

RELACIÓN ENTRE BALANCE ENERGÉTICO, CONCENTRACIÓN DE METABOLITOS SANGUÍNEOS Y EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DEL RECEPTOR TIPO 1 DE OREXINA Y NEUROPEPTIDO Y EN VACAS MESTIZAS DURANTE EL POSTPARTO

Relationship among Energy Balance, Blood Metabolites and Hypothalamic Expression of Orexin Receptor Type 1 and Neuropeptide Y in Crossbred Dairy Cows during Postpartum

Livia V. Pinto-Santini^{*1}, Nelson Martínez^{*}, Karin Drescher^{*}, Isamery Machado^{*}, Carlos Domínguez^{**} y Ana Z. Ruiz^{***}

^{*}*Instituto de Producción Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela*

^{**}*Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos*

^{***}*Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela*

Correo-E: pintol@agr.ucv.ve

Recibido: 23/11/10 - Aprobado: 22/07/11

RESUMEN

En vacas mestizas bajo condiciones tropicales, donde la oferta y calidad de la dieta pueden ser limitadas, la relación entre el estatus energético (EE), metabólico y productivo de los animales son aún poco claras. En tal sentido, 27 vacas (3/4 a 5/8 *Bos taurus* x 1/4 a 3/8 *Bos indicus*) doble propósito (DP), fueron distribuidas al azar en los siguientes tratamientos, tomando en cuenta la condición corporal (CC) al parto (P) y el nivel de alimentación (A) postparto (PP): 1) CAAA: CC alta al P (CA: $\geq 2,5$) y alto A PP (AA); 2) CBAA: CC baja al P (CB: $< 2,5$) y AA; 3) CAAB: CA y bajo A PP (AB) y, 4) CBAB: CB y AB. Se evaluó el balance energético (BE) PP; la concentración de glucosa (GLU), colesterol (COL) y nitrógeno ureico (NU) y, la expresión hipotalámica del neuropeptido Y (NPY) y el receptor tipo 1 de orexina (OX-1R) por *Western Blot*. Se aplicó ANAVAR para medidas repetidas en el tiempo, incluyendo el efecto de CC, nivel de A y su interacción. No hubo efecto de CC x A en las variables evaluadas. Las vacas AA consumieron (kg.anim.d⁻¹) más alimento (10,9 a 12,9) que las

ABSTRACT

In crossbred dairy cows under tropical conditions, where supply and diet quality may be limited, the relationship among energy status (ES), metabolic and productive status of the animals are still not clear. In this regard, 27 dual purpose (DP) cows (3/4 to 5/8 *Bos taurus* x 1/4 to 3/8 *Bos indicus*), were randomly assigned to the following treatments, a combination of body condition (BC) at calving (AC) and feeding level (FL) postpartum (PP): 1) HBCHFL: High BC to PP (BC: ≥ 2.5) and high FL PP (HFL), 2) LBCHFL: Low BC to PP (BC: < 2.5) and HFL, 3) HBCLFL: HBC and low FL PP (LFL) and 4) LBCLFL: LBC and LFL. Energy balance (EB) PP, the concentration of glucose (GLU), cholesterol (COL) and urea nitrogen (UN) and hypothalamic expression of neuropeptide Y (NPY) and orexin receptor type 1 (OX-1R) by Western Blot, were evaluated. The data was analyzed by ANOVA for repeated time measures, including the effect of BC level of FL and their interaction. No effect of BC x FL on any variable was found. Cows under HFL consumed (kg.anim.d⁻¹) more feed (10.9 to 12.9

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

AB (8,8 a 10,6) ($P < 0,01$); sin embargo, el BE fue negativo ($-7,9 \pm 19,4$ para AA y $-27,2 \pm 13,1$ para AB; $P < 0,01$). Se obtuvo una concentración promedio de GLU (mg.dL^{-1}) de 61,5 y 56,7 ($P < 0,05$) y COL (mg.dL^{-1}) de 142,6 y 157,6 ($P = 0,10$) para CA y CB, respectivamente, sin efecto de A. El NU (mg.dL^{-1}) fue afectado por A (15,9 para AB y 19,2 para AA; $P < 0,05$). Se observó una reducción de la expresión del neuropéptido Y (NPY) y receptor-1 de orexina (OX-1R) en CBAB a los 45 d PP, asociado a una disminución de la respuesta del sistema nervioso central por la magnitud de la restricción energética. La CC al P es el componente del EE más importante a considerar en sistemas de DP, sobre todo, cuando la dieta no permite elevados consumos y aportes de energía neta.

(Palabras clave: Balance de energía, metabolitos, vaca, concentración, glucosa, colesterol, neuropéptidos, nitrógeno de la urea sanguínea)

INTRODUCCIÓN

Los nutrientes disponibles los procesos productivos dependen tanto del aporte de la dieta (consumo en cantidad y calidad) como de las reservas corporales. Cuando el consumo de energía neta es inferior a la requerida para los procesos fisiológicos (metabolismo basal y producción de calor) y productivos (crecimiento, lactancia y gestación), los animales se encuentran en balance energético negativo (BEN), recurriendo a sus reservas corporales para intentar suplir sus necesidades (McDonald *et al.*, 1999). Esta situación se presenta comúnmente en vacas lecheras al inicio de la lactancia, asociándose a los altos niveles de producción de leche alcanzados antes de presentarse el máximo consumo de alimento (Lucy *et al.*, 1991), así como a implicaciones genéticas que favorecen la movilización de reservas con fines homeorréticos (Cronjé, 2000). Las relaciones bidireccionales entre el aporte de nutrientes de la dieta y las reservas corporales son percibidas por el hipotálamo, el cual regula, a corto y largo plazo, el consumo voluntario de alimento. El área lateral hipotalámica (centro del apetito), vía señales orexigénicas, es responsable de la estimulación del consumo. El área ventromedial (centro de la saciedad) se relaciona, mediante la percepción de

than LFL (8.8 to 10.6) ($P < 0.01$), however, the EB was negative (-7.9 ± 19.4 for HFL and -27.2 ± 13.1 for LFL, ($P < 0.01$). The GLU (mg.dL^{-1}) concentration was of 61.5 and 56.7 ($P < 0.05$) and COL (mg.dL^{-1}) of 142.6 and 157.6 ($P = 0.10$) for HBC and LBC, respectively, without effect of FL. The UN (mg.dL^{-1}) was affected by FL (15.9 to 19.2 for LFL and HFL, ($P < 0.05$). A reduction of NPY expression and OX-1R in the 45 d LBCLFL PP was observed and was associated to a diminished central nervous system response caused by marked energetic restriction. The BC to PP is the most important component of ES to consider in DP systems, especially when the diet does not allow high consumption and input of total energy.

(Key words: Energy balance, metabolites, cows, attention, glucose, cholesterol, neuropeptides, blood urea nitrogen)

señales anorexigénicas, con la inhibición del consumo de alimentos (Sakurai *et al.*, 1998). El neuropéptido Y (NPY) y las orexinas (OX) son parte de los neuromoduladores orexigénicos más estudiados hasta ahora; en condiciones de BEN, su activación, que también es dependiente de las hormonas metabólicas y algunos metabolitos, se asocia con mecanismos de compensación para incrementar el consumo y mejorar la situación de estrés nutricional. Las neuronas que sintetizan el NPY, localizadas en el núcleo arqueado, presentan receptores para glucosa, leptina, insulina y corticosterona (Chelikani *et al.*, 2004). Estudios en rumiantes demuestran que el ayuno y la restricción de alimento disminuyen las concentraciones plasmáticas de leptina e insulina aumentando la síntesis de NPY (Chelikani *et al.*, 2004). Dos clases de OX (OXA y OXB), ambas provenientes del precursor proteico pre-pro-orexina, han sido identificadas (Sakurai *et al.*, 1998). La acción de la OXA es mediada por el receptor tipo 1 (OX-1R) acoplado a la proteína G (Sakurai *et al.*, 1998). Similar al NPY, las neuronas que sintetizan OX son también reguladas por hormonas y metabolitos periféricos como la leptina, insulina, el ligando natural del secretagogo de la hormona de crecimiento (*ghrelina*) y glucosa. Estudios inmunohistoquímicos en cerebro de ratas demuestran la interacción anatómica entre los axones

terminales de OX y NPY, lo que evidencia que ambos péptidos forman parte de un circuito neuronal regulador del consumo. Mucho se ha avanzado en la comprensión de la relación entre los mecanismos reguladores del consumo, el balance energético y el estatus nutricional de los animales. Trabajos en roedores (Maffei *et al.*, 1995), humanos (Considine *et al.*, 1997) y ruminantes (Block *et al.*, 2003), así lo confirman. En vacas mestizas (*Bos taurus* x *Bos indicus*), el mecanismo de partición de los nutrientes disponibles durante la lactancia posiblemente difiere del de las vacas lecheras especializadas de razas puras, sobre todo, cuando el consumo o calidad de la dieta es limitado (Pinto-Santini, 2009). El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la relación entre el balance energético postparto, la concentración de glucosa, colesterol y nitrógeno ureico y la expresión hipotalámica de NPY y OX-1R en vacas mestizas durante el postparto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y duración

El experimento se realizó en el Laboratorio Sección de Bovinos del Instituto de Producción Animal (IPA), Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (FAGRO-UCV). La localidad, ubicada a 432 m de altitud, presenta un clima seco tropical (Holdridge, 1979). La precipitación (600 - 800 mm anuales) se concentra en los meses de mayo a octubre, la temperatura ambiente promedio es 26,5°C y la humedad relativa es 60% en los meses secos y 80% en los meses de lluvia (según datos climáticos históricos de la estación meteorológica 804139 SVBS de Maracay-Base Aérea Sucre, ubicada a 10,25° de latitud norte y 67,65° de longitud oeste, altitud 436 m). El experimento se llevó a cabo durante los primeros 90 d postparto (PP) de cada vaca y tuvo una duración total de aproximadamente nueve meses, entre julio 2006 y marzo 2007.

Animales y manejo general

Se utilizaron 27 vacas mestizas (3/4 a 5/8 *Bos taurus* x 1/4 a 3/8 *Bos indicus*), gestantes de dos o más partos, distribuidas en los tratamientos de acuerdo a su condición corporal (CC) al parto (escala modificada NIRD - *National Institute of Research in Dairy Science* del 1 al 5; Fattet y Jaurena,

1988) y el nivel de producción de leche, hasta los 60 d de la lactancia anterior. A partir del cuarto día PP las vacas fueron confinadas individualmente, ofreciéndoseles heno de pasto estrella (*Cynodon nlenfuensis*), bloque multinutricional (BMN) y agua fresca a voluntad. Las vacas se ordeñaron mecánicamente dos veces al día (06:00 y 16:00 h) y se aplicó amamantamiento restringido durante 30 min, posterior al ordeño de la mañana. En cada ordeño se suministró, individualmente, una porción pre-establecida de suplemento alimenticio de acuerdo al tratamiento. La cantidad de heno ofrecida por día se suministró en dos comidas (08:00 y 15:00 horas). El BMN fue suministrado *ad libitum*. El aporte estimado de nutrientes del suplemento y BMN fue: energía metabolizable (EM) de 3,2 y 0,86 Mcal.kg⁻¹; proteína cruda (PC) de 23,1 y 50,9%, y proteína degradable en el rumen de 19,3 y 47,9%, respectivamente. Con relación al heno, se estimó un aporte de 1,9 Mcal.kg⁻¹ de EM y 10% de PC (Combellas, 1998).

Diseño experimental y tratamientos

El diseño del experimento fue completamente al azar. Los tratamientos fueron la combinación de los factores: CC al parto y nivel de alimentación (A) PP y fueron los siguientes: 1) CAAA: CC Alta al parto (CA: $\geq 2,5$) y A PP alto (AA); 2) CBAA: CC al parto baja (CB: $< 2,5$) y AA; 3) CAAB: CA y A PP bajo (AB) y, 4) CBAB: CB y AB.

El nivel de A PP fue asignado según el aporte de EM de los alimentos, siguiendo las recomendaciones de las tablas de requerimientos (NRC, 1989) y, fueron calculados en función del peso vivo y de la producción de leche diaria promedio hasta los 60 d de la lactancia anterior de cada vaca. Así, en AB la dieta se diseñó para cubrir el 85% de los requerimientos de EM y en AA, la dieta cubría 115% de los requerimientos de EM.

Variables evaluadas

Consumo y análisis químico de los alimentos. El consumo de heno, suplemento y BMN fue determinado diariamente en forma individual, por diferencia de peso entre lo ofrecido y lo rechazado en base seca. Los análisis químicos efectuados fueron: a) para el heno al inicio, a la mitad y al final del experimento: materia seca, PC, extracto etéreo, fibra cruda, cenizas, fibra detergente neutra y ácida (FDN y FDA), calcio y

fósforo; b) para el suplemento y BMN, al inicio y mitad del experimento: PC, extracto etéreo, cenizas, calcio y fósforo. Los análisis bromatológicos (PC, extracto etéreo y cenizas) se realizaron según metodología AOAC (1990); FAD y FDN por el método de Goering y Van Soest (1970); calcio por espectrofotometría de absorción atómica (Fick *et al.*, 1979) y fósforo, por colorimetría (Harris y Popat, 1954). Todos los análisis fueron efectuados en el Laboratorio de Nutrición Animal del IPA en la FAGRO-UCV.

Peso vivo (PV) y CC. La determinación del PV y la CC se realizó a los 3 y 15 d después del parto y luego cada 15 d durante todo el experimento. Posterior al ordeño y amamantamiento de la mañana, las vacas fueron pesadas en romana (Fair Bank Morse & Co, Chicago, IL, EUA \pm 1 kg), para determinar su PV. La CC fue determinada según la escala de NIRD del 1 al 5, modificado por Fattet y Jaurena (1988). La apreciación en la escala de CC fue de 0,25 puntos (Edmonson *et al.*, 1989).

Producción de leche total (PLT). Para la estimación de la PLT semanal se evaluaron las fracciones: a) leche vendible y b) leche consumida por el becerro. La leche vendible fue evaluada diariamente. Para ello se midió, utilizando un balón aforado con capacidad de $30 \pm 0,1$ kg, la leche producida en los dos ordeños diarios. La leche consumida por el becerro se estimó dos veces por semana por doble pesaje de los becerros (antes y después del amamantamiento). La PLT fue ajustada al 3,5% de grasa.

Balance energético (BE) y consumo de PC total. El BE PP fue estimado individualmente como la relación entre la energía neta consumida ($EN_{CONSUMIDA}$) y la energía neta total requerida ($EN_{REQ-TOTAL}$).

Las ecuaciones utilizadas fueron:

$$BE (\%) = [(EN_{CONSUMIDA} - EN_{REQ-TOTAL} / EN_{REQ-TOTAL}) * 100]$$

$$EN_{CONSUMIDA} (\text{Mcal}) = ENH + ENSA.$$

$$ENH (\text{Mcal}) = [2,86 - 0,0262 (\% \text{ FDN del heno})] * \text{Consumo de Heno (Mertens, 1983)}.$$

$$ENSA (\text{Mcal}) = [0,0245 (\% \text{ TND}) - 0,12] * \text{Consumo de suplemento (NRC, 1989), donde:}$$

$$\text{TND (total de nutrientes digestibles)} = [\% \text{ PC} * (\% \text{ digestibilidad PC}/100)] + [\% \text{ extracto etéreo} * (\% \text{ digestibilidad extracto etéreo}/100)] + [\% \text{ fibra cruda} * (\% \text{ digestibilidad fibra cruda}/100)] + [\% \text{ ELN} * (\% \text{ digestibilidad ELN}/100)].$$

$$\text{ELN (extracto libre de nitrógeno)} = 100 - (\%$$

agua + % PC + % extracto etéreo + % fibra cruda + % ceniza).

$$EN_{REQ-TOTAL} (\text{Mcal}) = EN_{REQ-MANTENIMIENTO} + EN_{REQ-LECHE}$$

$$EN_{REQ-MANTENIMIENTO} (\text{Mcal}) = 0,08 * PV^{0,75} \text{ (NRC, 1989)}.$$

$$EN_{REQ-LECHE} (\text{Mcal}) = 0,74 * \text{Promedio de PLT (NRC, 1989)}.$$

El consumo de PC total fue estimado mediante el aporte proteico del heno, suplemento y BMN y su consumo promedio por semana.

Concentraciones séricas de glucosa (GLU), colesterol total (COL) y nitrógeno ureico (NU). Las muestras de sangre para la determinación de GLU, COL y NU se extrajeron de la vena yugular, luego del ordeño de la mañana, a los 3 y 15 d PP y posteriormente, cada 15 d, hasta los 90 d. Todos los metabolitos fueron determinados por métodos enzimáticos-espectrofotométricos según lo descrito por Henry *et al.* (1974) para la GLU, Rivas *et al.* (2006) para el COL y Tabacco *et al.* (1979) para el NU.

Expresión hipotalámica del neuropéptido Y (NPY) y del receptor tipo 1 de orexina (OX-1R). Se realizó mediante la técnica de Western Blot. Para ello se prepararon dos mini geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (10-5% p/v) del tipo discontinuo (SDS-PAGE). En estos geles se descargaron 200 μg de proteínas cuantificadas mediante kit de BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA), de muestras de tejido hipotalámico de dos animales de cada tratamiento, los cuales fueron faenados a los 45 d PP y cuyas muestras fueron inmediatamente conservadas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a -80°C hasta ser procesadas (Ruiz y Kittok, 2008). Las proteínas fueron separadas mediante un sistema de electroforesis vertical (GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA). Además, los geles fueron cargados con diferentes estándares: estándar precoloreado de proteínas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), muestras de tejido adiposo de rata y ratón (100 μg , como controles positivos) y una muestra de ganglio bovino (100 μg , como control negativo). 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).

La primera membrana fue incubada con el primer anticuerpo para el NPY de humano producido en conejo (E-17: sc-14727, Santa Cruz Biotechnology, EUA) a una dilución 1:200, durante 16-20 h a 4°C, luego de lo cual fue lavada tres veces con TBST durante 5 min. Posteriormente, fue incubada con el segundo anticuerpo (dilución de 1:200), anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado con la enzima peroxidasa (A-5420, Sigma, Saint Louis, MO, EUA), durante 1 h a 4°C. La segunda membrana se incubó con el primer anticuerpo para el OX-1R de humano producido en conejo (C-19 sc-8070, Santa Cruz Biotechnology, EUA) a una dilución 1:25 durante 16-20 h a 4°C y luego fue incubada con el segundo anticuerpo, policlonal de cabra anti-conejo conjugado con la enzima peroxidasa (A-5420, Sigma, Saint Louis, MO, EUA), durante 1 h a 4°C. El segundo anticuerpo fue usado a una dilución de 1:333,33. Las bandas proteicas inmunoreactivas se visualizaron mediante una reacción de quimioluminiscencia (*SignalR West Pico*; Pierce, Rockford, IL, EUA). Finalmente, las membranas se expusieron a películas de rayos X durante 30 min para visualizar las bandas proteicas respectivas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó un análisis de varianza para medidas repetidas en el tiempo usando el programa estadístico StatView versión 5,0 (SAS Institute Inc. Copyright, 1992-1998) que seleccionó en forma automática la estructura de covarianza apropiada a los datos. El modelo estadístico incluyó los efectos de la CC al parto, nivel de APP, semanas y/o días PP y las interacciones correspondientes. Se aplicó la prueba de comparación de medias por Duncan para las variables cuyas diferencias fueron significativas ($P < 0,05$). Los resultados se expresan como promedio \pm DE.

RESULTADOS

Consumo y análisis químico de los alimentos

No hubo efecto de la interacción CC x A sobre ninguna de las variables evaluadas. El nivel de A afectó el consumo de materia seca (CMS) total ($P < 0,01$; Tabla 1); las vacas del grupo AA comieron más ($10,9 \pm 2,2$ a $12,9 \pm 1,3$ kg MS.anim. d⁻¹) que las del grupo AB ($8,8 \pm 1,7$ a $10,6 \pm 0,9$

kg MS.anim.d⁻¹) y no se observó efecto de la CC. El CMS aumentó las primeras semanas PP y se estabilizó a partir de la cuarta semana ($P < 0,01$). Por tratamiento, el CMS promedio fue (kgMS.anim. d⁻¹): $12,6 \pm 1,3$ para CAAA; $10,0 \pm 1,0$ para CAAB; $11,6 \pm 2,2$ para CBAA y $9,9 \pm 1,3$ para CBAA. Se observó una tendencia ($P = 0,09$) en las vacas de CB a consumir más alimento (CMS/100 kg PV). Los valores promedios fueron (kg MS.d⁻¹) $2,4 \pm 0,4$ para CB y $2,3 \pm 0,4$ para CA. Las vacas de AB consumieron en promedio $2,1 \pm 0,4$ y las de AA $2,5 \pm 0,4$ kg por cada 100 kg de PV ($P < 0,01$).

Al evaluar los diferentes componentes de la dieta se observó que las vacas de AA consumieron más heno que las de AB ($P < 0,01$); sin embargo, se observó una diferencia entre el consumo y la cantidad de pasto ofrecida diariamente. El rechazo (kgMS.anim.d⁻¹) estuvo entre 1,2 y 1,8 para AB y entre 1,8 a 2,6 en AA. No se presentó efecto de la CC sobre el consumo de los diferentes alimentos. El nivel de A PP afectó la cantidad de suplemento ingerido; el menor consumo se observó en el grupo AB. La relación heno: suplemento fue similar entre grupos sin diferencias según los factores evaluados. La incorporación de suplemento no superó el 30% de la dieta total (entre $18,2 \pm 7,8$ y $28,7 \pm 2,7\%$). El consumo de BMN fue muy variable y no se presentaron diferencias entre grupos (Tabla 1). Sin embargo, se observó una tendencia ($P = 0,10$) del nivel de A. Asimismo, se observó una reducción en el consumo de BMN a medida que avanzó la lactancia.

La composición química promedio del heno fue: 8,7% de PC; 3,1% de extracto etéreo; 9,4% de cenizas, 78,8 y 44,0% de FND y FDA (Tabla 2) y 1,76 Mcal.kg⁻¹ de EM. Los valores promedio de calcio y fósforo estuvieron cercanos al nivel referencial para cubrir los requerimientos de estos minerales (0,31 y 0,23%, respectivamente; NRC, 1989). El suplemento presentó 20% de PC y niveles de extracto etéreo cercanos a 11%, considerándose un suplemento energético-proteico que pudo complementar la mediana calidad del pasto. Sin embargo, el aporte de EM calculado *in vitro* no reflejó aportes importantes en el caso del suplemento ($2,38$ Mcal.kg⁻¹) y posiblemente sobrevaloró el aporte de EM del heno.

Respecto al BMN, se observó un aporte proteico importante (Tabla 2), debido al nitrógeno no proteico

Tabla 1. Consumo promedio por alimentos y consumo total según los factores evaluados (kgMS.anim.d⁻¹)

	Heno (kg)	Suplemento alimenticio (kg)	Bloque multinutricional (kg)	Total (kg)
Condición corporal al parto				
Baja	7,79±1,37	2,78±0,88	0,24±0,17	10,83±2,03
Alta	8,42±1,13	2,65±0,93	0,29±0,19	11,33±1,72
Nivel de alimentación postparto				
Bajo	7,44±0,94 ^b	2,29±0,51 ^b	0,29±0,18	9,98±1,15^b
Alto	8,74±1,25 ^a	3,08±1,01 ^a	0,24±0,19	12,06±1,87^a

Letras diferentes entre columnas indican diferencias entre los grupos (P<0,05)

de la urea y la PC de la semilla de algodón. El contenido promedio (%) de cenizas, calcio y fósforo fue 35,8; 4,0 y 2,5, respectivamente. La relación de calcio: fósforo fue de 1,6:1.

Peso vivo (PV) y condición corporal (CC)

Las vacas de CA fueron más pesadas que las de CB (508,3±37,1 vs. 438,3±56,7; P<0,01). El PV no fue afectado por el nivel de A PP (P>0,05). Se presentó una reducción en el peso las primeras semanas PP; sin embargo, esta fue inferior en las vacas de CB que en las de CA (-1,7±3,0 vs. -3,6±2,6; P=0,08). La CC de las vacas durante todo el experimento estuvo entre 2,25 y 2,75. Las vacas de CA presentaron valores superiores a 2,5, en cambio, las de CB siempre mantuvieron su CC en valores inferiores a 2,5 (P<0,01). El coeficiente de correlación de Pearson para las variables PV y CC PP fue de 0,55 (P<0,01).

Producción de leche total (PLT) diaria

La PLT diaria no fue diferente entre los grupos

evaluados. Las medias generales por CC al parto fueron (kg.vaca.d⁻¹) 6,5±2,5 para CB y 5,9±2,2 para CA. Para nivel de A, los promedios fueron 6,3±2,5 y 6,1±2,2 kg.vaca.d⁻¹ para AB y AA, respectivamente. La fracción de leche consumida por el becerro estuvo en promedio en 2,9 kg.becerro.día⁻¹. Por tratamiento, los valores promedios fueron (kg.vaca.d⁻¹): 6,1±1,9 para CAAA; 5,6±2,4 para CAAB; 6,0±2,5 para CBAA y 7,0±2,4 para CBAB.

Balance energético (BE)

El aporte calculado de ENH (Mcal.d⁻¹) fue superior en el grupo de AA (5,9±0,8 para AB y 6,9±0,9 para AA; P<0,01) y no se presentaron diferencias por CC al parto (6,7±0,9 para CA y 6,2±1,1 para CB). Similarmente, tampoco se presentaron diferencias en el aporte de ENSA para el factor CC al P; el grupo AB consumió (Mcal.d⁻¹) 3,0±0,7 y el grupo AA 4,0±1,3 (P<0,01). Iguales resultados se mantienen para EN_{CONSUMIDA};

Tabla 2. Composición química del heno (H), suplemento alimenticio (SA) y el bloque multinutricional (BMN)

Componente (%)	Heno			Suplemento alimenticio		Bloque multinutricional	
	H1	H2	H3	SA1	SA2	BMN 1	BMN 2
Materia seca	93,60	94,40	93,50	94,70	93,50	92,20	91,90
Proteína cruda	8,00	11,10	7,10	20,50	19,70	52,30	47,70
Extracto etéreo	2,90	3,40	3,00	10,90	10,90	4,80	5,50
Fibra cruda	-	-	-	13,80	14,50	-	-
Ceniza	9,20	10,10	9,00	6,50	6,10	33,8	37,70
Calcio	0,40	0,60	0,40	0,30	0,20	4,10	3,90
Fósforo	0,20	0,20	0,20	0,50	0,40	2,60	2,40
Fibra detergente neutro	76,10	79,30	80,90	-	-	-	-
Fibra detergente ácido	41,20	43,70	47,10	-	-	-	-

H1: Heno al inicio del experimento; H2: Heno a la mitad del experimento; H3: Heno al final del experimento; SA1: Suplemento alimenticio al inicio del experimento; SA2: Suplemento alimenticio a la mitad del experimento; BMN1: Bloque multinutricional al inicio del experimento; BMN2: Bloque multinutricional a la mitad del experimento

las vacas del grupo AB consumieron 2,1 Mcal.d⁻¹ menos que las vacas del grupo AA (8,9±1,2 vs. 11,0±1,9; P<0,01), sin que la CC al parto tuviese efecto (P>0,05).

La CC al parto afectó el valor de EN_{REQ-MANTENIMIENTO}. Las vacas de CA requirieron significativamente (P<0,05) más EN (Mcal.d⁻¹) para mantener su PV que las de CB (8,6±0,5 vs. 7,8±0,7). No se presentaron diferencias entre la EN_{REQ-MANTENIMIENTO} debidas al nivel de A. Respecto a la EN_{REQ-LECHE} y EN_{REQ-TOTAL} no se presentaron diferencias entre los grupos. Los valores promedios (Mcal.animal.d⁻¹) de EN_{REQ-LECHE} por CC al parto fueron 4,9±1,9 para CB y 4,3±1,6 para CA (P>0,05) y para nivel de A PP 4,7±1,9 para AB y 4,5±1,7 para AA. Los valores de EN_{REQ-TOTAL} fueron (Mcal.d⁻¹) 12,7±2,0 y 12,9±1,6 para CB y CA, respectivamente, y de 12,9±1,7 para AB y 12,7±1,9 para AA.

En función de EN_{CONSUMIDA} y EN_{REQ-TOTAL}, se calculó el BE semanal, expresado como porcentaje del requerimiento. La CC al parto no afectó el BE (P>0,05); tanto el grupo de CA como el grupo CB estuvieron en BE negativo durante toda la experiencia. En cambio, el nivel de A PP, producto del consumo de alimento y el aporte diferencial de EN entre grupos, sí afectó el BE (P<0,01), con valores promedios (% del requerimiento) de -7,9±19,4 para AA y -27,2±13,1 para AB (P<0,01). Como puede observarse en la Figura 1, a pesar de que el BE fue negativo casi todo el periodo evaluado, el mismo mejoró a medida que transcurrió el PP, pasando de la semana 1 a la 10, de -33 a -5% del requerimiento (-4,8±3,8 a -0,7±2,2 Mcal) y de -35 a +0,3% (-4,7±2,3 a -0,1±1,7 Mcal) en el caso de CB y

CA, respectivamente; y de -44 a -16% (-5,8±2,1 a -2,1±1,5 Mcal) en el grupo AB y de -27 a +7% (-4,1±3,4 a +0,8±1,4 Mcal) en el grupo AA. Por tratamiento, los valores promedios fueron (% del R): -7,6±18,8 para CAAA; -26,2±13,9 para CAAB; -8,5±20,3 para CBAA y -28,3±12, para CBAB.

Consumo de proteína cruda (PC) total

El consumo de proteína (g.anim.d⁻¹) no fue afectado por la CC al parto (P>0,05) (1365,2±249,8 vs. 1406,2±217,0 para CB y CA, respectivamente). Contrariamente, el nivel de A tuvo un efecto significativo (P<0,01) sobre esta variable, con valores promedio (g.anim.d⁻¹) de 1252,8±129,5 para AB y 1505,1±241,4 para AA. Los valores de PC/EN (gPC.Mcal de EN⁻¹) presentados, fueron los siguientes: 139,5±12,1 para CB y 139,9±11,9 para CA (P>0,05) y 141,9±12,9 para AB y 137,7±10,8 para AA (P<0,05).

Concentraciones de glucosa (GLU), colesterol total (COL) y nitrógeno ureico (NU)

La GLU fue afectada por la CC al parto. Las vacas de CA tuvieron una concentración promedio mayor que las de CB (P<0,05), con valores (mg.dL⁻¹) de 61,5±12,7 y de 56,7±12,5, respectivamente; mientras que el nivel de A no afectó los niveles de GLU. El grupo AB presentó valores (mg.dL⁻¹) de 58,8±12,5 y el grupo AA de 59,5±13,1 (P>0,05). En todos los grupos se presentó una reducción de la concentración de GLU PP, la cual, a partir del día 60, se mantuvo o se incrementó levemente (caso de CB y AB) (Figura 2).

El nivel de COL no fue afectado por ninguno de

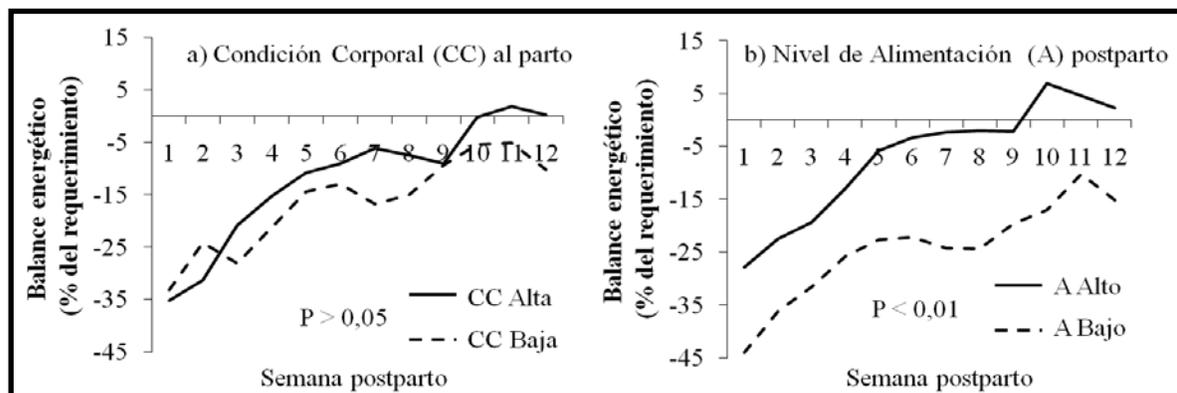


Figura 1. Balance energético promedio en vacas con diferente condición corporal al parto (a) y diferente nivel de alimentación postparto (b)

los factores evaluados. Sin embargo, se observó una tendencia ($P=0,10$), en las vacas con CB, a tener una mayor concentración ($157,6 \pm 54,8 \text{ mg.dL}^{-1}$) en comparación con las vacas de CA ($142,6 \pm 39,3 \text{ mg.dL}^{-1}$). Los valores promedio (mg.dL^{-1}) por nivel de A fueron $151,1 \pm 36,0$ para AB y $148,8 \pm 57,4$ para AA ($P>0,05$). En todos los grupos evaluados, se observó un aumento ($P<0,01$) progresivo en la concentración PP (Figura 3). La concentración de NU (Figura 4) no fue afectada por la CC al parto ($17,1$ para CB y $18,1 \text{ mg.dL}^{-1}$ para CA; $P>0,05$), pero sí por el nivel de A, con valores promedio (mg.dL^{-1}) de $15,9$ para AB y $19,2$ para AA ($P<0,05$).

Expresión hipotalámica de NPY y OX-1R a los 45 d PP

La expresión de NPY fue demostrada mediante la aparición de una banda de peso molecular de aproximadamente 35 kDa (Figura 5). Se pudo observar que la expresión de este mensajero químico fue más o menos similar entre los grupos, observándose sólo una reducción en su expresión en el grupo de animales con más bajas reservas corporales

y que fueron sometidos a un régimen de alimentación bajo (CBAB). En el caso del OX-1R, se identificó una banda proteica de aproximadamente 60 kDa, tal como ha sido evidenciado al usar los anticuerpos GPCR (Laboratorio GPCR Pathways. N°3 Winter 2010/ www.alomone.com). De igual forma, la menor expresión hipotalámica del OX-1R, medido como unidades de densidad óptica, se presentó en las vacas del grupo CBAB (Figura 6).

DISCUSIÓN

Se sabe que, cuando la EN consumida es inferior a la requerida para los procesos fisiológicos y productivos, se presenta una situación conocida como BEN, durante la cual los animales hacen uso de sus reservas corporales, movilizándolas, para intentar suplir sus requerimientos (McDonald *et al.*, 1999). En animales puros especializados en producción de leche, la situación de pérdida de CC en el PP, como medida para mantener el volumen de leche que potencialmente son capaces de producir, es frecuente (Van Knegsel *et al.*, 2007). Tal y como fue descrito por Cronjé (2000)

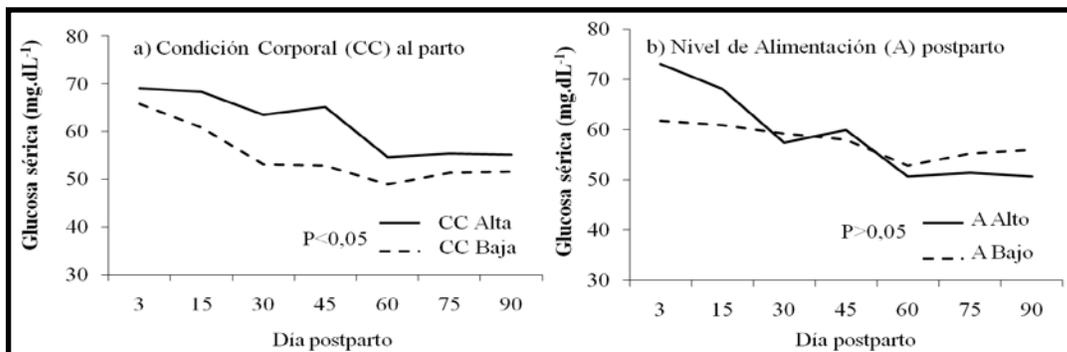


Figura 2. Concentración promedio de glucosa sérica en vacas con diferente condición corporal al parto (a) y diferente nivel de alimentación postparto (b)

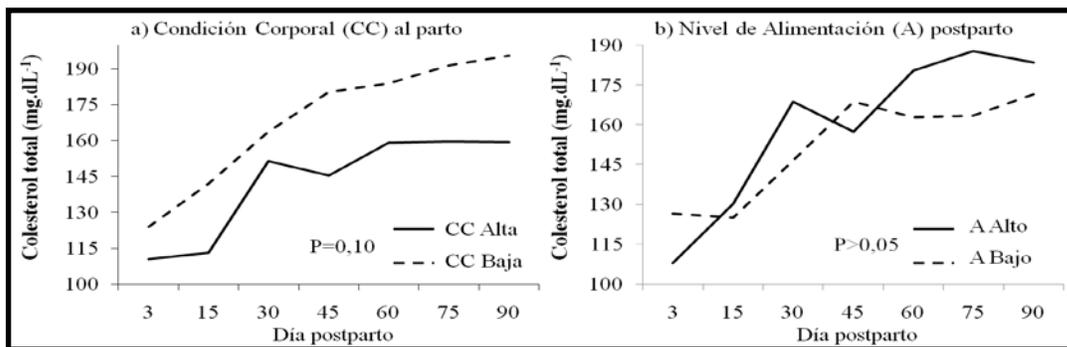


Figura 3. Concentración promedio de colesterol total sérico en vacas con diferente condición corporal al parto (a) y diferente nivel de alimentación postparto (b)

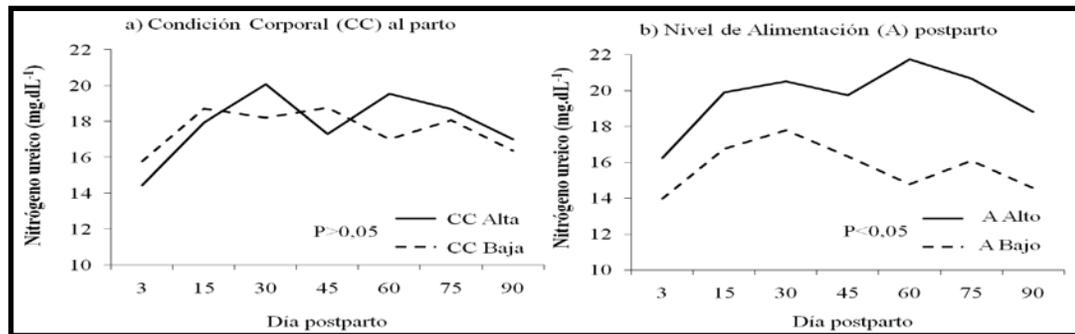


Figura 4. Concentración promedio del nitrógeno ureico en el suero de vacas con diferente condición corporal al parto (a) y diferente nivel de alimentación postparto (b)

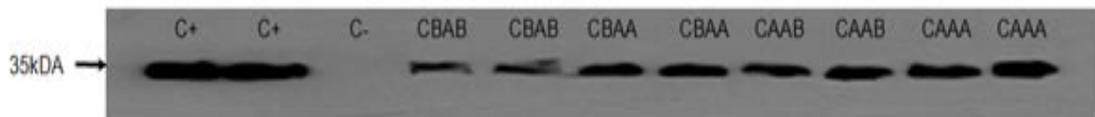


Figura 5. Expresión de NPY en el hipotálamo de vacas a los 45 d PP según los tratamientos. C+: control positivo, C-: control negativo

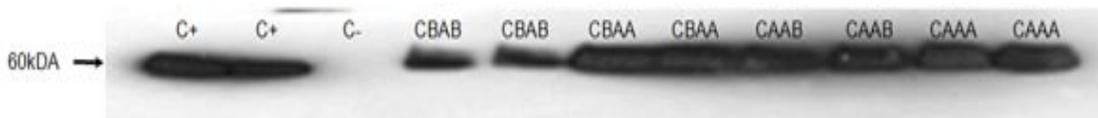


Figura 6. Expresión del OX-1R en el hipotálamo de vacas a los 45 d PP según los tratamientos. C+: control positivo, C-: control negativo

y Friggens *et al.* (2010) estos animales, debido al exhaustivo proceso de selección genética al que han sido sometidos, responden metabólicamente para utilizar los nutrientes disponibles que garanticen la producción de leche. Esta condición impone que otros procesos fisiológicos, principalmente la reproducción, se vean comprometidos (Lucy *et al.*, 1991). En vacas mestizas de doble propósito el mecanismo de utilización de los nutrientes disponibles durante la lactancia posiblemente es diferente al de vacas lecheras de razas puras especializadas, sobre todo, cuando el consumo o calidad de la dieta es limitado. En el caso particular de este experimento, la condición de BEN fue observada en todos los grupos. A pesar de las diferencias presentadas en el consumo de alimento, el aporte de nutrientes pudo haber sido similarmente bajo como para no permitir que se evidenciaran respuestas diferenciales en la PLT. Los animales del grupo de AA, sólo a partir de la semana nueve PP comenzaron a presentar un BE positivo (Figura 1) el cual, más que relacionarse con un incremento en el consumo, se asoció con una reducción en la PLT, situación que redujo el

requerimiento energético para esta función ($EN_{REQ-LECHE}$) y la $EN_{REQ-TOTAL}$.

En situaciones de bajo nivel de producción de leche, como las que se presentaron en esta investigación, pudiera esperarse que la magnitud del BEN no fuera marcada, como sucede en las ganaderías especializadas; sin embargo, la baja calidad de la dieta base (forrajes), impone que surjan condiciones de limitadas reservas energéticas preparto (CB) que, sumadas a las propias limitaciones en el consumo PP, condicionan a los animales mestizos a presentar situaciones energéticas desfavorables con importantes implicaciones productivas y reproductivas (Domínguez, 2005; Nielsen *et al.*, 2010).

Varios factores están implicados en la regulación del consumo de materia seca (CMS). A corto plazo, el control del CMS ha sido atribuido a factores físicos y químicos. El factor físico principal que causa disminución en el consumo es la distensión del retículo-rumen y a nivel químico, principalmente las concentraciones de propionato y GLU a nivel hepático (Allen, 2000). Sin embargo, cuando la dieta se basa en el uso de forrajes tropicales, la

distensión ruminal, debido a los niveles de fibra de los pastos, que generan tiempos de rumia más prolongados, es catalogada como la principal, causa de reducción en el CMS (Allen, 2000). Esto explica parte de los bajos niveles productivos presentados en el trópico bajo (Ventura, 2000). En tal sentido, destaca el reducido aporte de EN y PC y los altos tenores de FDN y FDA del heno utilizado en esta experiencia, el cual fue medianamente compensado por la naturaleza energético-proteica del suplemento. Sin embargo, el menor consumo de heno, en función del esperado, y el consumo total del suplemento ofertado, causó un desbalance de la relación PC: EN, según lo señalado por la NRC (1989), al que también contribuyó el consumo de BMN. Los valores de EN_{TOTAL} obtenidos se asemejan a los estimados por Rico y Mendoza (2008) para pastos de baja calidad sin suplementación ($8,06 \text{ Mcal.día}^{-1}$) o para pastos de baja calidad con suplementación de 2 kg de concentrado ($10,71 \text{ Mcal.día}^{-1}$). Bajo esta condición, pareciera que el metabolismo de las vacas priorizó el uso de la EN disponible para mantener su CC y PV, debido a que la movilización de reservas corporales, medida a través de los cambios en la CC en el tiempo, fue muy baja o nula. Domínguez (2005) y Maza et al. (2006) reportan que hay poca variabilidad en la CC PP en los animales mestizos (Holstein x cebú). Pese a la poca variabilidad, las vacas que llegan al parto con una mayor CC pierden más peso, y por un periodo más largo, que las vacas que lo hacen con CC de media a baja (Maza et al., 2006), situación que se evidenció en esta experiencia. Los animales mestizos eficientemente movilizan los nutrientes disponibles para garantizar una pequeña PLT, mantener sus reservas corporales e incluso, garantizar la capacidad reproductiva en comparación con los animales especializados (Cronjé, 2000).

La CC al parto, producto del estatus metabólico preparto, impactó la capacidad metabólica de los animales. Se observó que la CC afectó la concentración de GLU y COL, observándose una reducción de la concentración de GLU durante los primeros 60 d PP; sin embargo, a partir del día 60 se mantiene o tiende a incrementarse levemente (caso de CB y AB, Figura 2). Disminuciones en las concentraciones de GLU luego del parto, independientemente de las dietas suministradas a los animales, han sido reportadas (Ingvarsen y Andersen, 2000) y se relacionan con la demanda de GLU de la glándula

mamaria. A pesar de la mayor concentración de este metabolito en las vacas de CA, la producción lechera de éstas no fue diferente entre grupos. En general, los valores de GLU se encontraron dentro del rango normal reportados para bovinos mestizos (Razz y Clavero, 2004).

En relación al COL, en todos los grupos evaluados se observó un aumento ($P < 0,01$) a medida que transcurrió el período PP, lo cual concuerda con los resultados encontrados por Galvis et al. (2007) quienes lo asocian con la reducción en la PLT debido al avance de la lactancia, tal como se observó en este estudio, y/o con una normalización del metabolismo energético de las vacas. Hamman y Matthaei (1996) encontraron una relación directa entre las concentraciones plasmáticas de leptina y de COL. La producción de leptina aumenta a medida que se incrementa el contenido del tejido adiposo del cuerpo y/o el suministro de nutrientes, situación que también conlleva un incremento en las concentraciones de COL. Ceballos et al. (2002) reportaron relaciones inversas entre la concentración de ácidos grasos no esterificados y el COL. Los valores crecientes de COL encontrados en el presente experimento constituyen una evidencia metabólica de la poca movilización PP de las reservas energéticas y de la mejora en el BE.

Por otra parte, la concentración de NU reflejó el exceso de PC en la dieta de los animales (Hammond, 1997). Esto afectó el BE debido a que los animales tuvieron que incrementar el gasto energético para la eliminación del exceso de amonio (McDonald et al., 1999). Se observó una reducción en el consumo del BMN a medida que avanzó la lactancia y una tendencia de los animales de AB a consumir mayor cantidad de BMN que los de AA. Estos resultados pudieran estar indicando la existencia de mecanismos de compensación, por el menor CMS del grupo AB, o de autobalance de nutrientes para mejorar el ambiente ruminal y evitar el incremento de nitrógeno amoniacal, tanto en rumen como en sangre, tal como sugieren Birbe et al. (2006).

La situación anterior se reflejó en la respuesta central medida a través de la expresión de mediadores químicos o sus receptores tal como el NPY y el OX-1R. Diversos estudios en roedores (Maffei et al., 1995), humanos (Considine et al., 1997) y rumiantes (Block et al., 2003), demuestran que la administración intracerebroventricular de NPY

y/o OX estimula el consumo de alimentos. La hipótesis general es que los animales restringidos nutricionalmente o en BEN, como parte del mecanismo homeostático compensatorio, incrementan los niveles de estos neurotransmisores en respuesta a las variaciones metabólicas (baja concentración de insulina y leptina, altos niveles de hormona de crecimiento y ácidos grasos no esterificados, entre otros), a los fines de estimular el centro del apetito y aumentar el consumo de alimentos. A los 45 d PP, tanto la expresión del NPY como la del receptor de OXA en los grupos CBAA, CAAA y CAAB fue similar. Cuando el CMS es expresado como valor porcentual del PV, la CC muestra una tendencia a afectar el consumo, en tal sentido, las vacas con CB tienden a consumir proporcionalmente mayor cantidad de alimento que las de CA. Probablemente, las vacas CBAA, con concentraciones de leptina en sangre inferiores a las de CA, liberan mayores concentraciones de NPY y por lo tanto, consumen proporcionalmente más alimento que las de CA, tal como se presentó en el caso del consumo expresado por kg MS.100 kgPV¹.

Estudios recientes señalan que la OXA y el OX-1R regulan el comportamiento asociado a la alimentación y la respuesta estimuladora en el reforzamiento del consumo en ratones. De esta forma, ratones que fueron manipulados con fármacos (administración de SB-334867; antagonista de OX-1R) o genéticamente modificados (*knockout* para el gen prepro-orexina) fueron menos activos en conductas de olfateo y búsqueda de alimento y presentaron una menor respuesta motivacional a la recompensa alimenticia para reforzar la conducta de búsqueda de alimentos (Sharf *et al.*, 2010). Estas respuestas posiblemente puedan asociarse a un bloqueo central inducido por la falta de OXA y/o OX-1R que genera una señal inducida de saciedad. En este experimento se evidenció una reducción en la expresión del OX-1R en las vacas CBAB que podría asociarse a una disminución en la respuesta central en el consumo de materia seca debida a la duración de la restricción nutricional (CB) o bien, a la dificultad en la síntesis del precursor prepro-OX, causado por la restricción alimenticia (AB), el cual también reduce la sensibilidad del SNC para modular la adaptación a la situación de estrés nutricional (Sharf *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

Podría decirse que los animales mestizos coordinan la utilización de los nutrientes disponibles para garantizar una mediana producción de leche, la cual no fue diferente entre los grupos evaluados y, para mantener sus reservas corporales durante el postparto, observándose a los 45 d PP, que todos los animales se encontraron en BEN. Se observó que la concentración de GLU fue afectada por la CC al parto, siendo superior en las vacas de CA y, que el nivel de A PP impactó la concentración de NU, reflejando el exceso de proteína cruda o el desbalance PC/EN en la dieta. La concentración de COL evidenció la poca movilización de reservas energéticas de las vacas. La situación de BEN se reflejó en la respuesta a nivel del sistema nervioso central medida por la expresión de NPY y OX-1R. Particularmente, en el caso de OX-1R, la menor expresión en CBAB podría relacionarse con una pobre estimulación al consumo debido a la duración de la restricción nutricional que provocaría una reducción de la sensibilidad del sistema nervioso central para modular la adaptación al estrés nutricional. En general, la CC al parto es el componente del estatus energético y/o nutricional más importante a ser considerado en los sistemas de producción con vacunos lecheros y doble propósito, sobre todo, en condiciones donde la dieta basal, por deficiencias energético-proteicas y altos niveles de FDN, no permite elevados consumos y/o aportes de energía.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por financiar esta investigación, a través del Proyecto G-2005000446.

REFERENCIAS

- Allen, M. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 83:1598-1624.
- AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15th Ed. Vol II. Washington, DC. USA.
- Birbe, B.; Herrera, P.; Colmenares, O.; Martínez, N. 2006. El consumo como variable en el uso de los

- bloques multinutricionales. En: *X Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal*. R. Tejos. (ed.). Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela, pp.43-61.
- Block, S.S.; Rhoads, R.P.; Bauman, D.E.; Ehrhardt, R.A.; McGuire, M.A.; Crooker, B.A.; Grünari, J.M.; Mackle, T.R.; Weber, W.J.; Van Amburgh, M.E.; Boisclair, Y.R. 2003. Demonstration of a role for insulin in the regulation of leptin in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86:3508-3515.
- Ceballos, A.; Gómez, P.M.; Vélez, M.L.; Villa, N.A.; López, L.F. 2002. Variación de los indicadores bioquímicos del balance de energía según el estado productivo de los bovinos lecheros de Manizales, Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 15:13-25.
- Chelikani, P.K.; Ambrose, J.D.; Keisler, D.H.; Kennelly, J.J. 2004. Effect of short-term fasting on plasma concentrations of leptin and other hormones and metabolites in dairy cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 26:33-48.
- Combellas, J. 1998. Alimentación de la vaca de doble propósito y de sus crías. Fundación Inlaca. 196 p.
- Considine, R.V.; Nyce, M.R.; Kolaczynski, S.W.; Zhang, P.L.; Ohannesian, J.P.; Moore, J.H. Jr.; Fox, J.W.; Caro, J.F. 1997. Dexamethasone stimulates leptin release from human adipocytes: unexpected inhibition by insulin. *J. Cell Biochem.*, 65:254-258.
- Cronjé, P. 2000. Nutrient-gene interaction: future potential and application. En: *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction*. Ed. Cronjé, P.; CAB International, Wallingford, UK, pp. 409-422.
- Domínguez, C. 2005. Caracterización de fincas y efectos de la suplementación sobre las variables reproductivas en vacas de doble propósito en el estado Guárico. Tesis Doctor en Ciencias Agrícolas. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 296 p.
- Edmonson, A. J.; Lean, I.J.; Weaver, L.D.; Fancer, T.; Webster, G. 1989. A body condition score chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 42:68-78.
- Fattet, I.M.; Jaurena, G. 1988. El Estado Corporal de las Vacas Lecheras. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 8 p.
- Fick, K.; McDowell, L.; Miles, P.; Wilkinson, N.; Conrad, J.; Valdivia, R. 1979. Análisis por espectrofotometría de absorción atómica. Métodos de Análisis de Minerales para Tejidos de Plantas y Animales. 2nd Ed., Latin American Mineral Research Program, Florida, 701-702.
- Friggens, N.C.; Disenhaus, C.; Petit, H.V. 2010. Nutritional sub-fertility in the dairy cow: towards improved reproductive management through a better biological understanding. *Animal*, 7:1197-1213.
- Galvis, R.D.; Agudelo, D.; Saffon, A. 2007. Condición corporal, perfil de lipoproteínas y actividad ovárica en vacas Holstein en lactancia temprana. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 20:16-29.
- Goering, H.; Van Soest, P. 1970. Forage fibers analysis. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture. 30 p.
- Hamman, A.; Matthaei, S. 1996. Regulation of energy balance by leptin. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 104:293-300.
- Hammond, A.C. 1997. Update on BUN and MUN as a guide for protein supplementation in cattle. 8th Ann. Florida Ruminant Nutrition Symposium. Proceedings. Gainesville, FL.
- Harris, W.; Popat, P. 1954. Determination of phosphorus content of lipids. *Am. Oil Chem. Soc. J.*, 31-124.
- Henry, R.J.; Cannon, D.S.; Winkelman, J. 1974. Clinical Chemistry, Principles and Techniques. Harper and Row, Nueva York, EEUU. 1059 p.
- Holdridge, L. 1979. Ecología basada en zonas de vida. IICA, San José, Costa Rica, 12 p.
- Ingværsten, K.L.; Andersen, J.B. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.*, 83:1573-1597.
- Lucy, M.C.; Staples, C.R.; Michel, F.M.; Thatcher, W.W. 1991. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 74:473-482.
- Maffei, M.; Halaas, J.; Ravussin, E.; Pratley, R.; Lee, G.; Zhang, Y.; Fei, H.; Kim, S.; Lallone, R.; Ranganathan, S. 1995. Leptin levels in human and rodent: measurements of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med.*, 1:1155-1161.
- Maza, L.; Vergara, O.; Álvarez, J. 2006. Condición corporal preparto y producción de leche sobre peso y condición corporal posparto de vacas mestizas. *Rev. MVZ Córdoba*, 11:751-758.
- McDonald, P.; Edwards, R.A.; Greenhalgh, J.F.D.; Morgan, C.A. 1999. Nutrición Animal. 5ta. Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 576 p.
- Mertens, D.R. 1983. Using neutral detergent fiber to formulate dairy rations and estimate the net energy content of forages. *Animal and Dairy Science*. Athens: Dept. University of Georgia, *Proc. Cornell Nutr. Conf.*, 305 p.
- Nielsen, N.I.; Hameleers, A.; Young, F.J.; Larsen, T.; Friggens, N.C. 2010. Energy intake in late gestation affects blood metabolites in early lactation independently of milk production in dairy cows. *Animal*, 1:52-60.

- NRC. 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 6ta. Ed. Revisada. National Academy Press. Washington, D.C. EEUU.
- Pinto-Santini, L. 2009. Efecto de la condición corporal al parto y el nivel de alimentación postparto sobre algunos indicadores metabólicos relacionados con la utilización de nutrientes y el reinicio de la actividad ovárica en vacas mestizas. Trabajo de Ascenso. Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. 120 p.
- Razz, R.; Clavero, T. 2004. Niveles de urea, fósforo, glucosa e insulina de vacas en ordeño suplementadas con concentrado en un sistema de *Panicum maximum* y *Leucaena leucocephala*. *Rev. Cientif. FCV-LUZ*, 14:365-369.
- Rico, E.R.; Mendoza, M. 2008. Suplementación energética y proteica de bovinos doble propósito a pastoreo. En: *XII Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal*. R. Tejos (ed.). Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, Instituto Universitario de Tecnología de Ejido, Mérida, Universidad de los Andes, Instituto de Investigaciones Agrícolas. Mérida, Venezuela, pp. 58-72.
- Rivas, J.H.; Rossini, M.; Salvador, A. 2006. Indicadores clínicos como respuesta a la suplementación parenteral en vacas Brahman primíparas durante la pretemporada de monta. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV*, 47:113-120.
- Ruiz, A.Z.; 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. Cientif. FCV-LUZ*, 18:148-153.
- Sakurai, T.A.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R.M.; Tanaka, H.; Williams, S.C.; Richardson, J.A.; Kozlowski, G.P.; Wilson, S.; Arch, J.R.; Buckingham, R.E.; Haynes, A.C.; Carr, S.A.; Annan, R.S.; McNulty, D.E.; Liu, W.S.; Terrett, J.A.; Elshourbagy, N.A.; Bergsma D.J.; Yanagisawa, M. 1998. Orexins and orexine receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92: 573-585.
- Sharf, R.; Sarhan, M.; Brayton, C.; Guarnieri, D.; Taylor, J.; DiLeone, R. 2010. Orexin signaling via the orexin 1 receptor mediates operant responding for food reinforcement. *Biol. Psychiatry*, 67:753-760.
- Tabacco, A.; Meiattini, F.; Moda, E.; Tarli, P. 1979. Simplified enzymic/ colorimetric serum urea nitrogen determination. *Clin. Chem.*, 25:336-337.
- Van Knegsel, A.T.M.; Van den Brand, H.; Dijkstra J.; Kemp, B. 2007. Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation. *Theriogenology*, 68: 274-280.
- Ventura, M. 2000. Potencial de los forrajes tropicales para la producción de carne y leche. En: *VI Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal*. R. Tejos, C. Zambrano, L. Mancilla, W. García (eds.). Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora. Barinas, Venezuela, pp. 111-124.