se evidenció un efecto altamente significativo de T sobre el número de folículos Clase 3 (F3) y, en menor grado, con el número de folículos Clase 1 (F1). La CCAP tuvo solo efecto sobre los F3 ($p < 0,01$), mientras que el NA afectó tanto a los F3 ($p < 0,05$) como a los F1 ($p < 0,05$). De lo anterior se puede inferir que la CC al momento del parto es un factor determinante en la activación de las formas más inmaduras de folículos, estimulando el desarrollo de nuevas cohortes foliculares potencialmente

ovulables y, por ende, la capacidad de las vacas para reiniciar la actividad reproductiva.

Se evidenció una mayor expresión del receptor hepático del IGF-I en el grupo de animales con una CCAP alta y que están sometidos a un NA alto (Figura 2). Mientras que la expresión de los receptores ováricos del IGF-I fue mayor en las vacas que fueron sometidas a un régimen alimenticio alto, en comparación con aquellas sometidas a un régimen bajo, independientemente de su CC al momento del parto (Figura 3), pudiéndose sugerir que el consumo alto de nutrientes mejora el balance energético en el postparto de la vaca lechera, lo cual provoca elevación de los niveles sanguíneos de insulina con su correspondiente efecto sobre el eje somatotrófico, descenso de los niveles sanguíneos de la GH y elevación del IGF hepático (Lucy, 2004). Lake *et al.* (2006) observaron que las vacas con CC bajas tenían niveles más altos de GH y menores del IGF-I, comparadas con aquellas que presentaban una mejor CC. En el presente trabajo, la expresión del IGF-I hepático fue mayor en el grupo de animales que parieron con una CC alta (Figura 1). Sin embargo, nutricionalmente es posible inducir cambios en la secreción hepática del IGF-I, el cual tiene un efecto directo sobre el ovario a través de su acción endocrina (Lucy, 2004). En la cerda, la síntesis de IGF-I ovárico es dependiente de la GH (Kirby *et al.*, 1996), pero este efecto no ha podido aun ser detectado en la vaca. El IGF-I en el ovario interactúa con su receptor localizado en el *cumulus oophorus* de los folículos pequeños, para acelerar el ciclo celular meiótico de los ovocitos (Sakaguchi *et al.*, 2002). Monget y Monniaux (1995) observaron que las actividades autocrinas-paracrinas de IGF-I y -II incluyen el estímulo sobre

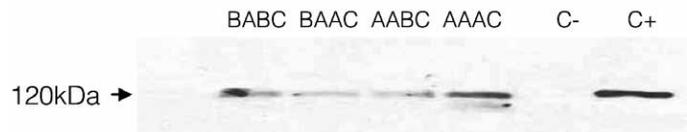


Figura 2. Expresión del receptor IGF-I en el hígado de vacas mestizas con diferentes condiciones corporales y sometidas a dos niveles de alimentación a los 45 DPP.

C+: control positivo, C-: control negativo, BABC: nivel de alimentación baja y CCAP baja, BAAC: nivel de alimentación bajo y CCAP alta, AABC: nivel de alimentación alta y CCAP bajo, AAAC: nivel de alimentación alta y CCAP alta.

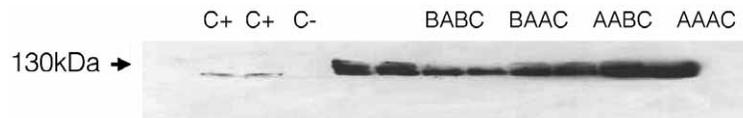


Figura 3. Expresión del receptor IGF-I en el ovario de vacas mestizas con diferentes condiciones corporales y sometidas a dos niveles de alimentación a los 45 DPP.

C+: control positivo, C-: control negativo, BABC: nivel de alimentación baja y CCAP baja, BAAC: nivel de alimentación bajo y CCAP alta, AABC: nivel de alimentación alta y CCAP bajo, AAAC: nivel de alimentación alta y CCAP alta.

Discusión

A medida que progresó el periodo postparto se evidenció como el moco cervical alcanzaba sus características normales. El porcentaje de PMN en las muestras de este moco también estuvo asociada la variable de característica del moco cervical (37 DPP), coincidiendo con lo reportado por LeBlanc *et al.* (2002). Se evidenció un efecto del tratamiento (CCAP y NA) sobre la presencia del CL y sobre los niveles circulantes de P_4 plasmática después del 37 DPP, momento en el cual la mayoría de las vacas iniciaron su actividad ovárica. Las vacas que parieron con una CCAP alta, aún cuando recibieron un NA bajo (T3), mostraron una tendencia a que las concentraciones de P_4 fuesen mayores, en comparación con aquellos animales con una CCAP baja que recibían un NA bajo o alto. Ello permite inferir que el factor que más impactó los niveles plasmáticos de P_4 fue la condición cor-

pórficas del moco endometrial y disminución del diámetro cervical (Perea *et al.*, 1997), lo cual se asocia con la aparición del CL. Esto indica el avance en el proceso de involución uterina y en el reinicio de la actividad reproductiva en estos animales. En este estudio el diámetro cervical fue la variable de involución uterina que estuvo afectada por el tratamiento ($p < 0,05$).

Se pudo evidenciar que la CCAP afectó el número de ovocitos tipo C ($p < 0,05$). En las vacas que parieron con una CCAP baja, aproximadamente el 21% del total de sus ovocitos se mantuvieron en su forma menos desarrollada, lo cual condujo a la disminución del porcentaje de ovocitos tipo A, potencialmente ovulables. Esto permite sugerir que las vacas que paren con una buena condición corporal son capaces de iniciar su actividad reproductiva después del parto más eficiente que aquellas vacas que paren con una baja reserva corporal. Fihri *et al.* (2005)

el crecimiento celular, incremento de la producción de P₄ y E₂, y aumento de la sensibilidad de las células de la granulosa al estímulo de FSH en bovinos.

Conclusiones

La condición corporal al parto es un factor determinante para la reinicio de la actividad reproductiva durante el postparto.

El IGF-I funciona como un modulador de la acción de las gonadotropinas a nivel ovárico en esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT) por aportar los recursos para la realización de esta investigación a través del Proyecto N° G-2005000446 y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela (UCV) por aportar los fondos para la difusión de los resultados de esta investigación.

REFERENCIAS

- Boni R, Cuomo A, Tosti E (2002) Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biol. Reprod.* 66: 836-842.
- Butler WR (2000) Nutritional Interactions with Reproductive Performance in Dairy Cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 449-457.
- Díaz T, P-Schmitt EJ, de la Sota RL, Thatcher MJ, Thatcher WW (1998) Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *J. Anim. Sci.* 76: 1929-1936.
- Dominguez MM (1995) Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology* 43: 1405-1418.
- Domínguez C, Ruiz AZ, Pérez R, Martínez N, Drescher K, Pinto L, Aráneda R (2008) Efecto de la condición corporal al parto y del nivel de alimentación sobre la involución uterina, actividad ovárica, preñez y la expresión hipotalámica y ovárica de los receptores de leptina en vacas doble propósito. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV* 49: 23-36.
- Drackley JK (1999) ADSA Foundation scholar award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J. Dairy Sci.* 82: 2259-2273.
- DSL (2006) *Immodiagnostic Assays for Animal Applications*. www.AnimalDx.com. (Cons.: 18/12/2008).
- Fattet I, Jaurena M (1988) *El Estado Corporal de las Vacas Lecheras*. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 5 pp.
- Fihri AF, Lakhdi H, Derqoui L, Naciri M, Goumari A (2005) Genetic and nongenetic effects on the number of ovarian follicles and oocyte yield and quality in the bovine local (Oulmes Zaer), exotic breeds and their crosses in Morocco. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 9-13.
- Fortune JE, Rivera GM, Yang MT (2004) Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 109-126.
- Guilbault LA, Thatcher WW, Drost M, Haibel GK (1987) Influence of physiological infusion of prostaglandin F2a into postpartum cows with partial suppressed endogenous production of prostaglandin. Uterine and ovarian morphological responses. *Theriogenology* 27: 931-946.
- Hajurka J, Macak V, Hura V (2005) Influence of health status of reproductive organs on uterine involution in dairy cows. *Bull. Vet. Pulawy* 49: 53-58.
- Kamimura S, Ohgey T, Takahashi M, Tsukamoto T (1993) Postpartum resumption of ovarian activity and uterine involution monitored by ultrasonography in Holstein cows. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 643-647.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH (2004) Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum of dairy cows. *Theriogenology* 62: 9-23.
- Kim JW, Rhoads RP, Block SS, Overton TR, Frank SJ, Boisclair YR (2004) Dairy cow experience selective reduction of the hepatic growth hormone receptor during the periparturient period. *J. Endocrinol.* 181: 281-290.
- Kirby CJ, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, Lucy MC (1996) Effect of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary, and oviduct. *Biol. Reprod.* 55: 996-1002.
- Lake SL, Scholljegerdes EJ, Hallford DM, Moss GE, Rule DC, Hess BW (2006) Effect of body condition score at parturition and postpartum supplemental fat on metabolite and hormone concentration of beef cows and their suckling calves. *J. Anim. Sci.* 84: 1038-1047.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH (2002) Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 2223-2236.
- Lindell JO, Kindahl H, Jansson L, Edqvist LE (1982) Postpartum release of prostaglandin F2a and uterine involution in the cow. *Theriogenology* 17: 237-245.
- Lucy MC (2004) Mechanisms linking the somatotrophic axis with insulin. Lessons for the postpartum cow. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 64:19-23.
- Lucy MC (2008) Functional differences in the growth hormone and insulin like growth factor axis in cattle and pigs: implications for the postpartum nutrition and reproduction. *Rep. Domest. Anim.* 43: 231-239.
- Mateus L, Lopez da Costa L, Bernardo F, Robalo Silva J (2002) Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 31-35.
- Meikle A, Cavestany D, Blanc J, Krall E, Uriarte G, Rodríguez-Iraozquil M, Rupprechter G, Ferraris A, Chilbroste P (2003) Perfiles metabólicos y endocrinos, parámetros productivos y reproductivos en vacas de leche en condiciones pastoriles. *Veterinaria* 40: 25-40.
- Monget P, Monniaux D (1995) Growth factors and the control of folliculogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 49 (Suppl 1): 321-333.
- NRC (1989) *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 6ª ed. rev. National Academy Press. Washington, DC, EEUU. 157 pp.
- Perea GF, Cruz AR, González FR, Soto BE, González SC, Rincón UE (1997) Evaluación ultrasonográfica de la involución uterina en vacas mestizas tropicales. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 5 (Supl. 1): 368-369.
- Radcliff RP, McCormack BL, Crooker BA, Lucy MC (2003) Growth hormone (GH) binding and expression of GH receptor 1A mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 3933-3940.
- Rhind SM, Mckelvey WAC, McMullen SR, Gunn RG, Elston DA (1989) Effect of restricted food intake, before and/or after mating, on the reproductive performance of greyface ewes. *Anim. Prod.* 48: 149-155.
- Ruiz EAZ, Kittok R (2008) Detección de la subunidad NMDAR-1 del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) en el hipotálamo del ovino mediante el análisis de Western blot. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* 18: 148-153.
- Ruiz AZ, Domínguez C, Martínez N, Pinto L, Drescher K, Rossini M, Pérez R, Rojas J, Aráneda R, Fernández A, Jerez N (2008) Efecto del nivel de alimentación sobre la actividad ovárica, expresión de transportadores de glucosa y tolerancia a la insulina en vacas mestizas durante el postparto. *Zootec. Trop.* 26: 95-104.
- Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL (2002) Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicle oocytes by growth factor in vitro. *Reproduction* 123: 135-142.
- Sheldon IM, Dobson H (2004) Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 295-306.
- Slama H (1996) Prostaglandines, leucotrienes et suinvolución uterine chez la vache. *Rec. Med. Vet.* 173: 369-381.
- Wathes DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R (2007) Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* 68: 232-241.