

**EFFECTO 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**

**Effect of Body Condition at Calving and Feeding Level on Uterine Involution, Ovarian Activity, Pregnancy and the Hypothalamic and Ovarian Expression of Leptin Receptors in Dual Purpose Cows**

Carlos Domínguez<sup>\*1</sup>, Ana Z. Ruiz<sup>\*\*</sup>, Rafael Pérez<sup>\*</sup>, Nelson Martínez<sup>\*\*\*</sup>, Karin Drescher<sup>\*\*\*</sup>, Livia Pinto<sup>\*\*\*</sup> y Richard Araneda<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Universidad Experimental Rómulo Gallegos, IDESSA, Área Universitaria El Castrero. San Juan de los Morros 2103, estado Guárico. <sup>\*\*</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. <sup>\*\*\*</sup>Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay 2101, estado Aragua. Apartado Postal 4563, Venezuela.

**Correo-E:cdomig@cantv.net**

Recibido: 05/12/07 - Aprobado: 08/04/08

RESUMEN

A objeto de evaluar el efecto de la condición corporal al parto (CCAP) y del nivel de alimentación (NA) sobre la involución uterina (IU), actividad ovárica (AO), preñez (PR) y expresión de los receptores de leptina (EXPLEP) a nivel hipotalámico y ovárico en vacas postparto, se emplearon 27 vacas mestizas (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Los animales fueron asignados al azar, con arreglo factorial 2x2, a uno de cuatro tratamientos (T). T1: CCAP baja (<2,5) + NA bajo (BCBA) (n=6); T2: CCAP baja (<2,5) + NA alto (BCAA) (n=7); T3: alta CCAP (>2,5) + bajo NA (ACBA) (n=7) y el T4: CCAP alta (>2,5) + NA alto (ACAA) (n=7). La dieta basal fue de heno de *Cynodon nlemfluensis* (8% proteína cruda; PC) y un suplemento (23%; PC), a una relación 70:30. Para evaluar IU se consideró: la característica de la secreción uterina (CSU), simetría de los cuernos uterinos (SCU), diámetro cervical (DC) y posición del útero (PU). La evaluación reproductiva se realizó semanalmente

ABSTRACT

To evaluate the effect of body condition at calving (BCAC) and different feeding levels (FL) on uterine involution (UI), ovarian activity (OA), pregnancy (PR), and hypothalamic and ovarian leptin receptor expression (LEPEXP) in postpartum cows, twenty seven crossbred cows (*Bos taurus* x *Bos indicus*) were randomly assigned in a 2 x 2 factorial design into four treatments (T): T1, low body condition (LBC; < 2.5) + low FL (LBCLFL; n = 6); T2, LBC (< 2.5) + high FL (LBCHFL; n = 7); T3, high BC (> 2.5) + low FL (HBCLFL; n = 7) and; T4, high BC (>2.5) + high FL (HBCHFL; N = 7). Basal diet was made of hay from *Cynodon nlemfluensis* (11% crude protein, CP) plus supplement (23% CP) at a 70:30 ratio. To assess uterine involution (UI), the following was considered: characteristic of uterine secretion (CUS), uterine horn symmetry (UHS), cervix diameter (CD), and uterine position (UP). Weekly, from 15 to 45 days postpartum (DPP), the reproductive tract was

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

desde los 15 hasta los 45 días postparto (DPP), por palpación transrectal, ultrasonografía y progesterona ( $P_4$ ) en plasma. La AO fue evaluada a través de foliculos ováricos (F), clasificados en clases: C1 ( $\leq 5$  mm), C2 (6-9 mm) y C3 ( $\geq 10$  mm) y la presencia de cuerpos lúteos (CL). La PR fue comprobada a través de la palpación rectal, ultrasonido y  $P_4$ . Cambios metabólicos energéticos fueron medidos, a través del colesterol total (COL) y fructosamina (FRTS) a los 3, 15, 30 y 45 DPP. La expresión hipotalámica y ovárica de los receptores de leptina (EXLEP) fue evaluada mediante la técnica de *Western blot*, empleando tejidos de 8 vacas sacrificadas a los 45 DPP. Los datos fueron analizados a través de un análisis de regresión multivariado múltiple, ANAVAR para medidas repetidas en el tiempo, una regresión múltiple de Cox y una prueba de Kruskal y Wallis. Los resultados muestran correlación ( $P < 0,05$ ) entre T y C3 y entre C3 y CSU a los 22 al 30 DDP. Se obtuvo una correlación entre CL y CSU en el 37 DDP. C1 no estuvo asociado a T ni a IU. Hubo correlación significativa ( $P < 0,01$ ) entre las diferentes variables de IU (CSU, DC, SCU y PU). El análisis de regresión multivariado múltiple detectó efecto significativo ( $P < 0,05$ ) de T y DC sobre AO. La condición corporal postparto (CCPP) afectó AO ( $P < 0,01$ ). Cox para CL dependió ( $P < 0,01$ ) de CSU y SCU. El efecto de T sobre  $P_4$  acumulada fue significativa ( $P < 0,01$ ) y CCAP tuvo efecto significativo sobre  $P_4$  ( $P < 0,05$ ) desde el 30 DPP. FRTS fue diferente entre T ( $P < 0,05$ ) pero no entre períodos de muestreo. EXLEP para receptores hipotalámicos fue mayor para vacas con alta CCAP, independientemente del NA. PR fue diferente entre T ( $P < 0,01$ ). Valores de PR hasta los 120 DPP fueron: T3: 75%; T4: 60% vs. T2: 0% y T1: 20%. Se concluye que T afectó la IU (CSU, SCU) y la AO (clases foliculares y CL). Se evidenció un efecto de CCAP sobre la expresión de los receptores de leptina en el hipotálamo como uno de los mediadores en la regulación de la actividad ovárica. En consecuencia de lo anterior, hubo una mayor tasa de preñez antes de los 120 DPP, en los tratamientos con mejor CCAP.

**(Palabras clave:** Ganado, razas mixtas, condición corporal, parto, dieta, ciclo estral, ganancia de peso, leptina, Aragua)

evaluated by transrectal palpation, ultrasonography, and RIA of plasma progesterone ( $P_4$ ). The OA was assessed through the ovarian follicles (OF), which were classified as : C1 ( $\leq 5$  mm), C2 (6-9 mm), C3 ( $\geq 10$  mm); and the presence of corpora lutea (CL). The PR was verified by rectal palpation, ultrasound, and  $P_4$ . Metabolic changes were measured as total cholesterol (TC) and fructosamine (FRTS) at 3, 15, and 45 DPP. The hypothalamic and ovarian LEPEXP were determined by Western blot from tissue samples of 8 cows slaughtered at 45 DPP. Data were statistically analyzed by multivariate multiple regressions, ANOVA for repeated measurements on time, Cox's multiple regression and a Kruskal and Wallis test. Results show a correlation between T and C3 and between C3 and CUS at 22 and 30 DPP. Also, a correlation was detected between CL and CUS at 37 DPP. No association between C1 and T or C1 and UI was found. The multivariate multiple regressions detected a significant effect ( $P < 0.05$ ) of T and CD on OA. The BCAC influenced OA ( $P < 0.01$ ). Cox value for CL depended on CUS and UHS ( $P < 0.01$ ). The effect of T and BCAC over accumulated  $P_4$  was significant ( $P < 0.05$ ) and BCAC had an effect on  $P_4$  from 30 DPP. FRTS was different among T ( $P < 0.05$ ), but were not among sample times. The LEPEXP for hypothalamus was higher for cows with high BCAC, independently from FL. The PR was different among T ( $P < 0.01$ ). Values for PR at 120 DPP were: T3: 75% and T4: 60% vs T2: 0% and T1: 20%. In summary, T, BCAC, CUS and UHS exerted a positive effect on OA. The LEPEXP at the hypothalamus levels corroborated the response of BCAC on OA. Consequently, there was a high pregnancy rate before 120 DPP in T with better BCAC.

**(Key words:** Livestock, multipurpose breeds, body condition, parturition, diet, oestrous cycle, weight gain, leptin, Aragua)

## INTRODUCCIÓN

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 a 35,8 días (Lindell *et al.*, 1982; Guilbault *et al.*, 1987). A través del monitoreo con ultrasonido se han observado rangos entre 23 a 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 retarda en aquellas que han presentado distocia, retención de placenta, enfermedades metabólicas durante el periparto o desbalances nutricionales. Los desórdenes metabólicos durante el periodo postparto se asocian con diferentes patologías como son: distocias, prolapsos del útero, retención de placenta, metritis, quistes ováricos y retraso en el reinicio de la actividad ovárica postparto o de la involución uterina (Erb *et al.*, 1985; Opsomer *et al.*, 2000; Mateus *et al.*, 2002). Un retraso en la involución uterina implica retraso en los procesos que ocurren durante el crecimiento folicular, suspendiéndose éste momentáneamente después del parto. Lo que acarrea un impacto económico negativo por los altos costos de los tratamientos, aumento de los días vacíos y pérdida en la producción de leche, entre otros (Esslemont y Peeler, 1993). Por otro lado, en animales con deficiente CC o balance energético negativo, los niveles de leptina circulantes en sangre disminuyen y producen un efecto estimulador de la secreción del neuropéptido Y (NPY) y de la pro-opiomelanocortina (Iain y Henry, 1999). Estos dos mensajeros químicos afectan negativamente las neuronas hipotalámicas que secretan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y, en consecuencia, disminuyen la secreción de la hormona luteinizante (LH). El juego hormonal anteriormente mencionado, afecta el desarrollo de los folículos en

el estadio preantral, los cuales no crecen y terminan en atresia (Bach, 2001).

La leptina actúa sobre un número de neuropéptidos y receptores en el hipotálamo para regular el apetito y el balance de energía en roedores, humanos y en grandes animales (Barb y Kraeling, 2004), a través de un sistema que incluye al: NPY, CART y melanocortina. Poco se conoce sobre el eje leptina-hipotalámico en rumiantes en lactación. Se ha reportado una marcada diferencia en la fisiología nutricional y el mayor grado de balance energético negativo en rumiantes, comparado con roedores de laboratorio (Sorensen *et al.*, 2002). Se ha detectado la expresión del gen del receptor de leptina (Ob-R) en los núcleos hipotalámicos ventromedial y arcuado, en ovejas lactantes; la cual fue mayor en este grupo al compararlo con animales no lactantes (Sorensen *et al.*, 2002). Lo anterior sugiere que el hipotálamo se hace más sensible a la leptina durante la lactación porque el estado metabólico es el principal factor que determina la respuesta a la leptina en rumiantes (Barb y Kraeling, 2004). En concordancia con lo anterior, Liefers *et al.* (2005) reportaron que después del parto hubo una mayor expresión del Ob-R a nivel hipotalámico, lo cual resulta en una alta sensibilidad a la leptina. Sumado a esto, en rumiantes prepúberes, la restricción alimenticia de corta duración redujo la expresión del gen de leptina en tejido adiposo, pero incrementó la expresión hipotalámica de Ob-R (Barb y Kraeling, 2004). Liefers *et al.* (2005) asociaron los resultados anteriores con la disminución de insulina sérica, IGF-I y frecuencia del pulso de LH.

Una herramienta útil en el diagnóstico presuntivo de la posible respuesta productiva y reproductiva en vacas, pudiese ser el uso del perfil metabólico (Wittwer, 2000). Se vienen utilizando diferentes grupos de parámetros sanguíneos para monitorear el estado metabólico del animal (Payne, 1989). Quintela *et al.* (2003) correlacionaron las concentraciones sanguíneas de la glucosa y del colesterol total (COL), durante el periodo postparto y la involución del útero, encontrando una clara asociación, principalmente, entre las concentraciones séricas de colesterol total, durante las primeras semanas del postparto, con el transcurso de la involución uterina. La fructosamina, (FRTS) se ha incorporado como metabolito importante para conocer el balance energético (Ceballos *et al.*, 2002).

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio

fue evaluar el efecto de la CCAP y el nivel de alimentación sobre la involución uterina, actividad ovárica, preñez y expresión del Ob-R en hipotálamo y ovario en vacas doble propósito.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Localización**

La experiencia se llevó a cabo en el Laboratorio Sección de Bovinos, perteneciente al Instituto de Producción Animal de la Facultad de Agronomía (FAGRO, UCV), ubicado en Maracay, estado Aragua, situado aproximadamente a 432 m.s.n.m. La precipitación anual en la zona es de aproximadamente 800 mm y la temperatura promedio de 27 °C.

### **Manejo general y alimentación de las vacas**

Las vacas fueron alojadas en puestos individuales (18 m largo x 2 m de ancho; 9 m techados y con piso de cemento y 9 m de tierra), acondicionados con un comedero para colocar el alimento a ofrecer y un bebedero automático donde se ofreció agua a voluntad. La alimentación se basó en el suministro de alimento concentrado (AC), bloque multinutricional (BMN) y pacas de heno de pasto estrella (*Cynodon nlemfluensis*). El AC estaba compuesto por: semilla de algodón (30%), pulitura de arroz (10%), melaza (20%), harina de maíz (36,5%), úrea (3%) y sal común (0,5%). Así mismo, el BMN: estuvo compuesto por semilla de algodón (10%), melaza (20%), úrea (15%), cal (10%), mezcla minerales (15%), fosfato monodivalente (3%), heno molido (5%) y planta entera de frijol (25%).

El aporte calculado de la energía metabolizable (Kcal EM/kg) del AC y BMN fue de 3,2 y 0,86, respectivamente. En el caso de la proteína cruda (PC) y proteína degradable en el rumen (RDP), los aportes fueron de 23,1 y 19,3%, respectivamente para el AC; para el BMN, la PC fue 50,9% y la RDP fue 47,9%. El pasto aportó 2,01 Kcal EM/kg, 8% de PC y 4,68% de RDP.

### **Tratamientos y diseño del experimento**

Veintisiete vacas fueron asignadas al azar y balanceadas de acuerdo a la fecha de parto y nivel de producción de leche de la lactancia anterior. Los tratamientos (T) quedaron conformados de la siguiente manera: T1: CCAP baja (<2,5) + NA bajo (BCBA) (n=6); T2: CCAP baja (<2,5)

+ NA alto (BCAA) (n=7); T3: CCAP alta (>2,5) + NA bajo (ACBA) (n=7) y el T4: CCAP alta (>2,5) + NA alto (ACAA) (n=7). La aplicación de los tratamientos se inició a los cuatro días postparto. La CCAP fue determinada según la escala del 1 al 5 de NIRD (*National Institute of Research in Dairying*) modificado por Fattet y Jaurena (1988). Las vacas de CCAP alta tuvieron valores de CC  $\geq$  2,5 y, las vacas de CCAP baja, valores inferiores a 2,5. El NA alto fue asignado según el aporte de energía de las dietas experimentales. Los requerimientos de las vacas fueron determinados en función del peso corporal y la producción de leche, de acuerdo a las Tablas de *National Research Council* (NRC, 1984). 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 MODR) entre 25-30, con el propósito de evitar efectos confundidos debido a la variación entre T por dicha causa.

### **Evaluación de la involución uterina**

Se evaluó el proceso de involución uterina en las vacas desde el 15 hasta el 45 DPP, mediante la determinación de la posición del útero con relación a la pelvis (PU), la cual tomó los siguientes valores: 1 = totalmente sobre la pelvis, 2 = desplazado por delante del borde anterior de la pelvis y 3 = desplazado craneo-ventralmente al borde anterior de la pelvis. La simetría de los cuernos uterinos (SCU), izquierdo y derecho, se clasificó de la manera siguiente: 1 = 50-50, 2 = 60-40, 3 = 80-20. Para el diámetro del cervix (DC) los valores asignados fueron: 1 =  $\leq$  5 cm; 2 = 5 a 7,5 cm; 3 = >7,5 cm (metodología modificada de LeBlanc *et al.*, 2002). Además, se evaluaron las características de las secreciones uterinas (CSU), considerando la siguiente escala de valores: 0 = moco claro y translúcido; 1 = claros con flecos blancos; 2 = exudado blanco y mucopurulento y; 3 = exudado purulento blanco-amarillento, pero ocasionalmente sanguinolento (LeBlanc *et al.*, 2002; Sheldon y Dobson, 2004).

### **Evaluación de la actividad ovárica**

La evaluación de la actividad ovárica (AO) se

llevó a cabo a través de palpación rectal y el uso del ultrasonido vía transrectal (*Aloka SSD 900 Co. Ltd., Tokyo, Japan*), usando una sonda lineal de 7,5 MHz, desde el día 15 al 45 posparto (DPP). Dicha evaluación se realizó una vez por semana antes de la detección del primer celo y dos veces por semana a partir del mismo. Esto permitió clasificar el crecimiento folicular (Díaz *et al.*, 1998), en: folículos clase 1 ( $\leq 5$  mm); clase 2 (6-9 mm) y clase 3 ( $\geq 10$  mm); después, se confirmó la presencia de cuerpos lúteos en vacas sometidas a los diferentes tratamientos.

#### **Determinación de Progesterona ( $P_4$ )**

La  $P_4$  fue determinada por RIA (DSL, Diagnostic System Lab, INC) en muestras de plasma con heparina sódica al 1%. La cuantificación se hizo una vez por semana desde el 15 hasta el 45 DPP, usando para esto un *kit* comercial de fase sólida. Este *kit* ha sido validado por DSL (*Lastest animal cross reactivity update*, 2006). Los niveles de  $P_4$  para considerar el reinicio de AO fueron aquellas concentraciones  $>0,5$  ng/mL en dos muestras consecutivas, o cuando la muestra fue  $>1$  ng/mL (Meikle *et al.*, 2003). Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron 6,78% y 12,02%, respectivamente, los cuales se incorporaron como controles de calidad internos.

#### **Evaluación de metabolitos sanguíneos**

Las muestras de sangre para la determinación de COL y FRTS fueron tomadas a nivel de la vena yugular cada 15 días a partir del 3 hasta el 45 DPP almacenándose a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis. Las determinaciones séricas de los metabolitos sanguíneos de COL y FRTS se realizaron a través de la metodología descrita por Rivas *et al.* (2006). Las determinaciones de colesterol se hicieron utilizando un equipo STAT FAX, modelo 1904 (USA- A.T. Inc.) utilizando el método enzimático CHOP-PAP 500, el cual detecta y cuantifica, a través del sistema Trinder los residuos de agua oxigenada, producto de la hidrolización de los ésteres de colesterol por la enzima colesterol esterasa. La FRTS se determinó a través del método colorimétrico, usando el cloruro de tetrazolium nitroazul (Rivas *et al.*, 2006).

#### **Toma de muestras de tejido en el matadero**

Ocho (8) animales correspondientes a dos

animales por tratamiento fueron sacrificados a los 45 DPP. Inmediatamente después del sacrificio, se procedió a la toma de muestras de tejido hipotalámico y ovárico. Las muestras fueron inmediatamente conservadas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta ser procesadas.

#### **Expresión del Ob-R (EXLEP) en el hipotálamo y ovario mediante la técnica de Western Blot**

Se prepararon dos minigeles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (5-10% p/v) del tipo discontinuo (SDS-PAGE). En estos geles, se descargaron 200  $\mu\text{g}$  de proteínas (cuantificadas mediante *kit* de BCA, Pierce, Rockford, IL, EUA). En uno de los geles se descargó tejido hipotalámico y en el otro, tejido ovárico de cada animal. Además, se cargó en cada gel diferentes estándares: estándar precoloreado de proteínas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), muestras de tejido hipotalámico u ovárico de rata y ratón (200  $\mu\text{g}$ , como controles positivos) y una muestra de ganglio bovino (200  $\mu\text{g}$ , como control negativo). Las proteínas fueron separadas mediante un sistema de electroforesis vertical (GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA). Se realizó la corrida electroforética de cada gel a 120 voltios, durante 3 h a  $4^\circ\text{C}$ . Las bandas proteicas fueron transferidas desde cada gel hacia una membrana de nitrocelulosa (45  $\mu\text{m}$ ; Sigma, St. Louis MI, EUA), mediante un equipo de transferencia semiseco (Owl Separation System, Portsmouth, NH, EUA). Para este procedimiento, se aplicaron 14 voltios durante 1,5 h a  $4^\circ\text{C}$ . Las membranas fueron bloqueadas con solución buffer Tris-Tween (2,42 g de Base Tris + 29,24 g de NaCl + 0,5 mL Tween-20/1 L de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada; TBST, pH 7,5), que contenía 5% de leche deshidratada y descremada. Este procedimiento se realizó durante 1 h a  $4^\circ\text{C}$ .

La membrana cargada con proteína del hipotálamo, se incubó con el primer anticuerpo para el Ob-R de humano, producido en cabra (*N-20: sc-1833, Santa Cruz Biotechnology, EUA*) a una dilución 1:50, durante 16-20 h a  $4^\circ\text{C}$ , luego de lo cual fue lavada tres veces con TBST durante 5 min. Posteriormente, fue incubada con el segundo anticuerpo, IgG (molécula completa) de conejo anti-cabra conjugado con la enzima peroxidasa (Sigma St. Louis, MI, EUA), durante 1 h a  $4^\circ\text{C}$ . El segundo anticuerpo

fue usado a una dilución de 1:300.

Las bandas protéicas inmunoreactivas se visualizaron mediante una reacción de quimoluminiscencia (*Signal® West Pico; Pierce, Rockford, IL, EUA*). Finalmente, las membranas se expusieron a películas de rayos X durante 30 min para visualizar las bandas protéicas respectivas. Las películas de rayos X conteniendo las bandas protéicas, fueron escaneadas (*Hewlett Packard Scanjet 3970, Palo Alto CA, EUA*) y almacenadas en imágenes de 811 x 614 píxeles (5,41 x 4,10 pulgadas).

Luego, la segunda membrana cargada con proteína del ovario fue incubada con el mismo primer y el mismo segundo anticuerpo para los Ob-R, anteriormente mencionados, pero a una dilución 1:50 y 1:1000, respectivamente. Posteriormente, se continuó con el procedimiento descrito previamente.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El procedimiento estadístico aplicado fue un modelo lineal generalizado (GLM) para lo cual se empleó el paquete estadístico para las Ciencias Sociales (*Statistical Package for the Social Sciences, SPSS*) versión 10, (Año 2000) aplicando un análisis de regresión multivariado multiple. Las variables dependientes fueron: folículos C1, C2, C3 y CL. Las variables independientes fueron: T, CSU, DC, SCU, PU y DDP y condición corporal postparto (CCPP). Para lo cual se aplicó el siguiente modelo estadístico:

$$C1, C2, C3, CL: \text{Intercepto} + \text{CSU} + \text{DC} + \text{PU} + \text{SCU} + \text{DDP} + \text{CCPP} + \text{T} + \text{Interacciones} + \text{Error}$$

Posteriormente, para estudiar el grado de asociación entre las diferentes variables, se utilizó un análisis de correlación de Kendall, considerando una matriz conformada por las siguientes variables: T, características de la involución uterina (CSU, DC, SCU y PU), diferentes clases de folículos y la presencia de CL. Dicha matriz, se conformó en cada momento de evaluación (3, 15, 30 y 45 DPP). Las concentraciones de  $P_4$ , COL y FRTS se estudiaron a través de un ANAVAR para medidas repetidas en el tiempo. El modelo estadístico incluyó T, CCAP como factores entre sujetos y las concentraciones de

$P_4$ , COL y FRTS para el 3, 15, 30 y 45 DPP (variables dependientes).

Para analizar los efectos de las variables de involución uterina (CSU, DC, SCU y PU) sobre la aparición del CL en los primeros 45 DPP, se consideró un modelo de regresión múltiple de Cox incorporando como covariables a T y DDP. Además, se aplicó este mismo modelo de regresión para evaluar el efecto de la CCAP, DPP y las características de la IU (SCU, DC, SCU y PU) sobre la aparición del CL. La ecuación de Cox o la función de riesgo (*hazard*) se construyó como sigue:

$$h_i(t) = h_0(t) \exp(\beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_p x_{ip})$$

Donde, h es el riesgo proporcional al tiempo  $t < t <$ ;  $\beta_1$  es el coeficiente correspondiente a la variable regresiva;  $X_{i1}$ , es el riesgo relativo cuando  $X_i$  aumenta una unidad, manteniéndose constantes las demás. La función de riesgo tiene una aplicación y explicación biológica en la predicción del riesgo de no aparición del CL para una vaca, dependiendo de las variables regresivas incluidas, en el tiempo t.

Para evaluar el efecto de T sobre el porcentaje de preñez (PR) a los 120 DPP, se aplicó un análisis de Kruskal y Wallis, utilizando el estadístico Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Efecto de la involución uterina sobre la actividad ovárica**

El coeficiente de determinación del modelo de regresión múltiple multivariada en general fue bajo ( $r^2 = 0,116 - 0,170$ ). Sin embargo, los resultados parciales mostraron un efecto significativo de las variables regresoras, T y DC, sobre las variables dependientes relacionadas con la AO (Tabla 1). Igualmente, hubo efecto significativo de T sobre la presencia del CL ( $P < 0,05$ ). La CC postparto afectó las diferentes clases foliculares ( $P < 0,01$ ), lo cual coincide con los hallazgos reportados por Dominguez et al. (2007) en vacas de doble propósito. Además, se detectó un efecto de DPP sobre la población de folículos C1 ( $P < 0,05$ ).

Mediante el análisis de correlación se evidenció una asociación significativa ( $P < 0,05$ ) entre T y folículos C3 y entre folículos C3 y CSU desde el DPP 22 al 30. A partir del DPP 29, comenzó a

**Tabla 1.** Valores de F para las variables dependientes: clases de folículos (C) y presencia de CL de acuerdo al T, DPP y las variables de IU

Variabes	C1	C2	C3	CL
T	0,48	0,34	2,01	4,50*
CCPP	5,25*	2,22	3,52*	4,40*
DPP	3,76*	0,69	0,27	0,28
CSU	0,72	2,29	0,18	0,14
DC	0,84	3,20*	2,04	0
SCU	1,16	0,02	2,43	0
PU	0,07	0,54	0,03	0,30

\* (P<0,05).

Modelo estadístico: C1, C2, C3, C4, CL= Intercepto+CSU+DC+ PU+ SCU+DPP+CCPP+T+Interacciones + E

observarse el aumento significativo (P<0,05) de la población de folículos C3. Igualmente se observó una asociación entre CL y CSU, en el DPP 37. El número de folículos C1 no estuvo asociado a T ni a las variables de IU. Hubo una correlación significativa (P<0,01) entre las variables para IU (CSU, DC, SCU y PU). Se evidenció asociación negativa (P<0,05) entre CSU y T a partir del DPP 37.

El análisis de regresión de Cox indicó un efecto significativo (P<0,01) entre la presencia de CL con las variables regresivas CSU y SCU (Tabla 2a y 2b), existiendo un riesgo relativo (con un intervalo de confianza del 95%) a que no aparezca el CL para ambos modelos de 2,18 veces para SCU y de 1,6 veces, para CSU, respectivamente, en los primeros 45 DPP, de tal forma que las alteraciones en el CSU y la SCU, están asociados a la aparición del CL. A pesar de no haber sido detectada alguna correlación entre las diferentes variables y el número de folículos C2, esto podría explicarse a través del hecho de que el número promedio de folículos de tamaño medio (C2), permanece sin cambios, probablemente debido a que representan un tipo de tamaño de folículo transitorio

(Domínguez, 1995). Se ha señalado que la respuesta inflamatoria e inmune, como respuesta a infecciones bacterianas uterinas, comprometen al animal y son eventualmente causantes de subfertilidad e infertilidad (Sheldon y Dobson, 2004). La endometritis es una inflamación superficial del endometrio, que cursa con enrojecimiento de la superficie del epitelio, infiltración de células inflamatorias y congestión vascular. Clínicamente está caracterizada por la presencia de pus en la vagina, 21 días o más del postparto y está asociada con retardo en el proceso de involución (Opsomer *et al.*, 2000). Igualmente, esos autores señalaron que solo el 8% de las vacas con endometritis (moco=3 + olor fétido), ovularon. Es decir, que la función ovárica se ve afectada por una mayor contaminación bacteriana uterina después del parto. Generalmente, el primer folículo dominante tiene una tasa de crecimiento menor y secreta menos estradiol al final de la fase de crecimiento, en vacas con alta contaminación bacteriana (Sheldon *et al.*, 2002). El efecto de los trastornos de la IU (contaminación bacteriana severa) sobre las funciones hipotalámica y pituitaria se ha asociado a la presencia y absorción de endotoxinas, componente de la pared celular de bacterias Gram negativas, desde el lumen uterino hacia la circulación sistémica y periférica (Mateus *et al.*, 2003), lo cual genera una inhibición de la secreción de la GnRH hipotalámica, que a su vez afecta la secreción de LH desde la pituitaria. Otro estudio señala un efecto directo de la endotoxina sobre el ovario (Sheldon y Dobson, 2004). Así también, otros productos bacteriales pueden ejercer su efecto directamente sobre el ovario, o por intermedio de moléculas pro-inflamatorias, tales como las citocinas TNF, IL-1 y IL-6 (Miller *et al.*, 1997). Severas inflamaciones puerperales, con liberación intensiva de citocinas y endotoxinas pueden inducir a un complejo endocrino en cascada, que involucra además de la actividad hipotalámica-pituitaria anterior a la

**Tabla 2a.** Regresión de Cox mostrando la relación entre aparición de CL y las covariables T, e involución uterina (CSU, DC y SCU)

Variable	Coefficiente	Error Estándar	Wald Chi <sup>2</sup>	Prob
T	0,06	0,11	0,29	0,5
CSU	0,46	0,1	18,84	0,01
DC	0,20	0,18	1,18	0,27
SCU	0,78	0,23	11,52	0,01

**Tabla 2b.** Regresión de Cox mostrando la relación entre CL y las covariables CCAP e involución uterina (CSU, DC y SCU)

Variable	Coefficiente	Error Estándar	Wald Chi <sup>2</sup>	Prob
CCAP	0,31	0,23	1,81	0,1
CSU	0,45	0,10	17,8	0,01
DC	0,22	0,17	1,59	0,2
SCU	0,79	0,22	12,07	0,01

glándula adrenal, el páncreas endocrino, la tiroides y la producción y el metabolismo de la HG/IGF-I (Mateus *et al.*, 2003; Kulcsár, 2007). También se han observado en humanos y primates, cambios en la expresión del gen de leptina y niveles de leptina circulante liberada como respuesta inflamatoria por citocinas y su actuación como atenuante de la acción inflamatoria (Landman *et al.*, 2003).

En el caso de la presente investigación la correlación negativa entre CSU y el número de folículos C3 y CL podría indicar, que las alteraciones en esta variable de IU repercuten en la diferenciación folicular y en el retraso de la ovulación antes del DPP45.

### Efecto de los T sobre actividad ovárica

Como se mencionó anteriormente en la Tabla 1, T tuvo efecto significativo sobre CL y una tendencia sobre el número de folículos C3. La Figura 1 muestra los niveles de  $P_4$  acumulada por grupo de T, evidenciándose que las vacas en los grupos T3 y T4, a partir del día 30, ya alcanzaban en forma sostenida niveles de  $P_4$  de 0,5 ng/mL, esta tendencia ascendente indicó el inicio de la actividad luteal (Meikle *et al.*, 2003). Por otra parte, las vacas en los grupos T1 y T2, mantuvieron niveles de  $P_4$  basales, indicando por el contrario, retraso en el inicio de la actividad luteal postparto. El modelo lineal generalizado para medidas repetidas en el tiempo, mostró que las diferencias entre las medias de los tratamientos T3, T4 vs. T1, T2 fueron significativas ( $P < 0,01$ ) a partir del 37 DPP. Igualmente, cuando se analizó la curva de  $P_4$  acumulada, de acuerdo a CCAP, se detectó un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) a partir del 30 DPP (Figura 2), lo cual indica su

implicación sobre la aparición del CL. Los valores fueron para vacas con alta CCAP: 0,5 ng/mL vs Baja CCAP: 0,19 ng/mL, respectivamente, alcanzando valores significativos ( $P < 0,01$ ) a los 45 DPP.

Marín *et al.* (2007), encontraron diferencias significativas en vacas suplementadas con aceite vegetal (500 g/vaca) entre los 28 y 56 DPP, al compararse con el grupo control (no suplementado). Jará *et al.* (2006), encontraron que las vacas con mejor CCAP fueron más aptas que las de pobre CCAP, para desencadenar la ovulación del primer folículo dominante. Asimismo, encontraron que el primer CL postparto se detectó a los  $22,4 \pm 10,9$  DPP (rango de 12 a 68 días). Savio *et al.* (1990) encontraron un mayor intervalo entre el parto y la primera ovulación postparto ( $27,4 \pm 23$  días, rango 9-85 días). En el presente trabajo las vacas de baja CCAP (T1 y T2), con niveles basales de  $P_4$  en plasma durante los primeros 45 DPP, o sin presencia de CL, tuvieron procesos de IU prolongados, como se señaló en la Tabla 2b. Con respecto a esto, Hajurka *et al.* (2005), demostraron que al existir mayor grado de inflamación y descarga de moco del útero, la IU se prolongó hasta el  $43 \pm 11,0$  DPP. Estos autores además señalaron que el diámetro del útero es el factor mayormente asociado con el estro durante el periodo de la involución, y que ligeros incrementos del diámetro del cervix y útero estuvieron relacionados con el crecimiento de folículos pre-ovulatorios y ovulación. El proceso inflamatorio del útero da como resultado interrupción en la secreción de GnRH y LH lo que retarda el crecimiento folicular y la ovulación (Silvestre, 2003).

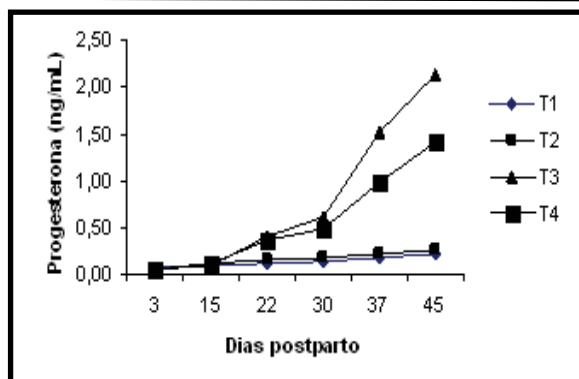


Figura 1. Niveles de  $P_4$  acumulada en vacas doble propósito durante el postparto en los diferentes T

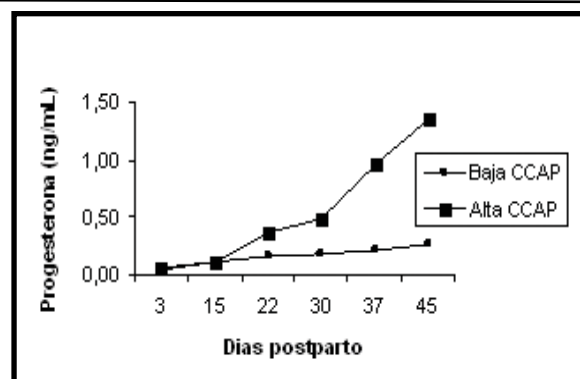


Figura 2. Niveles de  $P_4$  acumulada en vacas doble propósito de CCAP alta y baja



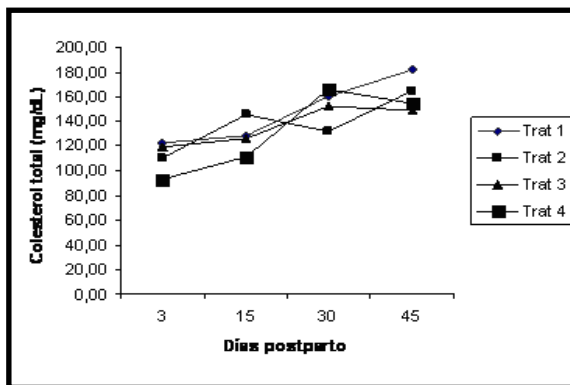
**Metabolitos sanguíneos**

El análisis estadístico no mostró diferencias entre el nivel promedio de COL por T, durante los 45 DPP, cuyas tendencias se pueden observar en la Figura 3. Se evidenció una tendencia lineal ascendente en los niveles de COL, desde el d 3 y hasta el 45 DPP, sin que mostraran diferencias estadísticas entre tratamientos.

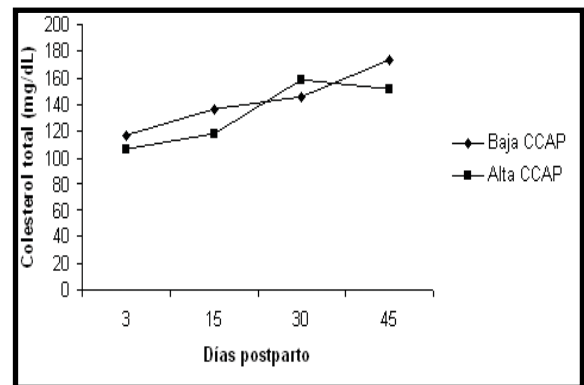
Los niveles promedio y desviación estándar de COL, global para todos los grupos por T, los días 3, 15, 30 y 45 DPP fueron de  $110,9 \pm 42,2$ ;  $127,5 \pm 41,1$ ;  $151,9 \pm 43,0$  y  $163,6 \pm 43,1$  mg/dL, para T1, T2, T3 y T4, respectivamente. Pero hubo diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) entre períodos de muestreo. Sin embargo, estos valores fueron considerados como normales (80-240 mg/dL) por Galvis *et al.* (2007) y fueron similares a los encontrados por Marin *et al.* (2007) en vacas lecheras suplementadas con lípidos durante el postparto, cuando registraron valores promedio de 90 mg/dL para el 7 DPP y de 150 mg/dL para el 42 DPP. Estos niveles fueron mayores ( $P < 0,05$ ) que en vacas sin suplementación con lípidos. Igualmente, similares tendencias fueron reportadas por Galvis *et al.* (2007), quienes reportaron niveles de 109,2 mg/dL en el día 10 PP, hasta 200, 4 mg/dL en el 40 DPP. En nuestro caso, las vacas en todos los T recibieron una ración energética que solo difería en niveles ofrecidos de 1 y 3 kg/vaca/día. Es posible que con la proporción de la dieta rechazada en las vacas de alta alimentación, ambos grupos consumieran cantidades de la ración menores que la ofrecida. Por tanto, no se manifestaron diferencias notables entre T. Esta misma tendencia se observó, al no encontrarse diferencias entre CCAP alta y baja (Figura 4).

Con respecto a la FRTS hubo diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre T, pero no entre períodos de muestreo. Los valores promedio y desviación estándar por período encontrados fueron:  $3,2 \text{ mg/dL} \pm 1,2$ ;  $4,1 \text{ mg/dL} \pm 2,4$ ;  $3,7 \text{ mg/dL} \pm 2,1$  y  $4,0 \text{ mg/dL} \pm 2,4$ , correspondientes a los 3, 15, 30 y 45 DPP. Estos promedios por períodos fueron superiores al valor de referencia de 1,7 mg/dL reportado por Campos *et al.* (2005), trabajando con 210 vacas multíparas en Brasil. Es posible que por ser animales suplementados con raciones provenientes de fuentes energéticas, los valores encontrados estuvieron por encima de los valores de referencia. Igualmente, no se observaron diferencias por CCAP ni por NA, a pesar de que se observó una tendencia en las vacas con NA alto durante los 45 DPP (Figura 5) y por CCAP alta entre los 22 y 45 DPP (Figura 6).

La concentración de FRTS es un reflejo de la glicemia en el tiempo (Ceballos *et al.*, 2002); así, el aumento en los niveles de este indicador sólo se vería reflejado dos semanas después de la suplementación, lo que concuerda con un aumento en el nivel de FRTS postparto, como consecuencia del inicio de la suplementación al parto. No obstante, en otros estudios se ha reportado una disminución en la concentración de FRTS postparto en vacas que no eran suplementadas en el preparto (Ceballos *et al.*, 2002). Como se observa en la Figura 6, a pesar de que no existió diferencia significativa entre ambos grupos, se observó una ligera caída de los niveles de FRTS en las vacas con CCAP baja, a partir del 22 hasta el día 30 DPP, cuando comenzaron a recuperarse. Esta caída momentánea en el balance energético pudo haber influenciado la actividad ovárica durante esa etapa.



**Figura 3.** Niveles de COL total en vacas doble propósito sometidas a diferentes T durante el postparto



**Figura 4.** Niveles de COL en vacas doble propósito con CCAP alta y baja

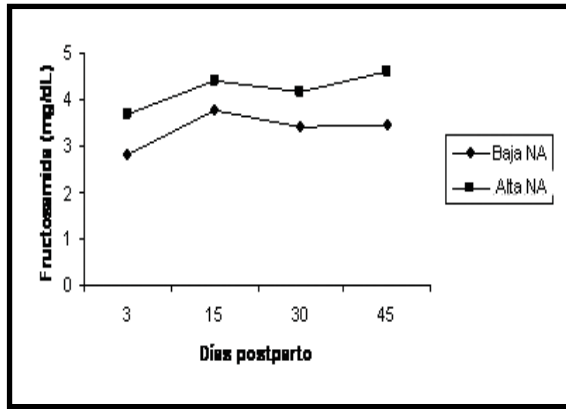


Figura 5. Niveles de FRTS en vacas doble propósito con NA bajo y alto

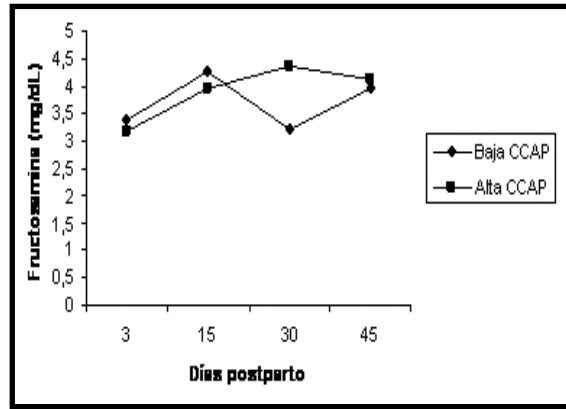


Figura 6. Niveles de FRTS en vacas doble propósito con CCAP baja y alta

### Expresión de receptores de Leptina (Ob-R) en hipotálamo y ovario

La expresión del Ob-R en el hipotálamo fue demostrada mediante la aparición de una banda de peso molecular de aproximadamente de 120 kDa. La mayor expresión de este receptor, medida en unidades de densidad óptica, se presentó en las vacas con CCAP alta en comparación con las vacas que presentaron una CCAP baja, independientemente del nivel de alimentación al cual fueron sometidas (Figura 7).

En el caso del Ob-R en el ovario, se identificó una banda protéica con el mismo peso molecular que para el caso del Ob-R del hipotálamo. Al evaluar la expresión del Ob-R ovárico, no se pudo observar efecto del T sobre la expresión de este receptor, siendo su expresión independiente tanto del nivel de alimentación como de la CCAP (Figura 8). Se ha demostrado en ratas (Watanobe, 2002) la acción directa de la leptina tanto en los cuerpos celulares como en los axones terminales de las neuronas donde se sintetiza la GnRH, estimulando la liberación de esta hormona y, por consiguiente la LH *in vivo*. Por otro lado, la concentración periférica de leptina ha sido asociada a la CC en vacas lactantes y al nivel

de alimentación en vacas no lactantes (Webb *et al.*, 2004; Chilliard *et al.*, 2005). Por su parte, Meikle *et al.* (2003) encontraron que la CCAP afectó los niveles de leptina, siendo las concentraciones más altas, en vacas de CCAP alta. En vacas de CCAP baja no se observó una correlación entre CC y la expresión del receptor de leptina, indicando que se requiere de un mínimo de CC para que exista una correlación entre ambas. Los resultados de esta investigación mostraron una mayor expresión de los Ob-R hipotalámicos en vacas con alta CC. Es posible que el hipotálamo se haga más sensible a la leptina en vacas de CCAP alta que en vacas de CCAP baja. Sin embargo, la expresión de los Ob-R a nivel hipotalámico no se diferenció entre T o NA. Nicklin *et al.* (2007) han demostrado recientemente la expresión de Ob-R en el CL bovino. Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por Giraldo *et al.* (2005) en vacas Cebú, en los cuales vacas con menor pérdida de CC, tratadas con hCG, expresaron un mayor número de Ob-R, necesarios para la luteinización y adquisición de la capacidad ovulatoria. Pero también señalaron que en los casos de vacas que no presentaron folículos dominantes (C3), el patrón de fluorescencia fue bajo. Esto coincide con la baja expresión de receptores ováricos en las vacas

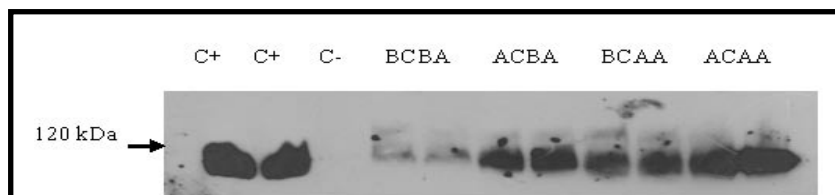
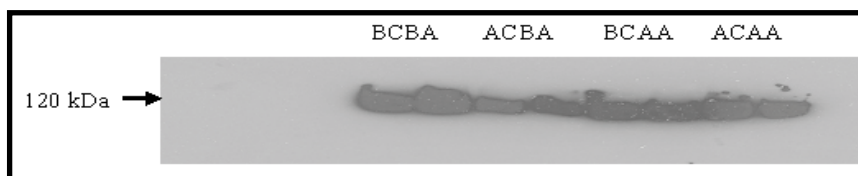


Figura 7. Expresión de Ob-R en hipotálamo de vacas doble propósito en los diferentes T a los 45 DPP. C+: control positivo, C-: control negativo



**Figura 8.** Expresión de Ob-R en ovario de vacas doble propósito en los diferentes T a los 45 DPP

de CCAP baja, utilizadas en nuestro estudio. En este sentido, la relación significativa ( $P < 0,05$ ) entre CCAP, folículos C3 y CL y los bajos niveles de  $P_4$  ( $< 0,5$  ng/mL) de vacas con CCAP baja durante los 45 DPP se corresponde con los patrones de expresión baja.

### Efecto de T e IU sobre la preñez

Como se señaló en la Tabla 2, las variables CSU y SCU resultaron ser las variables de IU con mayor influencia sobre la presencia de CL. Estas variables fueron consideradas los indicadores más resaltantes para definir los casos de endometritis, desde el punto de vista clínico en los primeros 45 DPP (Le Blanc *et al.*, 2002). Los resultados y su relación con la AO y PR se muestran en la Tabla 4.

Se observó que una alta proporción de endometritis en vacas bajo el T1 durante los primeros 30 DPP, afectó la manifestación de la AO. Caso contrario ocurrió en T2, T3 y T4, en los cuales no se observaron casos importantes de endometritis antes de los primeros 30 DPP. Posterior a los 30 días y hasta los 45 DPP, se observaron algunos casos de endometritis en las vacas correspondientes a T1 (16,6%), T2 (28,5%) y T4 (16,6%). Sin embargo, en las vacas sometidas a T2, T3, T4 se observó la presencia de folículos C3 (57%), AO (14,2%, 57% y 28,5%, respectivamente) y CL en alta proporción en T3 y T4 (57%). Sheldon *et al.* (2002) señalaron que eventos con alta contaminación bacteriana uterina estuvieron asociados con diámetros reducidos del primer folículo dominante, una tasa de crecimiento lenta y una disminución en la secreción de estradiol. Esto fortalece las evidencias de un efecto del útero sobre el ovario después del parto, fundamentalmente sobre la selección del folículo dominante. La PR al final del experimento resultó diferente ( $P < 0,01$ ) entre los T: 20%, 0%, 75% y 60% para T1, T2, T3 y T4, respectivamente. Le Blanc *et al.* (2002) habían confirmado la existencia de un alto riesgo de fallas en la preñez en vacas con endometritis entre los 20-33 DPP, con probabilidad 1,7 veces mayor de

ser descartadas por falla reproductiva. Los mismos autores reportaron que diámetros de cuernos uterinos por encima de 8 cm entre los 20-33 DPP, estuvieron asociados significativamente a baja fertilidad a los 120 DPP. Así mismo, señalaron que descargas muco-purulentas y purulentas tendieron a aumentar el intervalo parto-concepción y la reducción en 20%, en la tasa de PR. Igualmente, Kulcsár (2007) demostró que vacas con severas metritis puerperales durante los primeros 35 DPP mostraron 80% de ausencia de ciclo y sólo quedó gestante el 40%. En este experimento se observó (Tabla 3) que las vacas con cambios en los parámetros evaluados relacionados al proceso de IU, basados en la alteración de la SCU y CSU, tuvieron un riesgo relativo mayor de 2,21 y de 1,58 veces de ausencia de un CL, respectivamente, lo cual pudiera haber desencadenado fallas en la reproducción. En esta investigación (Tabla 4), las vacas del T3 y T4 alcanzaron 75% y 60% de preñez, respectivamente a los 120 DPP. Por el contrario, las vacas sometidas a T1 y T2, con altos porcentajes de endometritis, solo quedaron gestantes 20% y 0%, respectivamente, considerando también que estas vacas tuvieron baja CCAP y estuvieron sometidas a NA restringida.

### CONCLUSIONES

Se concluye que el NA y la CCAP ejercieron un efecto positivo sobre el desarrollo folicular y el

**Tabla 3.** Riesgo relativo de las variables sobre la presencia del primer CL

Variable	Tasa de riesgo relativo	Tasa de riesgo relativo inferior al 95%	Tasa de riesgo relativo superior al 95%
CCAP	1,374	0,865	2,182
T	1,124	0,912	1,385
CMC	1,580	1,274	1,953
DC	1,247	0,995	1,756
PU	1,113	0,771	1,606
SCU	2,214	1,414	3,467

**Tabla 4.** Porcentajes de casos de endometritis examinados entre los 30 y 45 DPP con relación a la proporción de AO y PR en los diferentes T

Variable	Examinadas (hasta 30 DPP)				Examinadas (hasta 45 DPP)			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
T								
Total (n)	6	7	7	7	6	7	7	7
Endometritis (%)	66	0	0	0	16,6	28,5	0	16,6
AO (P <sup>a</sup> ) (%)	0	14,2	42,8	14,2	0	14,2	57	28,5
C3 (%)	0	28,5	14,3	14,3	16,6	57	57	57
CL (%)	0	14,2	14,2	0	16,6	0	57	57
Variable	Gestación antes de 120 DPP (P<0,01)				Gestación antes de 150 DPP (P>0,01)			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
T								
PR (%)	20	0	75	60	20	50	75	60

CL. Sin embargo, las variables relacionadas con la IU (CSU y SCU) aparecen como los factores que más afectaron la AO. La expresión de los receptores hipotalámicos de leptina en vacas de CCAP alta demostró la influencia sobre la AO. En consecuencia de lo anterior, hubo mayor PR en los tratamientos T3 y T4 antes de los 120 DPP.

#### AGRADECIMIENTOS

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

#### REFERENCIAS

Bach, A. 2001. La reproducción del vacuno lechero. Nutrición y fisiología. XVII Curso de especialización FEDNA. [en línea]. Dirección URL: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/2001CAPV.pdf>. [Consulta: 6 de Nov. 2007].

Barb, C.R.; Kraeling, R.R. 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Anim. Rep. Sci.*, 82-83:155-167.

Campos, R. F.; González, L.; Lacerda, A.; Coldebella, A. 2005. Perfil metabólico obtenido de pool de sueros o de muestras individuales. *Arch. Zoot.*, 54:113-116.

Ceballos, A.; Gómez, P.M.; Vélez, M.; Villa, N.; López, L. 2002. Variación de los indicadores bioquímicos del balance de energía según el estado productivo en bovinos lecheros de Manizales, Colombia. *Rev. Col. Cs. Pec.*, 15:13-25.

Chilliard, Y.; Delavaud, C.; Bonnet, M. 2005. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological

regulations in relation with energy metabolism. *Dom. Anim. Endocrin.*, 29:3-22.

Díaz, T.; Schmitt, E.J.P.; de la Sota, R.L.; Thatcher, M.J.; Thatcher, W.W. 1998. Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *J. Anim. Sci.*, 76:1929-1936.

Domínguez, M.M. 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology*, 43:1405-1418.

Dominguez, C.E.; Garmendia, J.; Martínez, N. 2007. Influencia de la época de parto, la condición corporal, y la suplementación sobre la actividad post-parto de vacas mestizas bajo pastoreo mixto en el norte del Estado Guárico, Venezuela. *Rev. Fac. Cs. Vets., UCV*, 48:37-50.

Erb, H.N.; Smith, R.D.; Ottenacu, P.A.; Guard, C.L.; Hillman, R.B.; Powers, P.A.; Smith, M.C.; White, M.E. 1985. Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield and culling in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 68:3337-3349.

Esslemont, R.J.; Peeler, E.J. 1993. The scope for raising margins in dairy herds by improving fertility and health. *Br. Vet. J.*, 149: 537-547.

Fattet, I.; Jaurena, M. 1988. El estado corporal de las vacas lecheras. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 8 p.

Galvis, R.D.; Agudelo, D.; Saffon, A. 2007. Condición corporal, perfil de lipoproteínas y actividad ovárica en vacas Holstein en lactancia temprana. *Rev. Col. Cs. Pec.*, 20:16-29.

Giraldo, C.A.; Montaña, E.L.; Ruiz, Z.T. 2005. Receptores de leptina y de hormona luteinizante, peso y condición corporal se asocian con la reactivación ovárica postparto en las vacas cebú. *Rev. Col. Cs. Pec.*, 18:4. pp. 359, (Resumen).

- Guilbault, L.A.; Thatcher, W.W.; Drost, M.; Haibel, G.K. 1987. Influence of physiological infusion of prostaglandin F2 $\alpha$  into postpartum cows with partial suppressed endogenous production of prostaglandin. Uterine and ovaric 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. Pulaway*, 49:53-58.
- Iain, J. C.; Henry, A. 1999. Leptin and reproduction. *Rev. Rep.*, 4:48-55.
- Jará, D.; Rangel, R.; Garcia, J. 2006. Efecto del nivel de producción de leche, número y estación de parto sobre el reinicio de la actividad ovárica postparto en vacas Holstein. *Vet. Completa*, 14:1-23.
- 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.
- Kulcsár, M. 2007. Clinical endocrinology of leptin in ruminant. PhD Dissertation. Szent Istvan University. Postgraduate School of Veterinary Science, Budapest, Hungary, 138p.
- Landman, R.E.; Puder, J.J.; Xiao, E.; Freda, P.U.; Ferin, M.; Wardlaw, S.L. 2003. Endotoxin stimulates leptin in human and non-human primate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88:1285-1291.
- Le Blanc, S.J.; Duffield, T.F.; Leslie, K.E.; Bateman, K.G.; Keefe, G.P.; Walton, J.S.; Johnson, H. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact in reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 85:2223-2236.
- Liefers, S.C.; Veerkamp, R.F.; Te Pas, M.F.W.; Chilliard, Y.; Van der Lende, T. 2005. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. *Dom. Anim. Endocrin.*, 29:227-238.
- Lindell, J.O.; Kindahl, H.; Jansson, L.; Edqvist, L.E. 1982. Postpartum release of prostaglandin F2 $\alpha$  and uterine involution in the cow. *Theriogenology*, 17:237-245.
- 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.
- Mateus, L.; Lopes da Costa, L.; Dinisz, P.; Ziecik, A. J 2003. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Anim. Reprod. Sci.*, 76:143-154.
- Marín, A.M.; Tinoco, J.; Herrera, J.; Sánchez, L.; Sánchez, V.; Solorio, J.; García, A. 2007. Reinicio de actividad ovárica y nivel de metabolitos de lípidos en vacas lecheras suplementadas con aceite vegetal durante el postparto temprano. *Interciencia*, 2:180-184.
- Meikle, A.; Cavestany, D.; Blanc, J.; Krall, E.; Uriarte, G.; Rodríguez-Irazoquil, M.; Rupprechter, G.; Ferraris, A.; Chilibroste, P. 2003. Perfiles metabólicos y endocrinos, parámetros productivos y reproductivos en vacas de leche en condiciones pastoriles. *Veterinaria*, 40:25-40.
- Miller, A.J.; Luheshi, G.N.; Rothwell, N.J.; Hopkings, S.J. 1997. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. *Am. J. Physiol.*, 272:857-861.
- N.R.C. 1.984. Nutrimet requeriments of beef cattle (6th ed.). Natural Academy Press. Washington, D.C.
- Nicklin, L.T.; Robinson, R.S.; Masters, P.; Campbell, B.K.; Mann, G.E.; Hunter, M.G. 2007. Leptin in the bovine corpus luteum: receptor expression and effects and progesterone production. *Mol. Reprod. Dev.*, 74:724-729.
- Opsomer, G.; Grohn, Y.T.; Hertl, J.; Coryn, M.; Deluyker, H.; De Kruif, A. 2000. Risk factors for postpartum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: A field study. *Theriogenology*, 42:841-857.
- Payne, J.M. 1989. Metabolic and nutritional diseases of cattle. Blackwell Scientific Publication Oxford. 149 p.
- Quintela, L. A.; García, M. E.; Peña, A. I.; Díaz, C.; Barrio, M.; Becerra, J. J.; Herradón, P. G. 2003. Asociación entre el perfil sérico bioquímico y la duración de la involución uterina en hembras bovinas de producción láctea. *Arch. Zootec.*, 52:419-429.
- 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.
- Savio, J.D.; Boland, M.P.; Hynes, N.; Roche, J.F. 1990. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *J. Reprod. Fertil.*, 88:569-579.
- Silvestre, F. 2003. Reproductive ovarian and uterine responses to a GnRH-agonist (deslorelin) implant during and after the postpartum summer heat – stress period in dairy cattle. Master of Science Thesis. University of Florida. USA. 192p.
- Slama, H. 1996. Prostaglandines, leucotrienes et suinvolution utérine chez la vache. *Rec. Med. Vet.*, 173:369-381.
- Sorensen, A.; Adam, A. C.; Findlay, P. A.; Marie, M.; Thomas, L.; Travers, M.T.; Vernon, R.G. 2002. Leptin secretion and hypothalamic neuropeptide and receptor gene expression in sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 282:1227-1235.

- Sheldon, I.M.; Dobson, H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83:295-306.
- Sheldon, I.M.; Noakes, D.E.; Ricroft, A.N.; Pfeiffer, D.U.; Dobson, H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination alters parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, 123:837-845.
- Watanobe, H. 2002. Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *J. Phys.*, 545:255-268.
- Webb, R.; Garnsworthy, P.C.; Gong, J.G.; Armstrong, D.G. 2004. Control of follicular growth: local interaction and nutritional influences. *J. Anim. Sci.*, 82:E63-E74.
- Wittwer, F. 2000. Marcadores bioquímicos no controle de problemas metabólicos nutricionais em gado de leite. En: Perfil metabólico em ruminantes. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. pp. 53-63.