



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE  
LA SALUD ANIMAL**

**MODIFICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN  
CORPORAL MEDIANTE EL USO DE UN AGONISTA  
BETA ADRENÉRGICO Y SUS EFECTOS SOBRE  
INSULINA, FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR  
A LA INSULINA-I, LEPTINA Y LA RESPUESTA  
REPRODUCTIVA EN VACAS PRODUCTORAS DE  
CARNE POSPARTO**

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**ADRIAN GUZMÁN SÁNCHEZ**

**TUTOR:**  
**DR. CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR**

**COMITÉ TUTORAL:**  
**DR. EVERARDO GONZÁLEZ PADILLA**  
**DR. PEDRO GARCÉS YÉPEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo a toda mi familia, en especial a mi Mamá y Hermana que me han apoyado incondicionalmente para poder alcanzar esta meta y a Norma y Stacy que llegaron al final del proceso para impulsarme a alcanzar el sueño de ser Doctor en Ciencias.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios Padre por la inmensa fortuna que me dio al tener la oportunidad de estudiar un Doctorado.

Al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, difícil decir el por qué, ya que como si fuera poco gracias a su guía, apoyo y confianza me convertiré en Dr.

Al Dr. Everardo González Padilla y al Dr. Pedro Garcés Yépez por las aportaciones que tuvieron a lo largo del desarrollo de la tesis.

A los miembros de mi Jurado el Dr Héctor Vera, el Dr Germán Mendoza, el Dr Joel Hernández, el Dr Luis Zarco por los comentarios hechos a la tesis que sin duda ayudaron a solventar problemas tanto de forma como de fondo.

A la Dra Ana que de una u otra forma desde que deje de ser su alumno me sigue impulsando para ser un buen profesionista

A Susi que no solo me ayudo con en análisis de muestras si no que fue una gran amiga que me apoyo durante todo mi doctorado

A Ana, Clara, Toño, Bruno y el Dr Perera por su apoyo para la cuantificación de hormonas y metabolitos.

Al Dr Dee de Viginia Tech en Estados Unidos que me ayudo no solo a realizar uno de los experimentos de esta tesis, si no que hizo más fácil mi estancia en su País.

Al Dr Jorge y el Dr Rene del rancho experimental las Margaritas por el apoyo brindado para la obtención de los datos de campo de esta tesis.

A Richar, Moy, Eve, Jovy y Naro por la amistad y apoyo que me brindaron en las Margaritas

En general a todos los miembros del departamento de Reproducción de la FMVZ que me aceptaron como un miembro más del departamento

Agradezco muy especialmente a la Familia Sánchez Hernández en especial a mis tíos José e Isma y mis primos Fredy, Roció, Javi, Liz y Diego por toda la paciencia y apoyo que me han tenido desde que me recibieron en su casa hace más de 12 años

Al CONACyT por la beca que me otorgaron para poder realizar mis estudios de doctorado

Al Macroproyecto SDEI-PTID-7.31 de la UNAM que otorgo el apoyo económico para la realización de los estudios presentados en esta tesis

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue diferenciar la relación que existe entre la condición corporal (CC), las hormonas metabólicas IGF-I, insulina y leptina y la función reproductiva en vacas productoras de carne lactando. Para ello se utilizó el agonista beta-adrenérgico ( $\beta$ A) zilpaterol que ocasiona un aumento en la deposición muscular y mayor utilización de la grasa provocando así un incremento en la CC al mismo tiempo que se tiene una disminución en tejido graso. Esta disociación en la relación de CC con tejido graso altera también las concentraciones de hormonas metabólicas y permitió estudiar sus efectos sobre la respuesta a un tratamiento de sincronización/inducción de la ciclicidad. Los experimentos se realizaron con vacas productoras de carne lactando alojados en potreros con pastos nativos. Experimento 1: se usaron 77 vacas ( $CC= 3.1\pm 1.4$ ) suplementadas durante 33 días con 2 kg/animal/día de alimento comercial conteniendo o no 0.15 mg/kg de peso vivo de zilpaterol (grupo zilpaterol,  $n= 38$ ; grupo testigo,  $n=39$ ). Experimento 2: se usaron 30 vacas ( $CC= 3.1 \pm 0.31$ ) suplementadas por 60 días con una ración que cubría 64% de sus requerimientos de energía metabolizable, y adicionada o no (grupo zilpaterol,  $n=15$ ; grupo testigo,  $n=15$ ) con zilpaterol. Experimento 3; ciento doce vacas con buena condición corporal ( $7\pm 0.6$ ), fueron divididas en dos grupos, grupo zilpaterol ( $n=46$ ) y grupo testigo ( $n=66$ ) y suplementadas durante 45 días con 900 g de maíz molido adicionado o no con zilpaterol. Al final del periodo de suplementación los animales fueron sometidos a un protocolo de inducción de estros con progestágenos. El zilpaterol aumentó la masa muscular y la CC ( $P<0.05$ ), y redujo ( $P<0.05$ ) la proporción de grasa /musculo (Exp 1 y 2). Similarmente, el porcentaje de vacas con actividad lútea después de la inducción de estros fue menor ( $P<0.05$ ) para los animales tratados. Los cambios en la composición corporal en las vacas tratadas con zilpaterol fueron acompañadas de la reducción en las concentraciones de IGF-I ( $P<0.05$ ) para el experimento 1 (38%) con respecto al grupo testigo. En el experimento 2 no hubo diferencia en las concentraciones hormonales durante el tratamiento con zilpaterol. Sin embargo, 19 días posteriores al tratamiento hubo una reducción de las concentraciones de IGF-I y leptina (25.4% y 27.9% respectivamente), sin cambios en insulina respecto al grupo testigo. El zilpaterol redujo 39% ( $P<0.05$ ) el número de vacas inseminadas y 39% ( $P<0.05$ ) la tasa de preñez al final del periodo de empadre. Finalmente en ganado con CC alta (experimento 3), aun cuando el zilpaterol redujo ( $P<0.05$ ) la grasa dorsal y la grasa en el área del glúteo, esta reducción no afectó ( $P>0.05$ ) las concentraciones de leptina e IGF-I, ni la respuesta al programa de inducción de estros. En conclusión los estudios presentados aquí muestran que una cantidad mínima de grasa corporal es necesaria para una respuesta reproductiva óptima en vacas productoras de carne lactando, además es probable que el IGF-I, es el principal mediador entre el estatus energético y la eficiencia reproductiva en vacas productoras de carne con baja condición corporal durante el posparto. Finalmente, el zilpaterol es una buena herramienta para evaluar los efectos específicos de la grasa corporal y las hormonas producidas en el tejido adiposo sobre la función reproductiva en vacas posparto.

Palabras clave: zilpaterol, hormonas metabólicas, reservas de energía, vacas productoras de carne posparto, inducción de estros.

## ABSTRACT

The aim of this thesis was to differentiate the relationship among body condition score (BCS), metabolic hormones IGF-I, insulin and leptin and reproductive function in lactating beef cows. We used the beta-adrenergic agonist ( $A\beta A$ ) zilpaterol to increase muscle mass and reduce body fat, which increase BCS but reduce energy reserves in adipose tissue. This dissociation in the relationship of BCS with fat tissue alters the metabolic hormone concentrations and allowed to study their effects in the repose to an estrous induction/synchronization treatment. The experiments were conducted with lactating beef cows kept in native pastures. Experiment 1: 77 cows were ( $CC = 3.1 \pm 1.4$ ) supplemented during 33 days with 2 kg/animal/ day of commercial feed containing or not 0.15 mg/kg body weight of zilpaterol (zilpaterol group,  $n = 38$ ; control group,  $n = 39$ ). Experiment 2: 30 cows were ( $CC = 3.1 \pm 0.31$ ) supplemented for 60 days with a ration that provided 64% of their metabolizable energy requirements, containing or not zilpaterol (zilpaterol group,  $n = 15$ ; control group,  $n = 15$ ). Experiment 3: 112 cows in good body condition ( $7 \pm 0.6$ ), were divided into zilpaterol ( $n = 46$ ) and control group ( $n = 66$ ) and supplemented for 45 days with 900 g of ground corn added or not with zilpaterol. At the end of the supplementation period cows were treated with progestins for the induction of estrus. Zilpaterol increased muscle mass and BCS ( $P < 0.05$ ) and decreased ( $P < 0.05$ ) the fat / muscle ratio (Experiment 1 and 2). Similarly, the percentage of cows with luteal activity was lower ( $P < 0.05$ ) for the zilpaterol than control cows after estrus induction. Changes in body composition in the zilpaterol group were accompanied by the reduction in IGF-I concentrations ( $P < 0.05$ ) for experiment 1 (38%). In experiment 2 there was no difference in hormone concentrations during treatment with zilpaterol. However, 19 days after treatment there was a reduction in IGF-I and leptin (25.4% and 27.9% respectively), without changes in insulin. The zilpaterol decreased 39% ( $P < 0.05$ ) the number of cows inseminated and 39% ( $P < 0.05$ ) pregnancy rate at the end of the breeding period. Finally in cows with high BCS (experiment 3), although zilpaterol diminished ( $P < 0.05$ ) backfat and rump fat, this reduction did not affect ( $P > 0.05$ ) leptin and IGF-I concentrations or the response to estrus induction treatment. In conclusion the studies presented here show that a minimal amount of body fat is necessary for optimal reproductive performance in lactating beef cows, moreover it seems that IGF-I, is the main link between the energy status and reproductive efficiency in postpartum beef cows with poor BCS. Finally, zilpaterol is a good tool to evaluate the specific effects of body fat and hormones produced in adipose tissue on reproductive function in postpartum cows.

Key words: zilpaterol, metabolic hormones, energy reserves, postpartum beef cows, estrous induction.

## TRABAJOS GENERADOS DE ESTA TESIS

### ARTÍCULOS EN REVISTAS INDEXADAS

#### Publicados:

**Guzmán A**, Gonzalez-Padilla E, Garcés-Yepez P, Rosete-Fernandez JV, Calderón-Robles RC, Murcia C, y Gutiérrez CG. 2012. Reduced response to an estrus induction program in postpartum beef cows treated with zilpaterol and gaining body weight. *Animal Reproduction Science*. 130: 1– 8.

#### En preparación.

En vacas productoras de carne posparto alimentadas con una dieta alta en energía para incrementar la acumulación de grasa corporal el tratamiento con zilpaterol reduce la respuesta a un programa de inducción de estros

El uso de un agonista beta-adrenérgico ( $\beta$ AR) en vacas productoras de carne posparto con condición corporal alta, reduce la grasa corporal pero no la respuesta a un programa de inducción de estro.

### TRABAJOS EN CONGRESOS

**Guzmán SA**, Garcés YP, González PE Rosete FJ, Calderon CR and Gutierrez CG. 2008. La Respuesta a un programa de inducción de la ciclicidad de vacas productoras de carne con cría es afectada por la condición corporal. XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Guadalajara México.

**Guzmán SA.**, Gonzalez-Padilla E., Garces-Yepez P., y Gutiérrez CG. 2009. Decreased Body Fat Reduces the Response to an Estrus Induction Program in Beef Suckling Cows, Associated to a Reduction in Leptin Concentration. *Biol Reprod*, J 81: suppl 1. 494.

**Guzmán SA**, González-Padilla E, Garcés-Yepez P, Rosete FJ, Calderón CR, Murcia C, Gutiérrez CG. 2009. Reducción en las Concentraciones Séricas de Insulina e IGF-I pero no Leptina se Asocia a una Reducción en la Respuesta a un Programa de Inducción de Estros en Vacas de Carne Amamantando. XLV Reunión Nacional de Investigaciones Pecuarias. Saltillo México.

**Guzmán SA**, Whittier WD, Kasimanickam R, Eyestone WE, Keisler DH, González-Padilla E, Garcés-Yepez, Gutiérrez CG. 2010. La reducción en la grasa corporal por efecto de un agonista de receptores  $\beta$  adrenérgico ( $\beta$ AR) no afecta la eficiencia reproductiva en vacas de carne con buena condición corporal y amamantando durante el posparto temprano. V Cátedra CUMex de Medicina Veterinaria y Zootecnia “Aline S. de Aluja” sobre Fertilidad Animal. Zacatecas México

**Guzmán SA**, González-Padilla E, Garcés-Yepez P, Whittier WD, Kasimanickam R, Eyestone WE, Keisler DH, Rosete-Fernandez JV, Calderón-Robles RC, y Gutiérrez CG. 2011. Uso de un agonista beta adrenérgico ( $\alpha\beta$ ) para disociar la relación entre el status energético, insulina, IGF-I y leptina para evaluar el efecto de estas hormonas sobre la reproducción de vacas de carne posparto. XLVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. León Guanajuato.



## DECLARACIÓN

El autor de esta tesis da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que a tesis esté disponible para cualquier tipo de intercambio bibliográfico.

---

Adrian Guzmán Sánchez

## CONTENIDO:

Introducción	1
Capítulo 1	
Revisión de Literatura	3
Núcleos hipotalámicos que controlan la secreción de GnRH	3
Neurotransmisores involucrados en la secreción de GnRH	5
Neuropéptido Y (NPY)	5
Propiomelanocortina (POMC)	6
Péptido similar a la Galanina (GALP)	7
Kisspeptina	8
Reproducción y condición corporal	8
Hormonas y metabolitos que afectan la eficiencia reproductiva	10
Metabolismo de glucosa	10
Metabolismo de Lípidos	11
Glucosa AGLs, cuerpos cetónicos y reproducción	13
Insulina	15
Estructura y mecanismo de acción	15
Insulina y Reproducción	16
IGF-I	19
Sistema IGF y mecanismo de acción	19
IGF-I y reproducción	20
Leptina	22
Mecanismo de acción	22
Leptina y Metabolismo	23
Leptina y Reproducción	24
Sistema Adrenérgico de neurotransmisión	27
Agonistas de receptores $\beta$ adrenérgicos	28

## Capítulo 2

Reduced response to an estrus induction program in postpartum beef cows treated with zilpaterol and gaining body weight. 31

Abstract	32
Introduction	32
Materials and methods	33
Results	34
Discussion	35
Acknowledgments	38
References	38

## Capítulo 3

En vacas productoras de carne posparto alimentadas con una dieta alta en energía para incrementar la acumulación de grasa corporal el tratamiento con zilpaterol reduce la respuesta a un programa de inducción de estros 40

Resumen	41
Introducción	42
Materiales y Métodos	44
Resultados	50
Discusión	56
Agradecimientos	62
Referencias	62

## Capítulo 4

El uso de un agonista beta-adrenérgico ( $\beta$ AR) en vacas productoras de carne posparto con condición corporal alta, reduce la grasa corporal pero no la respuesta a un programa de inducción de estro 69

Resumen	70
Introducción	72
Materiales y Métodos	73
Resultados	77
Discusión	84
Agradecimientos	88
Referencias	88

## Capítulo 5

Discusión General 92

Referencias Generales 102

## INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva en ganado bovino productor de carne está comúnmente limitada por un prolongado anestro posparto (Ciccioli et al., 2003). Se ha establecido que las reservas corporales de energía son un factor determinante para el éxito reproductivo del hato (Bishop et al., 1994), y la evaluación de la condición corporal (CC) es una herramienta de gran utilidad para medir dichas reservas (Hady et al., 1994). En un estudio Richards et al. (1989a) encontraron que el 100% de los animales con CC de  $5.4 \pm 0.2$  (1 emaciada, 9 obesa) tenían actividad lútea indicativa de actividad ovulatoria y que este porcentaje se redujo a 9% cuando los animales perdieron peso y CC (hasta  $2.7 \pm 0.3$ ). De la misma manera, dichos autores mostraron que cuando los animales son sobrealimentados ganan CC y recuperan la ciclicidad. En otro estudio, las novillas en anestro nutricional (CC =  $3.8 \pm 0.1$ ) que se alimentaron para ganar 0.6 ó 1.5 kg/día de peso recuperaron la actividad lútea una vez que ganaron alrededor de  $1.0 \pm 0.2$  puntos de CC (Bossis et al., 2000)

Las reservas corporales de energía y por ende la CC están controladas por la ingesta de nutrientes que tiene el animal. En vaquillas Brahman que perdieron 17% de su peso vivo por restricción alimenticia se inhibieron las ondas de crecimiento folicular y la función del cuerpo lúteo (CL); Además se modificó el patrón de secreción de FSH, LH, progesterona y estradiol (Rhodes et al., 1996). La pérdida de CC ocasionada por restricción alimenticia se relaciona con una disminución en las concentraciones plasmáticas (Richards et al., 1989a) y la frecuencia pulsátil de LH (Bishop et al., 1994). Se ha constatado que la disminución en el consumo de nutrientes y en las reservas de energía corporal ocasionan un bloqueo en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Sin embargo, cuando el animal es realimentado y el consumo de nutrientes es suficiente para satisfacer las necesidades del animal, el funcionamiento del eje reproductivo se restablece (Richards et al., 1989a).

Los mecanismos involucrados en el restablecimiento de la función del eje reproductivo no han sido suficientemente esclarecidos; sin embargo, se ha sugerido que existen señales metabólicas que informan al sistema nervioso central sobre el estado nutricional del animal y que pueden tener efecto sobre el hipotálamo, hipófisis y gónadas (Butler, 2000). Dentro de las moléculas que pueden desempeñar dicha función se encuentran la insulina, IGF-I,

leptina, glucosa y ácidos grasos libres (Adewuyi et al., 2005). Tanto insulina (Crown et al., 2007), como IGF-I (Hiney et al., 1996) y leptina (Spicer, 2001) incrementan la liberación de LH en roedores. Bossis et al. (2000) en novillas de carne en anestro nutricional, encontraron que cuando los animales son realimentados hubo un incremento en las concentraciones séricas de insulina e IGF-I conforme se incrementó el consumo de energía y se acercó la primera ovulación después del anestro. Dos días de ayuno en vacas de carne ocasionan una reducción en los niveles de leptina e insulina, pero cuando se inyecta leptina recombinante los niveles de insulina se normalizan y hay una hiperestimulación en la secreción de LH (Amsteldan et la., 2002). Aunque la disponibilidad de fuentes energéticas (glucosa y ácidos graso libres (AGL)) en sangre podrían ser un buen indicador del estado metabólico del animal para restablecer el proceso reproductivo, Hess et al., (2005) sugirieron que la glucogénesis, más que la acción de glucosa o AGLs *per se*, es más importante para controlar la función reproductiva en el ganado.

La concentraciones de Insulina, leptina e IGF-I se relacionan entre sí y se asocian fuertemente con los cambios en condición corporal. Las novillas que han sido restringidas nutricionalmente para inducirles anestro, pierden CC y hay una reducción en los niveles de insulina, leptina e IGF-I. Cuando los animales ganan peso y condición corporal, las concentraciones de estas hormonas también se incrementan (León et al., 2004). Este fenómeno hace complicado conocer el papel individual de cada una de estas hormonas como mensajeros para informar al sistema nervioso central (SNC) del estado nutricional y el restablecimiento de la actividad ovárica.

Los agonistas de receptores  $\beta$  adrenérgicos ( $A\beta A$ ) son compuestos sintéticos análogos de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), entre los que se encuentran, clenbuterol, ractopamina, salbutamol, cilmaterol, zilpaterol, entre otros. En tejido adiposo, estos compuestos se unen a receptores  $\beta$  adrenérgicos para activar a la lipasa sensible a hormonas y estimular la lipólisis, reduciendo la grasa corporal del animal. En tejido muscular la unión del agonista con su receptor inhibe el catabolismo e incrementa la síntesis de proteína para incrementar la masa muscular. Además, los  $A\beta A$  incrementan la síntesis de lipasa de lipoproteína para captar AGL de la circulación y utilizarlos como fuente de energía

(Mersmann, 1998). En caballos, la reducción de la grasa almacenada en el tejido adiposo por efecto del clenbuterol disminuye las concentraciones séricas de leptina (Kearns et al., 2006). En vacas lactantes, la infusión aguda de clenbuterol no afecta las concentraciones séricas de insulina, mientras que en vacas secas, el clenbuterol incrementa las concentraciones de insulina (Bareille et al., 1997). En novillos el tratamiento agudo con cilmaterol no tuvo efectos sobre las concentraciones séricas de IGF-I (Chikhou et al., 1991).

Por lo anterior, gracias a que los A $\beta$ As reducen la cantidad de grasa corporal, reduciendo las concentraciones séricas de leptina, sin afectar las concentraciones de IGF-I e insulina, su uso de vacas productoras de carne posparto podría ayudar a diferenciar la relación que existe entre la CC y las concentraciones de insulina, leptina e IGF-I y así poder evaluar el papel de cada una de éstas hormonas en el control de la actividad reproductiva en el posparto, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar en vacas productoras de carne durante el posparto, los efectos un A $\beta$ A (zilpaterol) sobre la respuesta a un programa de inducción de estros, así como la asociación de ésta con la CC y las hormonas metabólicas.

## Capítulo 1

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### Núcleos hipotalámicos que controlan la secreción de GnRH

El hipotálamo está localizado a la altura del tercer ventrículo por debajo del tálamo y encima de la hipófisis. Rostralmente se encuentra bordeado por el quiasma óptico y caudalmente por los cuerpos mamilares (Daniel, 1976; Saleem et al., 2007). Anatómicamente y funcionalmente el hipotálamo se encuentra dividido en hipotálamo anterior, tuberal y posterior, así como el área medial y lateral en las que se encuentran diferentes núcleos hipotalámicos (Cuadro 1) (Loes et al., 1991; Saleem et al., 2007). Los núcleos mejor caracterizados son el núcleo supraóptico (SON) y el paraventricular (PVN), los cuales están formados casi totalmente por neuronas largas cuyas terminales nerviosas se encuentran en la hipófisis posterior. Las neuronas en estos núcleos producen principalmente oxitocina y vasopresina (Daniel, 1976). El núcleo preóptico medial (MPO) y el núcleo arcuato (ARC), son las principales estructuras hipotalámicas involucradas en el control de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El MPO se encuentra localizado en el área preóptica y en éste se encuentran los cuerpos celulares de las neuronas productoras de GnRH (Schneider, 2004). En el ARC se encuentran principalmente tres poblaciones de neuronas, las productoras de proopiomelanocortina (POMC), productoras de neuropéptido Y (NPY) (Coll et al., 2007) y neuronas productoras del péptido similar a la galanina (GALP) (Crown et al., 2007). Una cuarta población de neuronas en éste núcleo son las productoras de kisspeptina (Goodman et al., 2007, Gottsch et al., 2004), sin embargo en el núcleo periventricular anteroventral también existe una gran cantidad de neuronas kiss-1 (Gottsch et al., 2004). En roedores se ha mostrado que del 50 al 75% de las proyecciones axónicas de las neuronas productoras de GnRH en el MPO se dirigen hacia la eminencia media (EM) (Smith y Jennes, 2001) donde GnRH es liberada dentro el espacio perivascular de los capilares fenestrados que forman el plexo primario del sistema de circulación portal hipofisario (Jennes y Conn, 1994). Las terminaciones nerviosas de las poblaciones de neuronas en el ARC están en conexión directa o indirecta con la neuronas productoras de

GnRH por lo que pueden ser una vía por la cual se regula la síntesis, secreción y el metabolismo de éste neuropéptido (Crown et al., 2007; Hill et al., 2008; Xu et al., 2009)

Cuadro 1. Localización de los núcleos hipotalámicos respecto a los ejes medial lateral y rostral caudal y núcleos involucrados en el control de la secreción de GnRH \*

<b>Región</b>	<b>Área Medial</b>	<b>Área Lateral</b>
<b>Anterior</b>	<b>Núcleo Preóptico Medial (MPO)*</b> Núcleo Supraóptico (SON) <b>Núcleo periventricular anteroventral (AVPV)*</b> Núcleo Paraventricular (PVN) Núcleo Anterior (AN) Núcleo Supraquiasmático (SPN)	Núcleo Preóptico Lateral (LPN) Núcleo Lateral
<b>Tuberal</b>	Núcleo Dorsomedial (DMN) Núcleo Ventromedial (VMN) <b>Núcleo Arcuato (ARC)*</b>	Núcleo Lateral Núcleo tuberolateral (TLN)
<b>Posterior</b>	Núcleo Mamilar (MN) Núcleo Posterior (PN)	Núcleo Lateral

Modificado de Saleem et al., 2007, Hill et al., 2008

### **Neurotransmisores involucrados en la secreción de GnRH**

Aunque existen una gran cantidad de neurotransmisores involucrados en el control de la secreción GnRH, podemos resumir a cuatro neurotransmisores relacionados con el estatus energético del animal y con las concentraciones de las hormonas metabólicas insulina, IGF-I y leptina.

#### *Neuropéptido Y (NPY)*

El NPY es un péptido de 36 aminoácidos que está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central tanto en humanos como en roedores. Este péptido se expresa en el



hipotálamo, (ARC principalmente), amígdala, hipocampo, núcleo del tracto solitario y corteza cerebral. El NPY interactúa con al menos 6 receptores acoplados a proteína G (Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 y Y6). Las funciones del NPY son muy amplias (Eva *et al.*, 2006). Recientemente se ha sugerido que este péptido es el eslabón que une el estado energético del animal con su función reproductiva (Crown *et al.*, 2007). Los axones de neuronas NPY en el ARC están en contacto tanto con los cuerpos celulares de neuronas GnRH en el MPO, como con sus terminaciones en la eminencia media (Xu *et al.*, 2009), por lo que las neuronas NPY podrían regular tanto las síntesis como las liberación de GnRH. Aunque NPY parece estimular la secreción de LH en animales ciclando (Eva *et al.*, 2006), en general este péptido bloquea el eje gonadotrófico en situaciones de balance negativo de energía (Gamba y Pralong, 2006; Hill *et al.*, 2008). El ayuno por 48 horas en ratones ovariectomizados reduce las concentraciones de LH e incrementa la expresión de NPY aun en presencia de estradiol (Kalamatianos *et al.*, 2008). Recientemente se ha mostrado que la unión de NPY con su receptor Y5 hiperpolariza el potencial de membrana de las neuronas GnRH inhibiendo así la secreción de GnRH (Xu *et al.*, 2009). Además la inhibición del receptor Y5 por el uso de un antagonista, despolariza la membrana de neuronas GnRH (Xu *et al.*, 2009) y elimina el efecto inhibitorio que ejercía el NPY sobre LH (Raposinho *et al.*, 1999). En ratones ob/ob infértiles y con knockout en el receptor Y4, se restablece la fertilidad en machos y parcialmente los ciclos estrales en hembras, además se incrementa la expresión de GnRH (Sainsbury *et al.*, 2002).

### *Proiomelanocortina (POMC)*

El gen de la POMC es transcrito activamente en varios tejidos, incluyendo las neuronas en el ARC. En el sistema nervioso central, POMC es procesada enzimáticamente y da lugar por lo menos a cuatro pequeños péptidos;  $\beta$ -endorfina, hormona estimulante de los melanocitos- $\alpha$ , - $\beta$  y  $\gamma$  (MSH- $\alpha$ , MSH- $\beta$  y MSH- $\gamma$ , respectivamente; Coll *et al.*, 2004). Las terminaciones nerviosas de neuronas POMC en el ARC se proyectan hacia la MPO donde liberan  $\beta$ -endorfina y MSH- $\alpha$ , las cuales están involucradas en el control de GnRH (Hill *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2009). En ratas en ayuno las concentraciones de LH se reducen en comparación con ratas bien alimentadas y esta disminución en LH se asocia a una

reducción en la liberación de GnRH por el hipotálamo. Bajo estas condiciones, también se ha observado una menor concentración basal de MSH- $\alpha$  en el MPO y la región ARC-EM en ratas en ayuno en comparación con las bien alimentadas (Watanobe, 2002). Estudios *in vitro* con neuronas productoras de GnRH inmortalizadas, muestran que tanto MSH- $\alpha$  como MSH- $\gamma$  incrementan la concentración de AMPc y la liberación de GnRH de manera dosis dependiente (Stanley *et al.*, 2003). Además, la infusión de MSH- $\gamma$  directamente en MPO de ratas, incrementa las concentraciones plasmáticas de LH (Stanley *et al.*, 2003). Revisiones de Crown *et al.* (2007) y Hill *et al.* (2008) sugieren que  $\beta$ -endorfina inhibe la secreción de GnRH/LH. En ovejas se ha reportado que  $\beta$ -endorfina está involucrada en la inhibición de la frecuencia pulsátil de GnRH en un medio endocrino dominado por progesterona (P4) (Taylor *et al.*, 2007).

#### *Péptido similar a la Galanina (GALP)*

El GALP es un neuropéptido de 60 aminoácidos originalmente aislado en el hipotálamo de cerdos que es parcialmente homólogo al neurotransmisor orexigénico galanina. Aunque GALP está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central, se encuentra principalmente en el ARC, y la eminencia media en ratas (Man y Lawrence, 2008). El papel de GALP como anclaje entre el estatus energético y la función reproductiva ha sido revisado ampliamente (Gottsch *et al.*, 2004; Kageyama *et al.*, 2005; Crown *et al.*, 2007). Estos reportes han dado a conocer que las neuronas productoras de GALP en el ARC, proyectan sus axones hacia neuronas productoras de GnRH en el MPO y que GALP estimula la secreción de GnRH y el comportamiento sexual tanto en machos como en hembras.

La infusión intracerebroventricular de GALP en ratas ovariectomizadas incrementa la concentración media y la frecuencia pulsátil de LH en presencia de estrógenos, sugiriendo que el efecto de GALP sobre LH es dependiente de estrógenos (Uenoyama *et al.*, 2008). En contraste, ratones hembra y machos knockout para el gen GALP no mostraron diferencias en la concentración de LH respecto a los ratones normales tanto en ayuno como bien alimentados (Dungan-Lemko *et al.*, 2008).

## *Kisspeptina*

La Kisspeptina es un ligando codificado por el gen *kiss-1*, que actúa a través de receptores acoplados a proteína G (GPR54), este ligando se ha sugerido como el principal regulador de la actividad de neuronas productoras de GnRH (Kadokawa *et al.*, 2008). EL *kiss-1* es expresado en el núcleo AVPV y por el ARC, mientras que su receptor GPR54 se expresa en neuronas productoras de GnRH y su mutación ocasiona hipogonadotrofismo e hipogonadismo en humanos y ratones (Hill *et al.*, 2008; Catellano *et al.*, 2009; Clarkson y Herbison, 2009). El tratamiento con kiss-10, un ligando sintético de kisspeptina, en novillas prepúberes, incrementa las concentraciones medias de LH en sangre (Kadokawa *et al.*, 2008). El efecto de kisspeptina, se propone entonces que sea el de estimular la secreción de GnRH (Roseweir y Millar, 2009) o bien que actúe directamente sobre los gonadotrofos productores de LH en la hipófisis (Suzuki *et al.*, 2007).

## **Condición corporal**

### *Evaluación de la condición corporal*

La condición corporal (CC) es un método subjetivo para evaluar la cantidad de energía metabolizable almacenada en el organismo ya sea en forma de tejido adiposo o en tejido muscular (Edmonson *et al.*, 1988). La técnica consiste básicamente en la evaluación visual y por palpación de diferentes zonas del animal y de acuerdo al país y al tipo de ganado existen diferentes escalas. En ganado de carne se usa una escala de 1 a 9 (Warner *et al.*, 1988), en ganado de leche se usa la escala de 1 a 5 en USA e Irlanda (Edmonson *et al.*, 1988) y escala de 1 a 10 en Nueva Zelanda (Schroder *et al.*, 2006; Bewley *et al.*, 2008)

La dinámica de las reservas corporales (movilización o acumulación), ha sido considerada como uno de los principales factores que determinan la eficiencia reproductiva en ganado de carne (Richards *et al.*, 1991). Esta dinámica, está regulada por el consumo de nutrientes y por las necesidades energéticas del animal, si la vaca consume más de lo que necesita,

hay acumulación de glucógeno y tejido adiposo, por el contrario si el animal consume menos de lo que requiere hay movilización de reservas corporales (Drackley et al., 2001). Una buena herramienta para evaluar las reservas corporales es el registro de la condición corporal (CC) (Ciccioli et al., 2003). La CC ha sido usada para evaluar los efectos del estado energético sobre el desempeño reproductivo en el posparto. Las vacas productoras de carne (CC 4 o 5) que reciben una dieta alta en energía durante los primeros 79 días posparto, ganan peso y CC y restablecen la actividad ovárica en menor tiempo que los animales que solo reciben una dieta moderada en energía. Además la tasa de preñez durante el empadre es mayor en el grupo de alto consumo de energía que en el de moderado (Ciccioli et al., 2003). Las vacas en anestro posparto con una  $CC \geq 5$  muestran actividad lútea dentro de los primeros 25 días después que se destetaron a las crías a los 45 días posparto, mientras que animales con menos de 5 puntos en CC tardan 40 días (Bishop et al., 1994). Morrison et al. (1999) muestran que los cambios en CC previos al parto, no afectan la subsecuente función reproductiva, si los animales paren con una CC alrededor de 5.

La inducción de anestro por restricción en el consumo de alimento ha permitido explicar que la pérdida de reservas energéticas (medidas como CC) ocasiona cese de la actividad ovárica por un bloqueo del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. En vacas Hereford no lactando que pierden 1% de su peso cada semana (CC y peso inicial =  $5.4 \pm 0.2$  y  $422 \pm 10$  kg respectivamente), entran en anestro alrededor de las 25 semanas de restricción nutricional cuando pierden en promedio 2.7 puntos de CC. Durante este periodo hay una reducción lineal en las concentraciones circulantes de LH (Richards et al., 1989a). En este mismo experimento se muestra que cuando los animales son realimentados, ganan peso y CC, la actividad lútea se restablece y hay un incremento lineal de las concentraciones de LH. Novillas en anestro por restricción nutricional y alimentadas con una dieta alta en energía (16.2 Mcal EM/día) presentan su primera ovulación después del anestro en un tiempo más corto (57 días) que aquellas alimentadas con una dieta moderada (10.2 Mcal EM/día) en energía (80 días). Los niveles de LH durante el anestro inducido fueron bajos (alrededor del 80%), comparados con los animales ciclando que recibieron una dieta de mantenimiento durante este periodo (Bossis et al., 2000). Estos resultados muestran que la baja disponibilidad de nutrientes (principalmente energía) modifica el funcionamiento del eje

hipotálamo – hipófisis - ovario, por reducir la secreción de LH. Cuando el suministro de energía se incrementa o las necesidades del animal se reducen, la secreción de LH aumenta y se restablece la actividad ovulatoria y la ciclicidad.

Se ha sugerido que existen moléculas que monitorean el estado metabólico del animal para señalar al SNC si se tienen suficientes reservas energéticas para iniciar el proceso reproductivo después de un periodo de anestro. Estas señales metabólicas pueden estimular o inhibir la síntesis o liberación de GnRH para modificar los niveles circulantes de LH (Hess et al., 2005). Dentro de las moléculas metabólicas que pueden controlar la secreción de GnRH se han sugerido a la glucosa, AGLs, cuerpos cetónicos, Insulina, leptina e IGF-I.

### **Hormonas y metabolitos que afectan la eficiencia reproductiva**

#### *Metabolismo de glucosa*

La glucosa es una molécula de 6 átomos de carbono, 12 hidrógenos y 6 oxígenos por lo que se le denomina carbohidrato. Es encontrada en la naturaleza en forma el almidón, celulosa (reino vegetal) y glucógeno (reino animal). El almidón y el glucógeno son polímeros de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$  1-4, mientras que la celulosa es un polímero también de glucosa unidos por enlaces  $\beta$  1-4 (celulosa).

Los cereales, forrajes, pastos y leguminosas son las principales fuentes de glucosa (almidón y celulosa) para los rumiantes. A la entrada de los alimentos al rumen, las bacterias ruminales se adhieren a los diferentes sustratos dependiendo de su especialidad formando el celulosoma. En esta estructura las bacterias secretan sus enzimas digestivas para dejar libre glucosa. La glucosa libre pasa a través de la membrana plasmática de la bacteria para ser metabolizada en la glucolisis y formar piruvato y ATP. El piruvato es usado por la bacteria para producir más ATP y ácidos grasos volátiles (AGVs): acetato (2C), propionato (3C) y butirato (4C). Estos AGVs son absorbidos por la pared ruminal y son llevados por la sangre hacia el hígado y otros tejidos para ser metabolizados.

En el hígado el propionato es el principal precursor gluconeogénico del rumiante, el acetato es el principal precursor de la síntesis de Novo de ácidos grasos y el butirato es convertido en cuerpos cetónicos. Los carbohidratos que escapan de la fermentación ruminal hacia el estómago glandular son digeridos en éste y la glucosa libre es absorbida en el duodeno. La glucosa hepática y la absorbida en el duodeno es usada por los tejidos como fuente de energía. La insulina activa transportadores de glucosa (GLUT4 principalmente) para permitir la entrada de esta molécula a la célula.

En el citoplasma celular la glucosa es fosforilada para entrar a la glucolisis. Los principales productos de la glucolisis son ATP y piruvato. En condiciones anaerobias, el piruvato es convertido en ácido láctico mientras que en presencia de oxígeno es transformado en acetil-CoA. El acetil-CoA entra a la mitocondria para ser metabolizada en el ciclo de Krebs. En el ciclo de Krebs se forman  $\text{NADH}_2$  y  $\text{FADH}_2$  que llevan los hidrogeniones hacia la cadena respiratoria donde se producen la mayor cantidad de ATP (Shimada 2003; Church et al., 1993). El metabolismo de lípidos se discutirá a continuación.

### *Metabolismo de Lípidos*

Los lípidos son encontrados en la naturaleza principalmente en forma de triglicéridos (TG) o glicolípidos (GL). Los TG están formados por una molécula de glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) y tres moléculas de ácidos grasos (R-COO), que pueden variar en cuanto a la longitud y grado de saturación de su cadena hidrocarbonada y que están unidos a cada carbono del glicerol por un enlace éster. Los GL están formados también por una molécula de glicerol, dos ácidos grasos y un carbohidrato unido también al carbono del glicerol (Shimada, 2003). Los ácidos grasos (AG), dependiendo de si tienen o no dobles ligaduras se clasifican en ácidos grasos saturados (que no tienen dobles ligaduras), insaturados (que tiene una doble ligadura) y poliinsaturados (que tiene dos o más dobles ligaduras). En dietas para ganado lechero, la inclusión de grasa no debe exceder el 7% de la base seca (NRC, 2001). Las principales fuentes de lípidos para los rumiantes provienen del concentrado y de los forrajes, aunque se pueden usar suplementos de grasa protegida. El contenido de lípidos en los forrajes es

alrededor del 4 al 6% y son principalmente GL, mientras que el concentrado es la mayor fuente de grasa y se encuentra principalmente en forma de TG (Bauman et al., 2003). Poco después de que animal consume el alimento, los TG y GL contenidos en él son hidrolizados por las lipasas bacterianas en el rumen, dejando libres glicerol y ácidos grasos libres (AGLs). El glicerol es fermentado por las bacterias del rumen para producir propionato principalmente, aunque una parte puede llegar al duodeno sin haber sido metabolizado en el rumen. Los AGLs insaturados y poliinsaturados, son transformados por las bacterias ruminales en ácidos grasos saturados por un proceso conocido como biohidrogenación. (Jenkins, 1993; Bauchart et al., 1996; Bauman et al., 2003). Hecho este proceso, los AGL pasan hacia el duodeno para ser absorbidos.

Además de los AGL de la dieta, al duodeno pueden llegar fosfolípidos de la membrana celular de los microbios ruminales y grasas de sobrepaso que serán digeridas en esta parte del tracto digestivo por las sales biliares y la lipasa pancreática. La mezcla de AG, sales biliares, jugo pancreático y otros lípidos forman pequeñas gotas de grasa denominadas micelas que serán absorbidas a través de las células epiteliales del yeyuno principalmente (Bauman et al., 2003). Los lípidos dentro de las células intestinales, son re-esterificados para formar triglicéridos y son empaquetados en quilomicrones, lipoproteínas (LPL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) dentro del retículo endoplásmico y complejo de Golgi para ser secretadas hacia la circulación general (Bauchart et al., 1996;). Los TG absorbidos por el intestino delgado son transportados en la circulación principalmente por quilomicrones (Vernon y Flint, 1988) hacia los diferentes tejidos del organismo. El músculo, tejido adiposo, glándula mamaria, entre otros, secretan lipasa de lipoproteína (LPL), la cual hidroliza los TG contenidos en los quilomicrones, liberando ácidos grasos.

Los ácidos grasos son usados por la célula para la síntesis de componentes estructurales (fosfolípidos), hormonas (prostaglandinas) y como fuente de energía tanto para uso inmediato como para almacenaje (Vernon y Flint, 1988; Bauchart et al., 1996). En situaciones de balance positivo de energía la mayoría de los AGLs derivados de la dieta son re-esterificados en el hígado y tejido adiposo para ser almacenados en forma de TG. Además de los AGs de la dieta, a partir de acetato el organismo puede sintetizar AGs de

*novo* por la acción de la sintetasa de ácidos grasos (Chilliard et al., 2000). Si el animal está en balance negativo de energía, los TG almacenados en el tejido adiposo son lisados por la acción de la lipasa sensible a hormonas (activada por catecolaminas principalmente) para liberar glicerol y AGLs. El glicerol es transformado en gliceraldehido-3-fosfato para ser usado en la glucolisis y formar formar acetil CoA y posteriormente ATP en el propio tejido adiposo, mientras que los AGLs son liberados a la circulación para ser llevados al hígado y otros tejidos.

En el hígado los AGLs son oxidados en la  $\beta$ -oxidación. En este proceso, los AGLs son cortados en pares de carbonos, formando acetil-CoA. (Vernon y Flint, 1988; Bauchart et al., 1996; Chilliard et al., 2000; Vernos et al., 2005; Jaworski et al., 2007).

#### *Glucosa, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos y reproducción*

Como se ha mencionado la glucosa es un combustible usado por el organismo (Hess et al., 2005). En la glucolisis, la glucosa es convertida en piruvato, generando ATP. El piruvato puede sufrir una descarboxilación oxidativa en la matriz mitocondrial, generando una molécula de CO<sub>2</sub> y un grupo acetil que se une a Coenzima A para formar acetil CoA el cual entra al ciclo de Krebs, en el que donde se produce GTP, NADH y FADH. Estas dos últimas moléculas entran a la cadena respiratoria (fosforilación oxidativa) para producir ATP (Lehninger, 2005). Cuando la producción de energía en la glucolisis no es suficiente para satisfacer las necesidades energéticas del animal, éste usa otros precursores. Por ejemplo en el metabolismo de acetato, hay producción de  $\beta$ -hidroxibutirato el cual puede ser usado por el organismo como fuente de energía. Si la insuficiencia energética continua, el animal incrementa la movilización de tejido adiposo lo que ocasiona un incremento en las concentraciones de AGLs en sangre. Los AGLs pueden ser metabolizados en la  $\beta$ -oxidación para producir ATP, sin embargo en este proceso hay producción de cuerpos cetónicos (como el  $\beta$ -hidroxibutirato) (Hess et al., 2005). La reducción en la disponibilidad de energía con el consecuente incremento de AGLs y  $\beta$ -hidroxibutirato puede ser una señal para el SNC de que no hay suficiente energía para los procesos reproductivos y entonces el animal entra en anestro.



En vacas Hereford que experimentan hipoglucemia inducida tienen una reducción en la concentración media de LH (Rutter y Manns, 1987). En novillas, ratas y hámster la hipoglucemia afecta el ciclo estral mientras, que en ovejas vacas y ratas hay reducción en la secreción de LH (Briski y Sylvester, 1998). En borregas prepúberes, la glucodeprivación por un antagonista de glucosa (2-Deoxi-Glucosa) disminuye la frecuencia pulsátil de LH, sin embargo la administración de GnRH o de un agonista del receptor de glutamato, restablece el patrón de secreción de LH (Bucholtz et al., 1996). En vacas productoras de carne los niveles de glucosa no fueron diferentes entre las que se preñaron y las que no se preñaron después de un programa de inducción de la ciclicidad (Grimard et al., 1997). Aunque estos resultados sugieren que la disponibilidad de glucosa es importante para la reproducción, no hay relación entre las concentraciones de glucosa en plasma y la eficiencia reproductiva en el posparto (Randel, 1990). En vacas primíparas, con o sin actividad lútea, no difieren en los niveles de glucosa durante un empadre de 56 días (Vizcarra et al., 1998). Aunque la CC y el nivel energético de la dieta afectan la respuesta reproductiva en vacas posparto, las concentraciones de glucosa no se ven afectadas por estos dos factores (CC y nivel energético) durante las 7 semanas previas a la primera ovulación posparto (Ciccioli et al., 2003). Debido a que el animal tiende a mantener constantes los niveles de glucosa, se ha sugerido que la gluconeogénesis tiene un mayor efecto sobre la reproducción (Randel, 1990).

Entre el 40 al 70% de las necesidades de glucosa de un rumiante son suministrados por gluconeogénesis a partir de propionato y aminoácidos gluconeogénicos (Yost et al., 1977). La liberación de LH en respuesta a GnRH es mayor dentro de los primeros 40 min después de la aplicación en animales que recibieron una infusión de propionato en comparación con el grupo control (Rutter et al., 1983). Las vacas que en el posparto fueron alimentadas con un ionóforo para incrementar la relación propionato:acetato en el rumen, tuvieron un incremento en el pico de LH en respuesta a estradiol, y el intervalo entre el parto y el primer estro fue menor que el grupo control (Mason y Randel, 1983). Mientras que el uso del ionóforo lasolacida incrementó el número de animales gestantes dentro de los primeros 125 días posparto (Strauch et al., 2003)

En las vacas en balance energético negativo aumentan las concentraciones de AGLs y  $\beta$ -hidroxibutirato. Los AGLs son un buen indicador de balance energético, sin embargo no hay una relación directa entre los niveles de LH y las concentraciones de AGLs. La infusión de AGLs no altera la secreción de LH, pero como en esta situación dejan de ser producidos por lipólisis dentro del organismo, pueden no estar representado el estado metabólico real del animal (Hess et al., 2005). Las vacas que no quedan gestantes después de la sincronización tiene niveles altos de AGLs en comparación con los animales que si se gestaron (Grimard et al., 1997). Finalmente, el cerebro y el músculo de los rumiantes pueden usar cuerpos cetónicos como fuente de energía, independientemente del estatus nutricional (Kammula, 1976). Sin embargo no hay relación entre los cuerpos cetónicos y la secreción de LH (Hess et al., 2005), por lo que los cuerpos cetónicos pueden no ser los mediadores entre el estatus energético y la función reproductiva del animal.

## **Insulina**

### *Estructura y mecanismo de acción*

La insulina es una hormona polipeptídica compuesta de 51 aa. Esta hormona es producida en las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas, se produce como una prohormona. La proinsulina está compuesta de una cadena peptídica ácida (A) y una básica (B) ancladas por un péptido llamado péptido C. La insulina es formada por la eliminación del péptido C y la unión de las dos cadenas por un puente disulfuro. De esta forma la insulina es almacenada en gránulos secretores hasta que un estímulo ocasione su liberación (Hadley, 1996).

El receptor de insulina es un receptor tirosina cinasa que tiene alrededor de 85% de homología con el receptor de IGF-I. El receptor de insulina consta de dos cadenas  $\alpha$  en la región extracelular y dos cadenas  $\beta$  intracelulares, en las que se encuentra el dominio tirosina cinasa (Corcoran et al 2007). La unión de insulina en la subunidad  $\alpha$  del receptor

ocasiona autofosforilación del dominio tirosina cinasa presente en las subunidades  $\beta$ . Esto coincide con la internalización del receptor, que es uno de los mecanismos por los cuales se regula la acción de la insulina (Hayirli, 2006). La activación del dominio tirosina cinasa del receptor de insulina fosforila a los substratos del receptor de insulina (IRS-1 y IRS-2 principalmente) y proteínas adaptadoras Shc. Después de la fosforilación del receptor, la proteína Grb2 se une tanto a IRS-I y a Shc para facilitar la activación de complejo *ras* y la cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos. Estos eventos estimulan la proliferación celular y la expresión de genes. El IRS-I y IRS-2 (en menor proporción), reclutan a Src (proteínas con dominios homólogos tipo 2) y la subunidad reguladora p85 del fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) para activarlo. La PI3K fosforila a fosfatidilinositol-difosfato para convertirlo en inositol-trifosfato (IP3) que activa proteínas cinasas dependientes de IP3, tales como proteína cinasa C (PKC) y proteína cinasa B (PKB). La PKC estimula la translocación hacia la membrana plasmática del transportador de glucosa-4 (GLUT4) para estimular la captación de glucosa, mientras que PKB entra al núcleo para estimular la transcripción de genes y con ello la síntesis de proteína y puede fosforilar la sintetasa de glucógeno para promover la síntesis de glucógeno. Finalmente, la activación de PI3K está asociada con la activación de la lipogénesis en respuesta a insulina (Hayirli, 2006; Corcoran et al 2007; Gerozissis, 2008)

El incremento en el consumo de nutrientes, el glucagon, y la estimulación parasimpática estimulan la síntesis y secreción de insulina, en tanto que el ayuno, el hambre, el ejercicio, la galanina, la somatostatina, los estímulos simpáticos, la IL-6 y la PGF2- $\alpha$  pueden inhibir su síntesis y secreción (Hayirli, 2006).

### *Insulina y Reproducción*

Los niveles de insulina son muy variables durante el día, sin embargo la cantidad de insulina circulante esta en proporción directa a la cantidad de tejido adiposo (Crown et al., 2007; León et al., 2004). La infusión central de insulina en ovejas estimula la secreción de LH (Miller et al., 1995). Las ovejas a las que se les incrementa el suministro de nutrientes, muestran una correlación positiva (0.73) entre las concentraciones de LH e insulina, sin

embargo esta relación se pierde en ovejas a las que se les restringe el alimento (Miller et al., 2007). El suministro de nutrientes en vacas de carne que habían entrado en anestro por restricción nutricional, provoca un incremento lineal de los niveles de insulina y los animales recuperan la actividad ovárica (Richards et al., 1989b). En novillas de han reportado resultados similares (León et al., 2004). Sinclair et al. (2002) encontraron que los animales con más de 8 U/L de insulina, tienden a tener un intervalo parto a primer estro mas corto que los animales con menos concentración. En vacas lecheras parece haber un efecto similar (Gong et al. 2002; Gutiérrez et al., 2006). En contraste, Bossis et al. (2000) no encontraron relación entre los niveles de insulina y la primera ovulación después del anestro nutricional en novillas. En vacas de carne, los niveles de insulina no fueron diferentes entre animales con actividad lútea y sin actividad lútea en un empadre de 60 días (Vizcarra et al., 1998).

La insulina puede afectar la secreción de GnRH, sin embargo, in vivo no se ha demostrado la presencia del receptor de insulina en neuronas que producen GnRH (Hill et al., 2008). La única evidencia existente de que las neuronas GnRH responden a insulina proviene de un estudio en neuronas productoras de GnRH inmortalizadas *in vitro*. En ese estudio se encontró que la insulina puede activar estas neuronas a través de la vía MAPK (Kim et al., 2005; Salvi et al., 2006). Sin embargo, aunque estos resultados sugieren un efecto directo de la insulina sobre las neuronas GnRH, es posible que esta hormona regule al GnRH indirectamente por actuar sobre otros núcleos hipotalámicos.

El ARC es un sitio importante de regulación de las neuronas GnRH ya que los axones de algunas neuronas en este núcleo inervan directamente los somas de neuronas en el MPO. Las neuronas NPY y POMC (Hill et al., 2008) en el ARC tienen receptores para insulina. En ratas lactando hay un incremento en la expresión de RNAm de NPY y una reducción de RNAm de POMC en el ARC, sin embargo, el tratamiento con insulina invierte el patrón de expresión de estos dos neurotransmisores (Xu et al. 2009). Yang et al., (2010) demostraron que la insulina regula canales de conductancia  $Ca^{+2}$  activados por canales de  $K^{+}$  en neuronas NPY del ARC. El efecto de insulina sobre estos canales es vía PI3K y puede ser el mecanismo por el cual esta hormona regula la síntesis de NPY. En ratones que no

expresaban receptor de insulina en neuronas POMC exclusivamente no se afectó el fenotipo metabólico y reproductivo (Konner et al., 2007). Por otro lado, el ayuno de 48 horas en ratas reduce la expresión de RNAm de GALP, sin embargo la infusión intracerebroventricular de insulina incrementa el RNAm para este neuropéptido (Fraley et al., 2004). Aunque la insulina parece regular GALP, el receptor de esta hormona no ha sido encontrado en neuronas GALP, que en cambio si tienen receptores para NPY (Gottsch et al., 2004). Si consideramos que el NPY afecta a GALP de la misma forma que al GnRH, es posible que la reducción de NPY ocasionada por insulina también reduzca el efecto inhibitorio de NPY sobre GALP, incrementando así su expresión. En ratas macho diabéticas con hipogonadismo, la insulina no afecta las concentraciones del RNAm para kiss-1 (Castellano et al., 2006).

Además de afectar la reproducción a nivel central, la insulina también ha mostrado tener efectos sobre la función del ovario. En células de la granulosa en cultivo la adición de insulina (10 ng/mL) promueve la proliferación celular y la producción de estradiol independiente del tamaño del folículo de donde se obtuvieron las células (Gutiérrez et al., 1997). Resultados similares han sido mostrados en cultivos de folículos preantrales (Itoh et al., 2002). Por otro lado, estudios *in vivo* en vacas lecheras y novillas de carne, han mostrado que la infusión de insulina incrementa el diámetro folicular (Simpson et al., 1994; Butler et al., 2004). Aunque la expresión del receptor para insulina en células foliculares es mayor en folículos preovulatorios que en folículos pequeños la concentraciones de insulina en líquido folicular no difieren entre el tipo de folículo (Shimizu et al., 2008).

## **IGF-I**

### *Sistema IGF y mecanismo de acción*

El IGF-I es un polipéptido básico de 70 aminoácidos (Trojan et al., 2007) que junto con IGF-II, dos receptores de IGF, varias proteínas de unión a IGF (IGFBP) y varias proteasas de IGFBP, regula el crecimiento somático, la proliferación celular y la apoptosis. El IGF-I tiene importantes efectos sobre el metabolismo de la glucosa en conjunto con la insulina

(Sandhu et al., 2002). La hormona del crecimiento es el principal estimulador de la producción de IGF-I, que se produce principalmente en el hígado, aunque puede también ser producido por la mayoría de los tejidos del organismo en respuesta a GH y a otros factores tales como la insulina y el incremento del consumo de nutrientes (Le Roith, 2003; Werner et al., 2008). En casi todas las especies las concentraciones de IGF-I en sangre se reducen cuando se suprime el aporte de energía o proteína en la dieta (Tissen et al., 1994).

Los efectos biológicos del IGF-I están controlados principalmente por la unión de este factor a su receptor I (IGFR-I), aunque también se puede unir al receptor de insulina y al receptor relacionado con insulina. IGFR-I es miembro de la superfamilia de receptores unidos a proteínas cinasas. El receptor es un tetrámero formado por dos subunidades  $\alpha$  localizadas hacia el espacio extracelular y que constituyen el sitio de unión al ligando y dos subunidades  $\beta$  en las que se encuentra el dominio cinasa en el interior de la célula (Adams et al., 2000). La unión del ligando con el receptor ocasiona un cambio conformacional del receptor que permite la unión de ATP y la fosforilación del dominio tirosina cinasa del receptor. Esta fosforilación aumenta la actividad cinasa del receptor para que pueda fosforilar una serie de sustratos citoplasmáticos que en conjunto se llaman “mediadores de traducción de la señal hacia abajo” (Wernet et al., 2008). Dentro de los mediadores que se activan en respuesta al IGF-I se encuentran, MAPK, IP3K/PKC y el bloqueo de la enzima sintetasa de glucógeno. La activación de estos mediadores activa la mitosis de la célula (vía MAPK), inhibe la apoptosis (por que IP3K inhibe las caspasas, BAD e incrementa la expresión de bcl-2) y debido al incremento en la actividad cinasa dentro de la célula. El IGF-I puede activar transportadores de glucosa y aminoácidos, estimular la síntesis de proteína mediante la activación de factores de transcripción e inhibir la gluconeogénesis (Le Roith, 2003; Trojan et al., 2007; Werner et al., 2008). La biodisponibilidad de IGF-I está regulada por al menos 6 proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs). La IGFBP3 es la proteína de mayor peso molecular y es la predominante en el suero. La unión de esta proteína con IGF-I evita su proteólisis, incrementando su vida media (Baxter, 2000). En general las IGFBPs inhiben los efectos metabólicos y proliferativos de IGF-I, aunque algunas de ellas pueden desencadenar efectos similares a los de IGF-I (Werner et al., 2008).

### *IGF-I y reproducción*

Schillo (1992) sugiere que las concentraciones de IGF-I pueden estar inversamente relacionadas con la duración del anestro posparto. En ganado de carne se ha encontrado un incremento gradual en las concentraciones medias de IGF-I desde 8 días antes de la primera ovulación posparto (Stagg et al., 1998). Por otro lado tanto a las dos como a las diez semanas posparto, las concentraciones de IGF-I son mayores en vacas que están ciclando que en vacas en anestro. Además la abundancia relativa de IGFBP-2 en suero fue menor en las vacas ciclando que en las no ciclando (Roberts et al., 1997). En ganado lechero se han observado resultados similares. (Kawashima et al., 2007). En vacas y novillas la restricción alimenticia reduce los niveles de IGF-I. En vacas esta reducción está asociada con la reducción en las concentraciones de LH (Richards et al., 1991) y en novillas la realimentación incrementa los niveles de IGF-I (León et al., 2004) asociados con la primera ovulación después del anestro (Bossis et al., 2002).

La presencia del IGFR-I en el hipotálamo (eminencia media principalmente) e hipófisis (Bach y Bondy, 1992; Daftary y Gore, 2005), sugiere un efecto directo del IGF-I sobre la secreción de GnRH y LH. El IGF-I es necesario para desencadenar los efectos de retroalimentación positiva del estradiol sobre LH (Etgen et al., 2006). En cultivo de neuronas que expresan GnRH hay un incremento en la síntesis del mensajero de GnRH en respuesta a 10 ng/mL de IGF-I (Daftary y Gore, 2005), lo que sugiere que este factor de crecimiento puede incrementar la síntesis de GnRH por neuronas que producen GnRH. También se ha mostrado que el IGF-I puede incrementar la liberación de GnRH por la eminencia media del hipotálamo (Ojeda et al., 2008). Aunque el IGF-I es expresado en astrocitos y neuronas productoras de GnRH, la mayor proporción de este factor en la EM durante la pubertad o durante los ciclos estrales proviene de la circulación (Ojeda et al., 2008). La inactivación del IGFR-I en ratas adultas, resulta en inactivación de la plasticidad sináptica del hipotálamo (Fernández-Galaz et al., 1999). En ratas el IGF-I actúa sobre la eminencia media para estimular la liberación de GnRH de manera dosis dependiente (Hiney et al., 1991). En ratas cercanas a la pubertad, la administración intraventricular de pequeñas dosis de IGF-I incrementa la secreción de LH. Además en el proestro tardío se

incrementan los niveles séricos de IGF-I y la expresión de IGFR-I en la eminencia media (Hiney et al., 1996).

Al igual que la insulina, el IGF-I ha mostrado tener efectos sobre la sobrevivencia, proliferación y esteroidogénesis de las células foliculares. En ratones nulos para el gen de *igf1*, se ha observado que el desarrollo folicular se detiene entre folículo antral temprano y antral tardío. Se sabe también que el IGF se suma al efecto de FSH para promover la producción de estradiol en las células de la granulosa (Rivera y Fortune 2003). En cultivos de células de la granulosa la adición de 30 ng de IGF-I en presencia del factor de necrosis tumoral alfa reduce la apoptosis de las células (Greenaway et al., 2004). Las proteínas de unión a IGF, así como las proteasas que degradan a las proteínas unidoras, son las que se encargan de regular la bioactividad del IGF I y han sido involucradas en los efectos de este factor de crecimiento sobre el desarrollo folicular. En folículos dominantes de bovinos colectados los días 1.5, 2.5 y 4 de iniciada la ola de crecimiento folicular no existe efecto del tamaño del folículo (<7, 8 y  $\geq$ 9 mm) sobre la expresión de IGFBP-4, y IGFBP-5. Sin embargo, la degradación de estas proteínas se incrementa conforme avanza el tamaño del folículo. Este efecto de degradación es significativamente mayor para IGFBP-5 en folículos de más de 9 mm ( $P < 0.05$ ) en comparación con los folículos <7mm y los de 8 mm, mientras que no hay diferencia entre los dos últimos. El incremento en la proteólisis de las proteínas de unión coincide con un incremento en el IGF-I libre en el líquido folicular (Rivera y Fortune 2003). Estos resultados han sugerido que el incremento de IGF-I libre durante la selección del folículo dominante es producto más de un incremento en la degradación de IGFBPs (4 y 5 principalmente) que de una reducción en la expresión de éstas. La degradación de IGFBP-4 e IGFBP-5 está mediada por la proteína plasmática A asociada a la gestación (PAPP-A) que se encuentra en el líquido folicular. (Rivera y Fortune 2003). Por otro lado IGF-I puede incrementar la respuesta folicular a LH y FSH (Beg and Ginther, 2006). En cultivo de células de la teca la adición de 10 o 100 ng/mL de IGF-I incrementa la cantidad de hCG marcada con I125 que se une a dichas células (Stewart et al., 1995). En células de la teca intersticiales de ovarios de ratón, el IGF-I también incrementa los sitios de unión y el RNAm del receptor a LH (Magoffin y Weitsman, 1994). Resultados similares se han mostrado en células de la granulosa (Adashi et al., 1985).



## **Leptina**

### *Mecanismo de acción*

La leptina es una hormona producida por el gen *ob* en el tejido adiposo (Zhang et al., 1994), es una hormona polipeptídica de 167 aa y su secreción por el tejido adiposo está en directa proporción a la masa grasa, el estatus nutricional y la localización del tejido. En bovinos al parecer no hay diferencia en expresión de RNAm de leptina respecto a la localización de tejido adiposo (TA), sin embargo algunos reportes indican que en el TA perirenal hay mayor expresión de leptina que en TA abdominal, subcutáneo e intermuscular (Chilliard et al., 2001, Chilliard et al., 2005).

El receptor de leptina (Ob-R) es una glicoproteína con un solo dominio transmembranal que pertenece a la familia de receptores de unión a citocinas. Existen seis isoformas del receptor de leptina derivadas por procesamiento del RNAm de un solo gen, pero solo la isoforma larga (Ob-Rb =1162 aa) es la encargada de la traducción de la señal celular en respuesta a leptina. Las 6 isoformas del LR poseen el mismo dominio de unión al ligando pero difieren en la longitud del dominio intracelular. De las cinco isoformas cortas, Ob-Ra (984 aa) y Ob-Rc (892 aa) son las encargadas del transporte de leptina a través de la barrera hemato-encefálica, mientras que la isoforma Ob-Re (805 aa) es una proteína de unión de leptina. De las isoformas Ob-Rd (901 aa) y Ob-Rf (896 aa) no se ha determinado su función (Leifers et al., 2005; Zieba et al., 2005). El dominio intracelular de Ob-Rb contiene aproximadamente 300 aa con varios sitios de acoplamiento para proteínas esenciales en la transducción de la señal. Por su parte los dominios intracelulares de las isoformas cortas solo tienen entre 30 a 40 aa y no tienen estos sitios de acoplamiento (Robertson et al., 2008).

Ob-Rb no tiene actividad enzimática intrínseca y debe asociarse a janus cinasa 2 (JAK2) para que se pueda transducir la señal. Ob-Rb tiene dos sitios ricos en prolina (Box1 y Box2) que median la unión con JAK2. La unión de leptina al receptor estimula la autofosforilación de JAK2 en dos residuos tirosina. JAK2 fosforilado, pega grupos fosfato

a Ob-Rb en tres residuos de tirosina altamente conservados. Los residuos tirosina 1077 y 1138 fosforilados anclan a proteínas transductoras de la señal y activadores de transcripción (STAT3 y STAT5) para activarlas por una fosforilación. La fosforilación del residuo tirosina 985 recluta a SHP2 (dominio SH2 con actividad fosfatasa 2) y SOCS-3 (supresor de la señal de citocinas-3). SHP2 activa a las cinasas reguladoras de señales extracelulares (ERK) o MAPK, mientras que SOCS-3 bloquea la traducción de la señal por Ob-Rb. Ob-Rb puede activar IP3K, lo cual puede estar mediado por proteínas IRS o por acción directa de JAK2 sobre SH2B1 (Zieba et al., 2005 y Robertson et al., 2008).

### *Leptina y Metabolismo*

Los efectos de la leptina sobre el metabolismo han sido revisados ampliamente (Friedman y Halaas, 1998; Coll et al., 2007). Los ratones que no tienen el gen ob/ob y/o a los que les falta el receptor Ob-Rb (db/db) son obesos, e infértiles. La administración de leptina exógena en ratones ob/ob revierte estos efectos pero no en ratones db/db. LA leptina regula el consumo de alimento y el gasto energético a nivel hipotalámico. El Ob-Rb se expresa en el núcleo arcuato donde puede reducir la expresión de NPY (orexigénico) o incrementar la expresión de POMC (anorexigénico) para disminuir el consumo de alimento e incrementar el gasto energético. Se ha sugerido que la regulación del SNC sobre el metabolismo periférico es mediada por leptina. Un incremento en la leptina estimula la oxidación de ácidos grasos y reduce la masa de tejido adiposo, mientras que las deficiencias en leptina están asociadas con la deposición de grasa. En relación con el metabolismo de glucosa, la leptina reduce la hiperglicemia e hiperinsulinemia en ratones ob/ob. Además, el tratamiento de animales magros con leptina reduce las concentraciones séricas de glucosa sin cambiar los niveles de insulina e incrementa el uso de glucosa (Friedman y Halaas, 1998; Coll et al., 2007). En roedores, la leptina reduce la secreción de insulina y glucocorticoides, mientras que estimula la de GH, catecolaminas y hormonas tiroideas; estimulando la lipólisis y reduciendo la lipogénesis en el hígado (Havel, 2004; Chilliard et al., 2005). En rumiantes, la insulina y los glucocorticoides estimulan la secreción de leptina por el tejido adiposo, mientras que la estimulación beta-adrenérgica, la reduce (Chilliard et al., 2001).

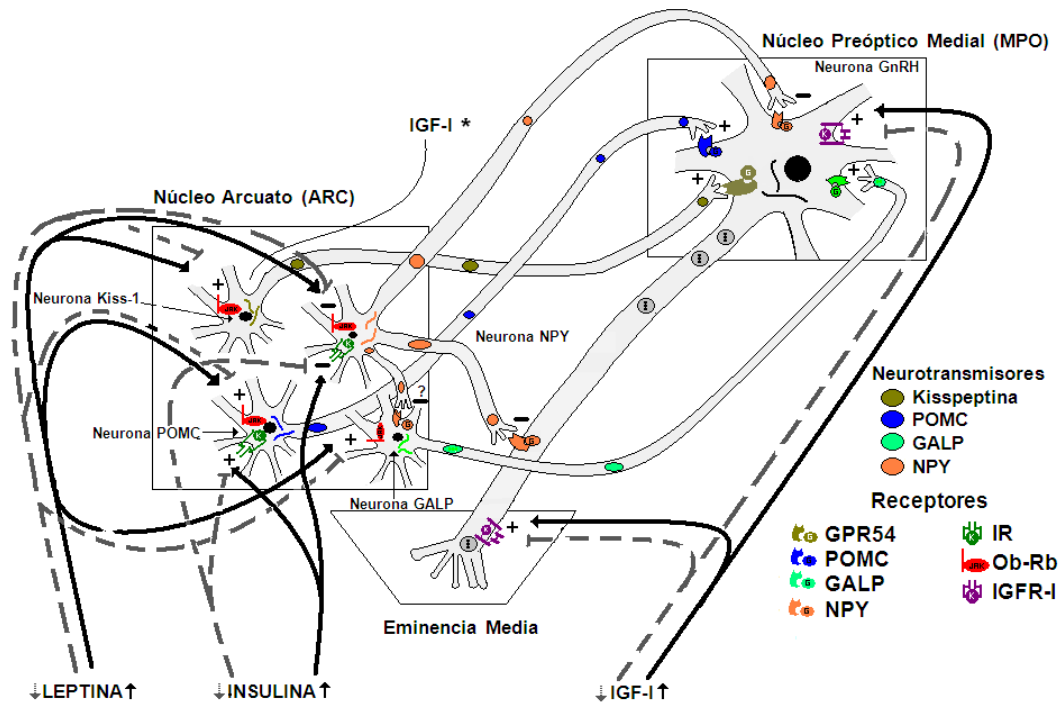
## *Leptina y Reproducción*

En relación con la reproducción, la leptina incrementa la liberación de GnRH por el hipotálamo (Amsteldan et al., 2002). A nivel ovárico esta hormona puede reducir la esteroidogénesis (Spicer, 2001). En novillas de carne, la restricción nutricional reduce las concentraciones de leptina y cuando los animales son realimentados los niveles de la hormona se incrementan (León et al., 2004). Las vacas con dos días de ayuno experimentan una reducción en las concentraciones de insulina y leptina, pero la infusión de leptina recombinante normaliza los niveles de insulina y ocasiona una hiperestimulación en la secreción de LH (Amstalden et al., 2002). En novillas el ayuno reduce las concentraciones de leptina, insulina e IGF-I, así como la frecuencia pulsátil de LH (Amstalden et al., 2000). Las vacas Brahmán multíparas con un anestro posparto corto ( $\leq 37$  días) tienen concentraciones de leptina mayores durante las primeras 6 semanas posparto que vacas con intervalo de anestro posparto largo ( $\geq 78$  días). De la misma manera hay una correlación negativa entre la duración del anestro y las concentraciones de leptina antes del parto, al parto y después del parto (Strauch et al., 2003).

Aunque la leptina claramente regula GnRH, no se ha demostrado la presencia de Ob-Rb en neuronas GnRH, pero como mencionamos anteriormente el Ob-Rb se expresa en el ARC donde modifica la expresión de NPY y POMC (Friedman y Halaas, 1998; Schneider, 2004; Coll et al., 2007). Al igual que insulina, la infusión de leptina en ratas lactando reduce la expresión de NPY e incrementa POMC (Xu et al., 2009). La infusión de leptina después de 48 horas de ayuno en ratas, incrementa cerca de 4 veces la expresión del mensajero GALP (Juréus et al., 2000). De la misma forma en ratones ob/ob o diabéticos la expresión de GALP es reducida en comparación con el control y el fenómeno puede ser revertido con la infusión de leptina (Cunninham, 2004; Gottsch et al., 2004). La leptina parece ser el principal regulador de kisspeptina bajo condiciones de estrés nutricional. Hill et al. (2008) reportan que la leptina incrementa la expresión del kiss-1 en neuronas del ARC, mientras que Castellano et al (2009) señalan que existen al menos tres líneas de evidencia que muestran que leptina regula kiss-1; 1) Tanto en ratones con gonadectomía como intactos que no expresan de leptina (ob/ob), la expresión de RNAm de kiss-1 se reduce

significativamente y en ambos casos la infusión de leptina revierte el efecto, II) En modelos de diabetes donde hay hipoleptinemia e hipoinsulinemia, la infusión crónica de leptina pero no de insulina normaliza los niveles de kiss-1 en el hipotálamo, III) Estudios in vitro con neuronas kiss-1 de murino, muestran que la leptina es capaz de incrementar la expresión de RNAm de kiss-1 (Castellano et al., 2009).

En resumen bajo condiciones de estrés nutricional la reducción periférica de insulina, IGF-I y leptina está asociada con la reducción en la secreción de GnRH. En condiciones de bajo consumo de energía o bajas reservas energéticas, las concentraciones de IGF-I son bajas y tienen bajo impacto sobre la secreción de kiss-I y GnRH. De manera similar la reducción de insulina y leptina permiten un incremento en NPY y una reducción de POMC y GALP lo que ocasiona inhibición de la secreción de GnRH. Además la reducción de leptina reduce kiss-1 y por lo tanto su efecto estimulante sobre neuronas GnRH. En contraste cuando el balance de energía es positivo, IGF-I se incrementan para estimular directamente la síntesis y secreción de GnRH y kiss-1. Mientras que el incremento de insulina y leptina reducen NPY, e incrementan POMC, GALP y kiss-1 (solo leptina) para restablecer el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (figura 1)



+,- = Efecto estimulante o inhibitorios de la hormona sobre la síntesis o liberación del neurotransmisor,  $\downarrow\uparrow$  = bajas o altas concentraciones periféricas de insulina, IGF-I y leptina, \* = no se ha reportado el receptor de IGF-I en neuronas kiss-1 pero IGF-I incrementa la síntesis de kiss-1, Línea punteada = Bajas concentraciones de insulina, IGF-I y leptina que no pueden ejercer su efecto sobre neuronas que tienen su receptor, Línea continua = Cuando el balance de energía es positivo, las concentraciones de insulina, IGF-I y leptina se incrementan y pueden entonces afectar a las neuronas que tienen su receptor, POMC = Propiomelanocortina, GALP = Péptido similar a la galanina, NPY = Neuropeptido Y, GPR54 = Receptor de kisseptina, IR = Receptor de insulina, Ob-Rb = Receptor de Leptina, IGFR-I = Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)

## **Sistema Adrenérgico de neurotransmisión**

El sistema adrenérgico de neurotransmisión está compuesto por dos neurotransmisores muy similares denominados catecolaminas (adrenalina o epinefrina y la noradrenalina o norepinefrina) y al menos 10 receptores de la familia de receptores unidos a proteína G (Kuhat et al., 2006). La noradrenalina y la adrenalina son sintetizadas a partir de tirosina de la siguiente manera: 1) a la L-Tirosina se le pega un grupo hidroxilo para ser convertida en L-Dopamina por la acción de la hidroxilasa de tirosina, 2) La L-Dopamina se descarboxila y se transforma en dopamina, este proceso es llevado a cabo por la enzima DOPA-descarboxilasa, 3) La dopamina recibe otro grupo hidroxilo por la acción de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa para convertirse en noradrenalina, 4) Finalmente, la noradrenalina es convertida en adrenalina por la acción de la feniletanolamina-metil transferasa, la cual le pega un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) (Cooper et al., 2003; Kuhat et al., 2006). La Tirosina hidroxilasa es un paso limitante dentro de la síntesis de catecolaminas, puesto que la inhibición de esta enzima reduce marcadamente la noradrenalina y la dopamina endógena. Por su parte la feniletanolamina-metil transferasa es sintetizada solo por la médula adrenal, razón que podría explicar que la noradrenalina sea el neurotransmisor más usado por el SNC y la adrenalina se usada como hormona en la periferia (Cooper et al., 2003; Chakroborty et al., 2009).

Al igual que la mayoría de las moléculas de secreción, las catecolaminas se almacenan en gránulos secretores en espera del estímulo adecuado para ser liberadas por exocitosis hacia la terminal sináptica (en el caso de células nerviosas) o al torrente sanguíneo (en caso de células de la medula adrenal). La estimulación  $\beta$ 2 adrenérgica, colinérgica y la angiotensina estimulan la liberación de catecolaminas por incrementar la producción de AMPc y entrada de Ca<sup>++</sup> a la célula. Por otro lado, la inhibición de adenilato ciclasa, reducción de Ca<sup>++</sup> intracelular e hiperpolarización de la neurona por efecto de estimulación  $\alpha$ 2 adrenérgica, receptores muscarínicos, opioides y dopamina, inhiben la liberación de catecolaminas. La eliminación de catecolaminas del organismo se lleva a cabo principalmente por dos enzimas, la monoaminoxidasa (MAO) que transforma la catecolamina en su aldehído correspondiente y la catecol-O- metil transferasa (Cooper et al., 2003).

Los efectos biológicos de la adrenalina y noradrenalina son mediados por 10 subtipos de receptores de membrana de 7 dominios unidos a proteína G. Los receptores  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1C$  y  $\alpha 1D$ , están unidos a Gq, y la unión del ligando activa la fosfolipasa C, la cual rompe el fosfatidil inositol en diacilglicerol e inositol trifosfatos (IP3), que funcionan como segundos mensajeros dentro de la célula. La proteína cinasa C se une al diacilglicerol y  $Ca^{++}$  para volverse activa y modificar el metabolismo celular, mientras que IP3 migra al retículo endoplasmico para liberar  $Ca^{++}$  (Alberts, 2003). Los receptores  $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2B$  y  $\alpha 2C$ , están unidos a proteína Gi y la unión de la catecolamina, bloquea la acción de la adenilato ciclasa. Finalmente los receptores  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$  están unidos a Gs y estimula la producción de AMPc por activar la adenilato ciclasa y por tanto incrementan la actividad de la proteína cinasa A (Alberts, 2003; Kuhat et al., 2006).

La afinidad de adrenalina y noradrenalina por receptores  $\beta$  es diferente. Por ejemplo, sobre  $\beta 1$  y  $\beta 3$  la noradrenalina se une con mayor afinidad que la adrenalina, pero sobre  $\beta 2$  adrenalina se une con mayor afinidad que noradrenalina. La exposición prolongada a estimulación adrenérgica ocasiona una desensibilización de receptores, la cual puede ocurrir por desactivación de la adenilato ciclasa o por reducción del número de receptores. La desactivación de adenilato ciclasa ocurre por la acción de una cinasa de  $\beta AR$  que fosforila el receptor Gi y la reducción del número de receptores se da por acción de la  $\beta$  arrestina, la cual introduce el  $\beta AR$  hacia la célula para ser degradado (Cooper et al., 2003).

### **Agonistas de receptores $\beta$ adrenérgicos**

Los agonistas de receptores  $\beta$  adrenérgicos ( $A\beta A$ ) son compuestos sintéticos análogos a la adrenalina y la noradrenalina. Estos se unen a un receptor transmembranal de siete dominios unido a proteína Gs y promueven la síntesis de adenosin monofosfato cíclico (AMPc). Dos moléculas de AMPc se unen a la unidad inhibitoria de la proteína cinasa A y liberan a la unidad catalítica de esta proteína, la cual a su vez fosforila otras proteínas para desencadenar la respuesta celular (Alberts, 2003). En tejido adiposo la activación de proteína cinasa A por los  $A\beta A$ , activa la lipasa sensible a hormona, la cual inicia el

rompimiento de triglicéridos en glicerol y ácidos grasos (Jaworski et al., 2007). En tejido muscular la unión del A $\beta$ A con su receptor incrementa la tasa de síntesis de proteína y disminuye la degradación de proteína (Mersmann, 1998).

Los A $\beta$ A han sido utilizados en producción animal como repartidores de nutrientes y han mostrado mejorar la ganancia de peso, aumentar la movilización de tejido adiposo (Mersmann, 1998) y el consumo de materia seca (Bareille et al., 1997). Estos compuestos tienen efectos sobre los principales metabolitos que regulan los procesos reproductivos en bovinos (Mersmann, 1998). El clenbuterol, un A $\beta$ A, ha mostrado incrementar los niveles de insulina en sangre en vacas lecheras tratadas con este compuesto durante la lactancia y el periodo seco, sin afectar los niveles de GH (Bareille et al., 1997). En caballos (McManus y Fitzgerald, 2003; Kearns et al., 2006) y ratas (Moreno et al., 2002) los A $\beta$ A reducen los niveles de leptina, mientras que en humanos un A $\beta$ A específico del receptor 3 no ocasiona cambios significativos en los niveles séricos de insulina y leptina (Larsen et al., 2002). En relación con los efectos de los A $\beta$ A sobre el IGF-I, las concentraciones de este factor de crecimiento no se ven afectadas con tratamientos agudos con estos compuestos (Chikhou et al., 1991).

Los cambios que ocasionan los A $\beta$ A sobre los metabolitos mencionados pueden tener efectos sobre los procesos reproductivos de bovinos y también una acción directa sobre las estructuras ováricas. En el CL de bovino la presencia de receptores adrenérgicos  $\beta$  es mayor en el día 4 del ciclo y decrece gradualmente para los días 8, 12 y 16. Además la administración de noradrenalina en novillas estimula la producción de progesterona sugiriendo la importancia de la estimulación  $\beta$  adrenérgica para el funcionamiento del CL (Pesta et al., 1994). En cultivo de ovarios de rata el isoproterenol (A $\beta$ A) incrementa los niveles de RNAm para el citocromo P450aromatasa y para el receptor de FSH dentro de las ocho horas de tratamiento (Mayerhofer et al., 1997). Aunque estas evidencias sugieren que la estimulación adrenérgica es necesaria para la función normal del ovario, en ratones el estímulo del ovario por parte del sistema nervioso simpático incrementa la actividad esteroidogénica del folículo e induce una condición similar al síndrome poliquístico ovárico del humano (Barria et al., 1993). Por otra parte en quistes foliculares de vacas hay un



incremento en la estimulación beta adrenérgica y en cultivo de folículos preovulatorios la adición de isoproterenol incrementa la liberación de testosterona, lo cual se asocia a la formación de quistes foliculares (Paredes et al., 2011).

## Capítulo 2

Baja respuesta a un programa de inducción de estros en productoras de carne durante el posparto tratadas con zilpaterol y ganando peso corporal

### Artículo publicado

Animal Reproduction Science. 130 (2012): 1-8

Reduced response to an estrous induction program in postpartum beef cows treated with zilpaterol and gaining body weight

A. Guzmán<sup>a</sup>, E. Gonzalez-Padilla<sup>a</sup>, P. Garcés-Yépez<sup>a</sup>, J.V. Rosete-Fernandez<sup>b</sup>, R.C. Calderón-Robles<sup>b</sup>, C. Murcia<sup>a</sup>, C.G. Gutiérrez<sup>a\*</sup>

a Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria, Av. Universidad 3000, Mexico, DF 04510, Mexico

b Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Hueytamalco Puebla 73580, Mexico



## Reduced response to an estrous induction program in postpartum beef cows treated with zilpaterol and gaining body weight

A. Guzmán<sup>a</sup>, E. Gonzalez Padilla<sup>a</sup>, P. Garcés Yépez<sup>a</sup>, J.V. Rosete Fernandez<sup>a</sup>,  
R.C. Calderón-Robles<sup>b</sup>, C. Murcia<sup>a</sup>, C.G. Gutiérrez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad 25000, México DF 04216, México

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Huayquerías, Estado de México 72680, México

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 12 March 2011  
Received in revised form  
20 November 2011  
Accepted 7 December 2011  
Available online 7 January 2012

Keywords:  
Metabolism  
Insulin  
Leptin  
Follicular activity  
IGF-I

### ABSTRACT

In beef cows, reduced energy intake delays first ovulation postpartum and is associated with lesser insulin, IGF-I and leptin concentrations. However, the close relationship among these hormones masks their individual roles in the regulation of ovarian activity. A 3-week high receptor agonist (PARG) was used to increase body condition score (BCS) and yet reduce body fat and leptin serum concentration to determine the specific role of leptin in the postpartum ovarian activity. Beef cows ( $n=77$ ) with BCS 3.1 ± 1.1 received 2 kg/day of feed containing 0 or 0.15 mg/kg of zilpaterol (a synthetic PARG) for 20 days. Estrus was induced with a progestin implant applied for 9 d and cows in estrus were bred by artificial insemination (AI). Zilpaterol administration increased ( $P<0.05$ ) daily weight gain, muscle depth and BCS, with no changes in back fat depth, reducing fat to muscle ratio ( $P<0.05$ ). At the time of AI, insulin (33%), and IGF-I (20%) concentrations were less in zilpaterol-treated cows ( $P<0.05$ ), but leptin concentration was unaffected. Ovulation rate and ovarioluteal activity after estrus induction were also reduced by 35% ( $P=0.05$ ) and 55.5% ( $P=0.007$ ), respectively, in zilpaterol-treated cows. Logistic regression estimates for BCS ( $P=0.016$ ) and IGF-I concentration ( $P=0.03$ ) were positively related with the occurrence of luteal activity. In addition, while back fat ( $P=0.009$ ) had a positive effect on luteal activity, leptin concentration did not show a significant relationship. In conclusion, despite an increase in body weight and a positive change in BCS, the reduction in insulin and IGF-I concentrations, associated with PARG treatment, reduced the response to induction of estrus. However, only IGF-I, but not leptin or insulin, significantly influenced the odds for the occurrence of luteal activity after estrous induction in cattle with poor BCS.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Nutrient availability and BCS regulate reproductive function in ruminants (Hess et al., 2005; Croome, 2008) allegedly through hormones like leptin, insulin and IGF-I (Hess et al., 2005; Castellanos et al., 2009). Serum concentrations of these hormones have positive correlations with BCS (Truini et al., 2004) and are inversely related to the

length of the anestrus period in cattle (Wettemann et al., 2003; Hess et al., 2005). Moreover, marginal BCS and lessening in reproductive function (Ribeiro et al., 1987) and reduce LH pulse frequency (Zickler et al., 2005). In feral cows, smaller doses of leptin increase basal LH concentrations (Zickler et al., 2003), similar to what is observed in leptin deficient rodents, where leptin reestablishes LH secretion (Chahub et al., 1996). This indicates that leptin enhances pituitary LH secretion and may facilitate the neuroendocrine ovarian activity in the postpartum beef cow.

There is a close correlation among leptin, IGF-I, insulin and BCS (Truini et al., 2004), as well as between these

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 53222600.  
E-mail address: ggarciar@veterinaria.unam.mx (C.G. Gutiérrez).

hormones and the initiation of ovarian activity postpartum (Haze et al., 2005). However, the close relationships among these hormones hinder the evaluation of individual roles on the resumption of ovarian activity postpartum.  $\beta$ -Adrenergic receptor-agonists (BAR) stimulate hormone-sensitive lipase activity in adipose tissue and induce triglyceride breakdown (Mersmann, 1990). In muscle tissue, BAR increase protein synthesis and reduce its catabolism (Mersmann, 1993). Ractopamine treatment, a BAR, increased muscle accretion but did not affect insulin (Gisemann and Bristol, 1990; Walker et al., 2007) or IGF-I serum concentrations (Walker et al., 2007; Winterholler et al., 2008). In contrast, another BAR (clenbuterol) caused a reduction in leptin serum concentrations in cattle and humans (Chillard et al., 2005). Hence, we hypothesized that a BAR agonist in lactating beef cows will increase muscle mass, and reduce body fat and leptin concentrations without affecting IGF-I and insulin concentrations. These changes in body composition and hormone concentrations will dissociate the natural relationship between insulin, IGF-I, leptin and BCS, and enable enhanced understanding of the role of leptin in the resumption of postpartum estrous cycles in lactating beef cows under an estrous induction program.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Localization and cattle management

All animal procedures were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Veterinary School, UNAM. The experiment was conducted at "Las Margaritas" research station, located in a subtropical humid area of Mexico during June and July. Lactating beef cows (See indicators: Bos taurus;  $n=77$ )  $78 \pm 21$  d postpartum (range=18–100), body condition score (BCS)  $2.1 \pm 1.1$  (1=emaciated, 9=fat; Roche et al., 2003) and initial body weight (BW) of  $383.9 \pm 52.2$  kg were kept in native tropical pastures (*Awopagus argentinus* and *Paspalum notatum*). All cows remained with their suckling calves during the study.

### 2.2. Feeding and treatment

Cows were supplemented once daily with 2 kg/cow/day of commercial feed containing 12.5% of crude protein and 5012 Mcal of ME/kg, during 33 d. Cows were divided in two groups balanced for postpartum day and BCS. The control group ( $n=39$ ) received only the commercial supplement,

whereas the zilpaterol group ( $n=38$ ) received the same amount of feed supplement plus 0.15 mg/kg BW/day of zilpaterol hydrochloride (Zimax, Intervet/Schering-Plough Animal Health<sup>®</sup>). Estrous induction was performed using norgestromet implants (0 mg) plus estradiol valerate (5 mg/cow) IM (Crestar Intervet/Schering-Plough Animal Health<sup>®</sup>) for 3 d, starting 21 d (90  $\pm$  21 d postpartum) after the start of supplementation. Implants were removed 3 d later and calves were temporarily weaned for 72 h (de Medeiros-Castos et al., 2004). Cows were observed for estrus twice daily for 96 h after implant removal. Cows were considered to be in estrus if they stood to be mounted by another cow and were artificially inseminated (AI) 10 h after being detected in estrus. Corpora lutea were examined by ultrasonography (Aloka SSD-500) with a 7.5 MHz linear array transrectal probe 15 d after progestin implant withdrawal and the ovulation rate was estimated. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography 30 and 60 d postartificial insemination and the pregnancy rate determined (Fig. 1).

### 2.3. Body composition and serum analyses

All cows were weighed and BCS measured every 2 weeks. Back fat and muscle depth were measured by ultrasonography between the 12th and 13th thoracic vertebrae in 20 cows per group (Brethour, 1992) using a 3.5 MHz sectional probe (Aloka<sup>®</sup> SSD 500) at day 0 and 33 of the experimental period. Fat to muscle ratio was calculated by dividing the depth of the back fat by the depth of large sternal muscle in millimeters measured between the 12th and 13th thoracic vertebrae.

Blood samples were collected for progesterone analysis 1 day before the start and 15 d after the end of the estrous induction program. Luteal activity was considered as positive if progesterone concentration was above 1 ng/mL (Zalesky et al., 1981). Metabolic and hormonal changes associated to zilpaterol treatment were evaluated in 8 cows per group which were randomly selected and bled twice weekly during the study. 10 mL of blood from the coccygeal vein were drawn into vacuum tubes containing a clot activating gel. Samples were placed on ice immediately after collection and then centrifuged at 1000  $\times$  g for 15 min. Serum was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until assayed.

Insulin (SiMAs<sup>®</sup> cat number IRN5) serum concentrations were measured in duplicate by RIA, with an intra-assay coefficient of variation (CV) of 7.7% for the low (0.05 ng/mL) and 5.0% for the high (7.30 ng/mL) quality

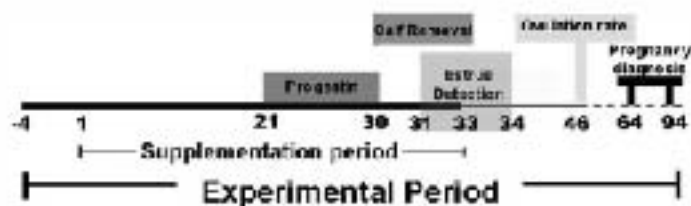


Fig. 1. Experimental design.

control samples (QC) from milk. Growth Factor-1 (IGF1) cat number 2500) was measured by RMTa with an intra-assay CV of 5.2% for low concentration (1.02, 57.6 ng/ml) and 5.01% for high (370 ng/ml). QC Lipo-n (Lipin N-25K; Linc, St. Louis, MO, USA) was measured by HPLC in liquid phase and its intra-assay CV were 6.6% and 9.2% for low and high QCs respectively (1.92 ng/ml and 17.3 ng/ml). Glucose, urea and triglyceride were measured with commercial kits (BioSystems<sup>®</sup>, cat numbers COD-1504, COD-1537 and COD-1592, respectively). Extra- and intra-assay variation coefficients were 3.0% and 3.0% for glucose, 3.6% and 6.3% for urea and 21 and 24% for triglycerides. Non-esterified fatty acids (NEFA) were measured according to Duncombe (1992), with modifications. Finally, 1190  $\mu$ l of chloroform/Sigma-Aldrich<sup>®</sup> cat. number 268306-1L; 119  $\mu$ l of serum and 395  $\mu$ l of copper solution; containing: 30% of a 2.4% copper nitrate hydrate solution; (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, cat. number 3772941U, 4% of 1 M Tris(hydroxymethyl)ethylammonium chloride (THP) and 10% of 1 M acetic acid (Caledon Laboratories LTD<sup>®</sup>, cat. number 1300-1) were put in a 2 ml eppendorf tube. Tubes were shaken vigorously on a vortex (Genie Scientific Industries) for 1 min and then centrifuged (Eppendorf<sup>®</sup>; centrifuge 5310T) for 12 min at 6544  $\times$ g. The supernatant was carefully discarded and the protein in the phase was removed to have access to the chloroform solution at the bottom of the tube. Chloroform so out or (600  $\mu$ l) was removed carefully and placed inside a glass tube. Finally 100  $\mu$ l of 0.1% sodium dithionite/dithiothreitol mixture (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> cat. number 063100D) were added to the tube, vortexed for 1 min and the absorbance read at 440 nm. Concentrations of NEFAs were calculated by interpolation of the absorbance into a calibration line made with three reference samples containing 10, 50 and 100  $\mu$ M of palmitic acid (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> cat. number 02752112) in chloroform. The intra- and inter-assay variation coefficients were 8.5% and 1.27%, respectively. Finally, NEFA<sub>2</sub>, glucose, urea and triglyceride were analyzed in duplicate in all samples. Leptin and Gh-1 were measured on Day -4, -14 and 03 of the supplementation period.

Table 1

Body weight (kg), body fat: cephalic, muscle depth and fat to muscle ratio in heeding and control cows with or without a change in WPI/day at different body conditions (33 DPA and muscle depth were measured only after pregnancy between 120 and 150th day of lactation).

	Control (n=36)	Supplement (n=36)	P
Lacta BW, 10 (kg)	332	333	0.5
Final BW, 433 (kg)	345	347	0.75
Body weight gain (%)	41	74	0.002
Fat: muscle ratio	3.2	2.6	0.26
Final OCS, 433	3.1	3.3	0.206
Change in BW	3	0.5	0.79
Lacta lactate, 43 (mmol)	259	230	0.03
Final lact. 433 (mmol)	234	222	0.42
Change in lact. (mmol)	205	142	0.02
Lacta muscle depth, 43 (mm)	174	152	0.23
Final muscle depth, 433 (mm)	185	210	0.09
Change in muscle depth (mm)	201	234	0.02
Final fat: muscle depth, 43	0.78	0.76	0.5
Final fat: muscle depth, 433	0.73	0.63	0.006

Mean  $\pm$  SD for final BW and daily weight gain are adjusted by the correlation in lact 433 and change in BW; are adjusted by the correlation in lact 433, final BW, final fat: muscle depth and change in muscle depth. Mean lactate and final fat: muscle depth are adjusted by the correlation in lact 433. Means for final lactate, final BW, final fat: muscle depth and change in muscle depth are adjusted by the respective initial muscle depth.

## 2.4. Statistical analysis

Differences between treatment groups in BW gain, BCS, lactate and muscle depth were analyzed by ANCOVA using their respective measurement, taken at a given supplementation, as covariate. The ratio of lact fat to muscle depth was analyzed by T-test. Percentage of muscle and cows, evaluation rate and pregnancy rate were analyzed by the Wilcoxon Test. Hormones and metabolite concentrations were analyzed by ANCOVA for repeated measurements and day as fixed variables and lactation period as the treatment as a random variable.

The relationship between hormone and metabolite concentrations and body fat, muscle depth and BCS at the time of pregnancy implantation, with the occurrence of uterine activity 12 d after the end of the service induction treatment was analyzed by logistic regression, for each of the 16 cows where hormone and metabolite concentrations were available on the 40 cows where body fat and muscle measurements were performed. All analyses were performed using JMP-5 statistical package.

## 3. Results

### 3.1. Body weight, body condition score, body fat and muscle depth

Supplement-treated cows increased ( $P < 0.0001$ ) daily BW gain, final BW and BCS (Table 1). Body fat depth remained unchanged whereas muscle accretion and muscle depth at the end of the study was greater ( $P = 0.002$ ) in supplement-treated cows. This resulted in a lesser ( $P = 0.005$ ) fat to muscle ratio in the supplement-treated cows in the control cows at the end of the supplementation period.

### 3.2. Response to the extra-uterine treatment

Days postpartum were  $94.6 \pm 21.1$  and  $93 \pm 20.1$  for the control and the supplement-treated group respectively, at the start of the extra-uterine treatment. The response

Table 2

Response to the estrous induction treatment, ovulation rate (ov/10), and pregnancy rate in lactating beef cows fed with or without 0.15 mg/kg BW of zilpaterol hydrochloride for 22 d.

	Control (n=19)	Zilpaterol (n=13)	P
Animals with lateral activity before estrus induction (%)	5.2 (2/39)	3.2 (0/0)	0.97
Cows inseminated (%)	51 (24/39)	47 (11/26)	0.20
Ovulation rate (%)	62 (24/39)	39 (12/30)	0.02
Fertility rate (pregnancy) (%)	45 (20/30)	38 (11/26)	0.11
Pregnancy rate 60 d post-insemination (%)	18 (7/39)	5 (2/30)	0.08
Animals with lateral activity 1 to 28 weeks post-insemination (%)	54 (21/39)	34 (0/0)	0.00

to the estrous induction treatment was negatively affected by zilpaterol (Table 2). The proportion of cows with lateral activity prior to the estrus induction treatment was similar between groups ( $P=0.97$ ). Treatment with zilpaterol reduced ovulation rate and the percentage of cows with lateral activity after the estrus induction program by 34% ( $P=0.05$ ) and 56% ( $P=0.007$ ), respectively. Similarly, pregnancy rate tended to be reduced by zilpaterol treatment ( $P=0.08$ ).

### 3.2. Hormones and metabolites

During the experimental period (Fig. 1), insulin and leptin concentrations increased ( $P<0.05$ ) in both groups (Fig. 2). However, at the end of the estrous synchronization (LFP) was less ( $P<0.05$ ) in the zilpaterol treated group (Fig. 2A). Insulin was less in the zilpaterol treated group from d 14 of treatment and remained less through the end of the supplementation period ( $P=0.00$ ; Fig. 2B). Leptin increased in the control group on d 14 of supplementation and differed from the zilpaterol treated group ( $P<0.05$ ). However, at d 22 leptin did not differ (zilpaterol = 3.4 ng/mL compared to control = 2.5 ng/mL; Fig. 2C).

Mean concentration of NEFA during supplementation was less ( $P<0.001$ ) in zilpaterol treated (39  $\mu$ Mol/L) than in control cows (42.5  $\mu$ Mol/L; Fig. 3A). Concentrations of glucose were highly variable across the experimental period and between groups, and the mean concentration of glucose did not differ between treatments (45.0  $\pm$  1.8 mg/dL; Fig. 3B). Feed supplementation reduced urea concentration by 30% and there was no difference between groups along the supplementation period (Fig. 3C). No differences were observed between treatments in mean concentrations of triglycerides (Fig. 3D).

The relative influence of metabolic hormones, metabolites and energy reserves on the occurrence of lateral activity after an estrous induction program is depicted in Table 3. Regression estimates for BCS ( $F=0.018$ ) and IGF-1 concentration ( $P=0.05$ ) were positively related with the occurrence of lateral activity. In addition, weight back fat ( $P=0.000$ ) had a positive effect on lateral activity and concentration did not show a significant relationship (Table 3).

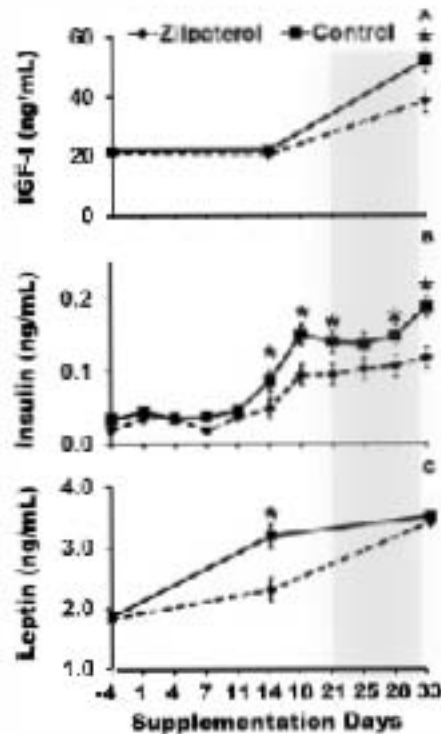


Fig. 2. Effect of zilpaterol hydrochloride on concentrations of IGF-1 (panel A), insulin (panel B), and leptin (panel C) in lactating beef cows (n=32) fed or not 0.15 mg/kg BW of zilpaterol hydrochloride for 22 d. Values of hormone between zilpaterol-treated and control group within the same day ( $P<0.05$ ). Gray bar shows the pregnancy period.

### 4. Discussion

The results of this experiment showed that a  $\beta$ AR agonist reduced the reproductive response to a progesterone estrous induction program despite an increase in BW and a positive change in DCS. The reduced response to estrous induction was associated with lesser fat to muscle ratio and

Table 3

Effect of metabolic hormones, metabolites, body condition score (BCS), back fat and muscle depth on the occurrence of lateral activity 12 weeks the end of a pregnancy treatment in lactating beef cows.

Variable	Intercept	Estimate	P
Intercept	2.89	0.097	0.02
Insulin	-0.30	0.030	0.52
Leptin	0.12	0.045	0.01
Glucose	0.52	-0.031	0.42
NEFA	-2.06	0.097	0.17
Urea	0.9	-0.070	0.22
Triglycerides	0.51	-0.045	0.11
BCS	-2.60	0.63	0.016
Back fat	-0.53	0.145	0.009
Muscle depth	2.47	0.051	0.009

Intercept and regression estimates for each independent variable were calculated by logistic regression for the occurrence of activity after pregnancy treatment.

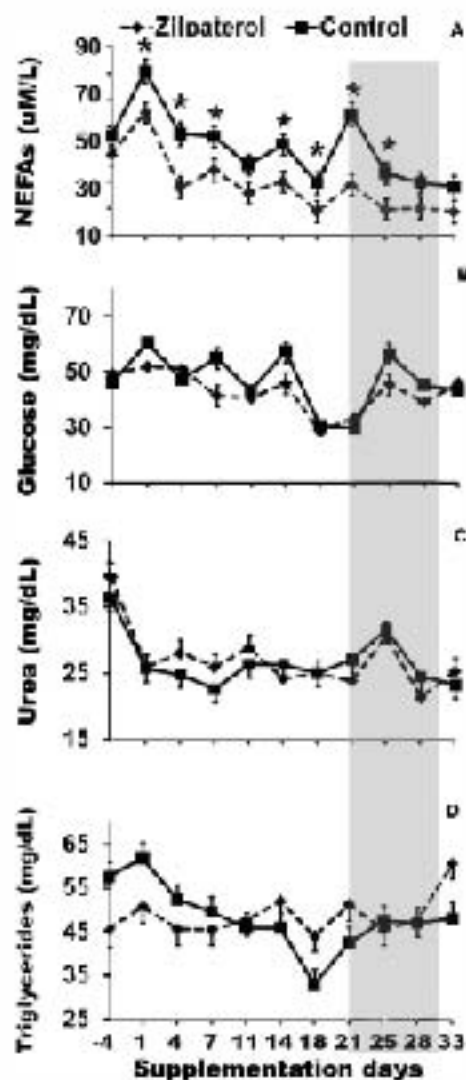


Fig. 3. Serum concentrations of NEFAs (panel A), glucose (panel B), urea (panel C) and triglycerides (panel D) in lactating beef cows (n = 4) fed or not 0.12 mg/kg BW/day of zilpaterol (gray shaded area) during 33 d. \* show differences between zilpaterol-treated and control groups at the same day ( $P < 0.05$ ). Gray bar shows the period of estrus induction.

to a decreased serum concentration of IGF-I and insulin. In addition, the odds for development of an active CL 15 d after the end of progesterin treatment was positively associated with back fat, DCS and IGF-I concentrations. In contrast, at 91, leptin serum concentrations did not change between treatment groups or with DCS increased in the range observed in the present study. This evidence highlights IGF-I as the most important metabolic signal for reproductive fitness above that given by insulin and leptin.

Administration of zilpaterol increased BW and RCS in the present study. Crosse (2008) showed that the increase in body energy reserves (postpartum loss) may positively affect reproductive function and has been suggested as the most important factor controlling the postpartum anestrus interval. This is supported by the fact that in the present experiment RCS had a positive relationship to the occurrence of heat activity. Lactating beef cows with moderate RCS (RCS = 2; 1 female/lot), 5% (hese) all or progesterin based estrus induction treatment, had a lesser percentage of estrus (27%) and pregnancy rate (50%) than cows with greater RCS (RCS = 3; 50% and 96.6%, respectively; de Melo Reis-Bastos et al., 2004). Similar results were reported by Hougaard et al. (2008) and Guimarães et al. (2008) where early postpartum cows with moderate RCS (2.0–2.5; in a 1–5 scale) had a lesser response to estrus induction than cows with good RCS (3.0–3.5). In addition, beef cows that became pregnant had a lesser mobilization of adipose tissue during the first 50–65 d postpartum than cows that did not become pregnant after an estrus induction program (Guimarães et al., 1997). However, in an experimentally presented case and despite the increase in RCS and BW gain observed in the zilpaterol-treated cows, there was a 77.7% reduction in ovulation frequency in the present study. In addition, zilpaterol reduced ovulation and pregnancy rates by 3.7% and 56.5%, respectively. Nonetheless, the increase in RCS and BW observed here is a good indicator that observed in all other studies, mainly because it was due to an increase in muscle mass without changes in fat deposition. This strongly supports the theory that an increase in energy reserves observed as fat accumulation is needed for the resumption of postpartum estrus cycles (Lancoul, 1970; Frisch and McArthur, 1974).

The mechanisms by which energy reserves control reproductive function in cattle are not clear. However, it has been established that an increase in RCS is accompanied by an increase in IGF-I, insulin and leptin serum concentrations (Teim et al., 2004). Moreover, all these hormones have been proposed as links between energy status and reproduction (Fossas et al., 2000; Wu and et al., 2002; Gutiérrez et al., 2006; Strand et al., 2008) and indeed had various in vitro and in vivo associations to improve follicular and reproductive function has been proven. During the experimental period, IGF-I and insulin serum concentrations increased in both groups, nonetheless, this increase was less in zilpaterol-treated than in control cows. Heifers in nutritional anestrus had reduced IGF-I, insulin and LH concentration when compared to well-fed heifers (Cossis et al., 2000). However, when anestrus heifers were re-fed to gain body weight, IGF-I, insulin and LH increased gradually until the first ovulation occurred (Cossis et al., 2000). Beef cows that had previously initiated estrus cycling had a greater concentration of serum IGF-I than cows in anestrus either at 2 or at 20 weeks postpartum (Roberts et al., 1997). Furthermore, IGF-I was greater during the first 3 weeks postpartum in dairy cows that developed an ovulatory follicle in their first follicular wave postpartum as compared to cows that developed an anovulatory dominant follicle (Kawashima et al., 2007). Ciccioli et al. (2003) found that cows calving with a DCS of 5.11–emaciated 9–fat) and fed a greater energy diet had greater

IGF-I serum concentrations and a shorter anoestrous period than cows with similar BCS and fed a lesser energy diet. Similarly, insulin concentrations seem to have a negative correlation with days to first ovulation postpartum. In dairy cattle, greater insulin concentrations postpartum either as a consequence of a diet designed to increase insulin (Gong et al., 2002) or related to a lesser predicted breeding value for milk production (Cundiff et al., 2006), had shorter intervals from parturition to first ovulation. In beef cattle, animals with elevated insulin concentration postpartum ovulated earlier after calving than cows with a lesser insulin concentration (Stclair et al., 2002). In the present study, there was a dissociation between the increase in BW gain, BCS and metabolic hormones (IGF-I, insulin and leptin) and the positive effect on reproductive function. This was apparent by the lesser concentrations of IGF-I and insulin in BAR-treated cows despite a greater increase in BCS and BW, yet the association between IGF-I with resumption of estrous cyclicity was maintained.

Leptin was found to regulate GnRH secretion in rodents (Castellano et al., 2009) and ruminants (Zeba et al., 2005; Hess et al., 2005). In beef cows fasted for 2 d, insulin and leptin concentrations were reduced and the infusion of recombinant leptin normalized insulin concentrations and caused hyper-secretion of LH (Amstalden et al., 2002). In the present study, leptin concentration increased during the experimental period in both groups, however this increase was 28% less in BAR-treated cows after 14 d of treatment. Nevertheless, on Day 33 (at insemination time) leptin concentration did not differ between groups and did not have influence on luteal activity after insemination. Similarly, Königsson et al. (2008) and Clodell et al. (2008) found that leptin concentrations in serum were less and did not have an association with the re- initiation of ovarian cycles in cattle with lesser BCS. In contrast, in Brahman cows calving with a greater BCS (BCS=7, scale 1–10), lesser leptin concentrations in the postpartum period were inversely associated ( $r = -0.27$ ) with a longer postpartum anoestrus (78–132 d). Moreover, cows that resumed estrous cyclicity early (30–37 d) had increased (5.9 ng/mL) leptin concentration during the first 6 weeks postpartum than cows with longer (78–132 d) anoestrus interval (Strauch et al., 2003). Therefore, these results suggest that a certain leptin concentration above a putative threshold should be achieved for leptin to signal for the resumption of ovulation. Thus, under conditions of the present experiment, where there was an increase in BW and BCS without changes in body fat, IGF-I and insulin seem to be more important than leptin for the reproductive function in response to a restricted diet treatment.

In the present study, BAR caused a reduction in IGF-I and insulin concentrations with previous reports in steers, where 28 d of zilpaterol treatment did not affect IGF-I and insulin concentrations (Walker et al., 2007; Whitehaller et al., 2008). Similarly, Drazos et al. (1993) found that after 11 weeks of zilpaterol (BAR) treatment, IGF-I concentrations and growth hormone were not affected. However, as far as we are aware there are no previous reports for the use of BAR in suckling beef cows and the decline in hormone concentrations observed in the present study could have been due to the physiological status of the animals. For

instance, in lactating dairy cows, direct venous infusion of zilpaterol for 4 h had no effect on insulin concentrations. However when applied to non-lactating cows zilpaterol infusion increased insulin concentrations five fold (Bareille et al., 1997).

Contrary to expectations in the present study, the concentrations of NEFAs were less in the zilpaterol-treated than in the control group. Chikhez et al. (1991) reported that cimaterol increased NEFAs after 20 d of supplementation in steers. Cimaterol treatment during 3 or 6 weeks in lambs also increased NEFAs concentrations in serum (O'Connor et al., 1991). Moreover in humans the use of a specific  $\beta_3$ -adrenergic receptor ( $\beta_3$ AR) agonist increased NEFAs after 28 d of treatment (Larsen et al., 2002). Muscle tissue could use NEFAs produced by lipolysis in response to zilpaterol, as an energy source (Drachey, 1999; Komen et al., 2005). Hence, the increased muscle mass in zilpaterol-treated cows may indirectly increase the uptake of NEFAs reducing their blood concentrations.

In cattle and sheep with poor nutritional status, an increase in dietary energy increased leptin serum concentrations (Chilliard et al., 2001; León et al., 2004). In the present experiment, animals had a lesser BCS at the beginning of the dietary supplementation period ( $3.1 \pm 1.4$ ) therefore the increase in energy intake explains the increase in leptin in both groups. Nonetheless, the leptin increase in the zilpaterol-treated group was less than that observed in the control group. BAR reduces leptin serum concentrations within minutes of treatment in non-pregnant dairy cows (Chilliard et al., 1998) and humans (Dorahio et al., 1997). This decrease may be due to reduction in amounts of adipocyte mRNA for leptin (Traykurt et al., 1998). In addition, isoproterenol reduced leptin concentration in adipocyte culture media, although leptin concentration in the cells was not affected (Stolt et al., 2002). However, there seems to be a conditioning of the body to BAR treatment, as there were no differences in leptin serum concentrations after 28 d of treatment in humans (Larsen et al., 2002). This conditioning could explain why no differences were observed in leptin serum concentrations after 33 d of treatment in the present study, particularly as there were no differences in the amount of backfat observed.

Cholesterol concentrations were not affected by zilpaterol in agreement with reports in cattle (Chikhez et al., 1991; Walker et al., 2007), humans (Larsen et al., 2002) and lambs (O'Connor et al., 1991). In addition triglycerides were not affected by zilpaterol administration, probably due to the lack of increase in NEFAs. This is in contrast with the observed increase in triglycerides after a 28 d of  $\beta_3$ AR agonist treatment in humans (Larsen et al., 2002).

In the present experiment, zilpaterol treatment increased amount of muscle without changes in backfat hence reducing the back fat to muscle ratio. These effects of a BAR agonist are to increase muscle protein synthesis and to reduce fat catabolism and to trigger lipolysis in adipose tissue (Morsman, 1998). Similar results had been reported in growing steers (Whitehaller et al., 2008). However, in beef calves treated with HCL in addition to the increase in daily body weight gain and longissimus muscle area there



was also a reduction in fat depth at the 12th rib (Strom et al., 2007). Thus the change in body composition induced by zilpaterol treatment modifies the endocrine milieu that normally accompanies the improvement in BCS. This breakdown of the natural relationship between metabolic hormones could have been responsible for the reduced reproductive performance observed in zilpaterol-treated cows during this experiment.

In conclusion, a reduced response to estrous induction was observed in cattle treated with zilpaterol, associated with a reduction in IGF-I and insulin concentrations, however only IGF-I significantly influence the odds for the occurrence of luteal activity after estrous induction. Leptin was not associated with the response to estrous induction and did not affect the luteal activity post-implantation in cattle with lesser BCS.

#### Acknowledgments

Financial support for this study was provided by Macroproyecto S.C.I.E. P.H.U. / 31, U.P.M., A. Guzman thanks CUNAHU for a Doctorate student grant. The authors thank Dr. Pereira, Mrs. Rodriguez and Mrs. Rojas for their help in hormonal assays, and Dr. A. Lazzari for helpful criticism to the manuscript.

#### References

- Araújo de M., Garcia MR, Strabo RL, Mendillo LA, Herrera LD, Gilder CL, Williams CG. 2002. Central infusion of norepinephrine and epinephrine increases insulin and insulin-like growth factor-1 secretion of lactating ruminants after short-term fasting. *Journal of Dairy Science* 85: 1500–1504.
- Castillo H, Treviño F, Gu, M. 1997. Modification of feed intake response to a lacte 2-week by insulin concentrations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 52–56.
- Castro L, Wettstein RF, Wiley SD, Pletcher T, Spitzer L. 2000. Metabolic and endocrine adaptation in beef heifers: associations between fasting and refeeding and refeeding of ruminants. *Metabolism* 49: 1426–1434.
- Easton JR. 1992. The repeatability and accuracy of ultrasound measurement of fat of cattle. *J. Anim. Sci.* 75: 1039–1044.
- Castellano JM, Lee J, Lopez RM, Degen G, Aguilar I, Hanks L, Torres-Gonzalez M. 2000. IGF-1, leptin and the metabolic control of insulin and adiponectin: role and potential physiological implications. *Regulation* 30: 134–147.
- Cheloni D, Liu J, Li L, Li R. 2006. Correction of the estrus defect in ovariectomized female mice by treatment with the aromatase inhibitor letrozole. *Nat. Genet.* 38: 310–310.
- Chiriac P, McInnes KF, Adams SM, Roche JF, Berghier WJ. 2002. Effects of maternal administration on plasma concentrations of various hormones and metabolites in Friesian steers. *Domest. Anim. Biotechnol.* 17: 471–470.
- Chiriac P, Kocour J, DeBorja C, Guzmán M, Adams M, Marzetti F. 2005. Leptin is a new marker: effects of access, breed, adiposity, lactation and pregnancy on leptin status in Friesian cows of the Central Alps. *Animal Production* 70: 267–274.
- Chiriac P, DeBorja C, Adams M. 2005. Leptin concentration in ruminants: nutritional and physiological regulation in relation with energy metabolism. *Domest. Anim. Biotechnol.* 20: 2–11.
- Clayton HR, Wettstein RF, Jones LJ, Lewis CA, White FJ, Ebbels DM. 2000. Influence of body condition on calving and postpartum nutrition on endocrine function and reproductive performance of multiparous beef cows. *J. Anim. Sci.* 91: 2197–2020.
- Cover NA. 2002. Estimation of ovulation capability in postpartum dairy cattle. *Animal Reprod.* 1: 30–33.
- Davies JM, Craigie J, Lottory M, Torres DC. 2003. Influence of diet and leanness on insulin sensitivity and regulation of insulin secretion in humans. *Diabetes Care* 26: 1997–2002.
- deMolina-Rodriguez G, Encinas RH, Wilson FW, Hayes P, de Obedo JF, Rodriguez JF, Martinez LA, Portinari PM, Gonzalez PR, EA. Hormonal induction of lactation and uterine involution in a milked beef cow under nutritional stress. *Theriogenology* 65: 307–313.
- Dowling WT, Jensen TE, Van Tj, Reed RH. 1997. Insulin and norepinephrine decrease plasma leptin in humans: role of mechanism of adipose tissue expansion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 438–442.
- Drumby JE. 1999. ADA function: what's next? Biology of early onset during the neonatal period: the fetal liver. *J. Dairy Sci.* 82: 2265–2273.
- Duncan WG. 1974. The role of the kidney in the regulation of blood glucose concentration in plasma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 52: 137–137.
- Encinas RH, Rivas DG. 1996. Change in insulin sensitivity in response to lactation is not a major component of the regulation of milk production in beef cows. *J. Dairy Sci.* 79: 505–511.
- Fauch R, Vollebregt JM. 1991. Metabolic control of insulin in a constant level of milk yield: weight for height necessary for their maintenance in adult. *Science* 253: 543–551.
- Gong JG, Lee WJ, Galloway PL, Zhou B. 2002. Effect of energy-induced increase in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 123: 49–57.
- Graham N, Lambert P, Miles JB, Jorgensen N, Sorensen D, Hillier SG. 2007. Absence of response to insulin induction and hyperinsulinemia are related to risk of stillbirth in a mixed beef-cow population. *Reprod. Fert.* 37: 128–133.
- Gutierrez LG, Gong JG, Fleming LA, Wood S. 2006. Insulin in periparturient breeding value for milk production and cow evaluation: independent changes in Friesian development, milk production and body weight. *Anim. Reprod.* 3: 261–269.
- Guzmán M, García-Vega P, González-Pedraza E, Rivas DG, Encinas RH, González CC. 2008. La Resistencia a insulina progresa de la lactación al parto en vacas de raza Friesian. *Actas del Congreso Nacional de la Unión Veterinaria, Guadalajara México* 1: 1857.
- Hart RW, Lake AJ, Schalkwyk EJ, Johnson TR, Haythorn V, Miles JG, Mac GL. 2005. Physiological control of food intake regulation. *J. Anim. Sci.* 101: E10–E10.
- Herrera LD, Sierra L, Dávalos E, Cheloni D, Encinas RH, Encinas RH. 2007. Relationship between metabolic hormones and variables of continuous KPIs during the first 120 days postpartum in high yielding dairy cows. *Reprod. Fert.* 37: 128–133.
- Langston K, Roberts C, Leaver N, Iqbal M, Gendron A, Gendron M, Vermeil MC. 2003. Energy balance, leptin, IGF1 and IGF1 plasma concentrations and composition of postpartum ovaries activity in periparturient and lactating cows. *Acta Vet. Scand.* 5: 34–34.
- Leaver N, Chen JF, Jones A, Leaver N. 2005. Leptin levels, leptin resistance and PFC/IGF1 concentrations in lactating and pregnant animals. *Reprod. Fert.* 37: 128–133.
- Leland DR. 1967. The influence of undernutrition on the reproduction of the cow. *Anim. Prod.* 1: 269–272.
- Lopez TM, Torres DC, van Eek MA, Garza-Rodriguez CM, Lopez P, Salas WH, Arroyo A. 2002. Effect of a 24 h treatment with 1.75 mg/kg a novel beta2-adrenergic receptor agonist on energy expenditure and body composition in ruminants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 79: 780–780.
- Lopez MV, Hernandez-Garcia J, Encinas RH, Encinas RH. 2004. Plasma concentrations of leptin, insulin like growth factor-1, and insulin in relation to changes in body condition score in ruminants. *J. Anim. Sci.* 99: 442–451.
- Morimoto M. 1995. Turnover of the adipose tissue: a weight-weighting system in animal growth including mechanism of action. *J. Anim. Sci.* 79: 160–172.
- O'Connor EM, Rorer WR, Hurley BT, Nagle DE, Reemter JA. 1991. Acute and chronic hormone and metabolic changes in lambs fed the beta-agonist, clenbuterol. *Domest. Anim. Biotechnol.* 6: 237–248.
- Reed RH, Lee WJ, Russell CT, Wang Y, Sullivan T, Schalkwyk EJ, White FJ, Reed DC. 2005. Insulin resistance decreases after lactation in a mixed beef-cow population: implications for the fetus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R276–R284.

- Roberts, A.J., Hughes-Fair, R.A., Mink, J., Jenkins, T.G., 1997. Circulating insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein, growth hormone, and concentration of insulin in postpartum cows subjected to dietary energy restriction. *J. Anim. Sci.* 75, 1905–1917.
- Roche, J.R., Inggimar, M., Roy, J.H., Huber, M.W., Stallard, S.J., Berry, D.P., 2005. Body condition score and its association with dairy cow production, health and welfare. *J. Dairy Sci.* 82, 5709–5801.
- Stewart, K.O., Miller, G., Ruffin, P., Roberts, J.F., O'Brien, G., Armstrong, L., Ross, A., Mackay, D.R., Aulie, M.G., 2002. Evaluation of the first dominant follicle antral area after day 21 post-partum in suckling beef cows. *Anim. Sci.* 75, 115–120.
- Sutton, R.L., Kohnzandt, C.J., Ackerman, J.P., Nichols, W.L., Yates, L.A., Seegal, T.S., Johnson, D.J., 2007. Response to metoprolol-HCl in lactating dairy cows: effect of insulin, estradiol, and leptin on feed intake. *J. Anim. Sci.* 105, 2195–2197.
- Strach, J.A., Beaumont, D.A., Brown, C.G., Wade, M.L., Lavin, A.W., Reiter, D.J., Fandel, R.D., 2003. Effects of leptin on circulating concentrations of leptin and insulin-like growth factor-I and reproductive performance of postpartum Friesian cows. *J. Anim. Sci.* 97, 1262–1270.
- Taylor, P., Dun, G.P., Haggas, J.N., Rajan, D.V., 1990. Regulation of leptin production: a candidate role for the sympathetic nervous system. *Proc. Nutr. Soc.* 51, 41A–42A.
- Walker, D.E., Trethewey, P.C., Nelson, P.C., Brown, K.P., Higgins, J.J., Andrews, G.A., Johnston, M.J., 2006. Effects of uterine implantation and metoprolol-HCl on nitrogen retention, blood metabolites and skeletal muscle gene expression in Holstein steers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91, 146–162.
- Wetteman, R.F., Lamb, C.A., Giudizi, M.L., White, T.J., Rubio, J., 2003. Nutritional and suckling-mediated regulation in beef cows. *J. Anim. Sci.* 97, 545–550.
- Wilmshurst, J.F., Pryor, W.L., Walker, D.E., Quinn, M.J., Donohue, J.S., Johnson, D.J., 2003. Effect of feedlot management system on response to metoprolol-HCl in yearling steers. *J. Anim. Sci.* 96, 2401–2414.
- Zachary, J.D., Joy, M.L., Garcia-Winder, M., Implewski, R., Kibler, R.J., D'Costa, M.J., Kasper, C.E., 1984. Influence of exposure to bulls on estrus cycle of estrous cycles following parturition in beef cows. *J. Anim. Sci.* 59, 1135–1138.
- Zick, D.A., Amstutz, M., Macint, M.N., Katcher, L.H., Ross, H., Gertler, A., Williams, G.L., 2003. Divergent effects of leptin on ketonacidogenesis and insulin secretion are dose-dependent. *End. Exp. Med.* 124, 329–336.
- Zick, D.A., Amstutz, M., Williams, G.L., 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. *Domest. Anim. Production* 29, 166–185.

### **Capítulo 3**

**En vacas productoras de carne posparto alimentadas con una dieta alta en energía para incrementar la acumulación de grasa corporal el tratamiento con zilpaterol reduce la respuesta a un programa de inducción de estros**

Artículo en preparación

**En vacas productoras de carne posparto alimentadas con una dieta alta en energía para incrementar la acumulación de grasa corporal el tratamiento con zilpaterol reduce la respuesta a un programa de inducción de estros**

**Resumen**

En el capítulo 2 se muestra que en vacas con baja CC el zilpaterol permite diferenciar la relación entre las reservas corporales de energía, la eficiencia reproductiva y las hormonas metabólicas IGF-I, insulina y leptina. Sin embargo, debido a que la ganancia de peso durante el posparto también reduce el anestro posparto asociado con un incremento de IGF-I, insulina y leptina, el objetivo del presente experimento fue diferenciar la relación entre el incremento de grasa corporal, la función reproductiva y las hormonas metabólicas en vacas productoras de carne ganando peso durante el posparto, mediante el uso del A $\beta$ A zilpaterol. Treinta vacas productoras de carne lactando con una CC al parto de  $4.5 \pm 1$  y al inicio del experimento de  $3.1 \pm 0.31$  fueron seleccionadas y mantenidas en pastos nativos. A los  $75.9 \pm 12$  días posparto las vacas fueron divididas en 2 grupos balanceados por días posparto y CC. El grupo testigo (n=15) se suplementó con 10.2 kg de de suplemento por animal por día durante 60 días, mientras que el grupo zilpaterol recibió la misma cantidad de suplemento adicionado con 15 mg de clorhidrato de zilpaterol por kg de alimento de. Seis animales de cada grupo fueron seleccionados al azar y se les tomó una muestra de sangre cada semana durante todo el periodo experimental. A los 12 días después de finalizada la suplementación con el concentrado y el zilpaterol, las vacas fueron tratadas con un implante auricular de progestágenos (Crestar® MSD Salud Animal) para inducir actividad estral. El zilpaterol mejoró la CC ( $5.1 \pm 0.38$ ), principalmente debido a un aumento ( $P < 0.05$ ) de masa muscular (4.66 cm) mas no tejido adiposo. Este cambio en composición corporal en

el grupo zilpaterol se asoció con una reducción en las concentraciones de IGF-I y leptina en un 25.4% y 27.9% respectivamente, sin cambios en insulina respecto al grupo testigo. Respecto a la respuesta reproductiva, el zilpaterol redujo 39% el número de vacas inseminadas, 60% las vacas ciclando y 39% la tasa de preñez al final del periodo de empadre. En resumen en animales que ganan peso por acumulación de masa muscular pero no tejido adiposo, hay una reducción en la respuesta a un protocolo de inducción de estros debido probablemente a una reducción de IGF-I y leptina. Este resultado indica que el incremento en grasa corporal es necesario para una respuesta óptima en vacas productoras de carne lactando.

## **Introducción**

En vacas productoras de carne, la magnitud de las reservas corporales de energía al parto determina en gran medida la duración del anestro posparto (Hess et al., 2005; Crowe, 2008). La condición corporal a momento del servicio influye sobre la respuesta a la inducción de estro, mientras que la ganancia de peso posparto afecta el periodo de anestro posparto. En vacas productoras de carne lactantes sometidas a un protocolo de inducción de estros, los animales con una CC de 3 (en escala de 1 a 5) tienen mayor presentación de estro y tasa de preñez que vacas con CC = 2 (de Medeiros-Bastos et al., 2004). Mientras que las vacas productoras de carne que ganan 0.9 kg/día durante los primeros  $71 \pm 3$  días posparto tiene un anestro posparto menor (100 días) en comparación con vacas que solo ganan 0.45 kg/día de peso, las cuales tuvieron 120 días de anestro (Ciccioli et al., 2003).

Los mecanismos por los cuales la reservas energéticas o el consumo de energía controlan la función reproductiva en vacas productoras de carne están asociados con cambios en las

concentraciones de hormonas metabólicas, tales como IGF-I, insulina y leptina (Hess et al., 2005; Chagas et al., 2007). La estrecha relación que existe entre las reservas energéticas, la concentración de las hormonas metabólicas mencionadas (León et al., 2004) y la eficiencia reproductiva, dificulta entender el papel específico del IGF-I, insulina y leptina en la eficiencia reproductiva en ganado posparto (Guzmán et al., en prensa). Recientemente reportamos (capítulo 2) que el uso de un A $\beta$ A en vacas productoras de carne posparto, incrementa la CC por la acumulación de tejido muscular y no tejido adiposo al igual de lo observado en ganado de engorda (Montgomery et al., 2009; Holland et al., 2010). Este cambio en la composición corporal ayuda a diferenciar la relación entre la CC y las concentraciones de IGF-I, insulina y leptina, así como la respuesta a un programa de inducción de estros. Dichos resultados sugieren que en vacas productoras de carne lactantes con baja CC ( $3.1 \pm 1.4$ ) el uso de zilpaterol (A $\beta$ A), a pesar de incrementar la ganancia de peso y la CC, reduce la respuesta a un protocolo de inducción del estro y sugerimos que esto último es debido a la reducción de las concentraciones circulantes de IGF-I. Además, las concentraciones circulantes de leptina no parecen tener un papel preponderante como mediadoras de la respuesta al protocolo de inducción ya que no se observaron diferencias en esta hormona entre las vacas tratadas con zilpaterol y las vacas del grupo control (capítulo 2).

El incremento en el consumo de nutrientes (Bossis et al., 2000) y/o de reservas energéticas (León et al., 2004) aumenta las concentraciones de IGF-I e insulina en sangre. Por su parte aunque las concentraciones de leptina también se elevan por el consumo de nutrientes, su concentración en sangre depende principalmente de la cantidad de tejido adiposo del animal (Chilliard et al., 2001 y 2005). En vacas lecheras y vacas productoras de carne, existe una

correlación positiva entre la concentración de leptina y la CC (Becú-Villalobos et al., 2007; Strauch et al., 2003), y en ganado de engorda, la leptina se correlaciona positivamente ( $P < 0.01$ ) con la cantidad de grasa en la 12a costilla (Geary et al., 2003; Brandt et al., 2007), pero negativamente con el área del músculo *Longissimus dorsi* (Brandt et al., 2007).

Debido a que el incremento en el consumo de nutrientes durante el posparto de vacas productoras de carne mejora su CC y su eficiencia reproductiva y dado que el zilpaterol modifica la composición corporal en vacas posparto, en el presente trabajo se tiene la hipótesis de que en vacas productoras de carne lactando, las cuales son alimentadas para ganar peso y mejorar la respuesta reproductiva, el uso de un A $\beta$ A incrementará el crecimiento magro y reducirá la grasa corporal, lo cual reducirá la concentración de leptina y la respuesta a un protocolo de inducción de estros, incluso si hay un incremento en IGF-I e insulina.

## **Materiales y Métodos**

### *Manejo de animales y localización*

Todos los procedimientos usados en este experimento fueron aprobados por el comité de ética y bienestar animal de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El experimento se llevo a cabo de Junio a Agosto en el rancho experimental “Las Margaritas” localizado en la región subtropical de México. Treinta vacas productoras de carne (*Bos indicus* X *Bos Tauros*) con una condición al parto de corporal promedio de  $4.5 \pm 1$  (1 = emaciada 9 = obesa) y  $75.9 \pm 12$  días posparto (rango 48-96 días) fueron usadas. El peso corporal y la CC al inicio del experimento fueron  $401.8 \pm 50.3$  kg y  $3.1 \pm 0.31$  respectivamente. Las vacas fueron mantenidas en potreros con pastos nativos (*Axonopus*

*argentinus* and *Paspalum notatum*) y amamantando a su becerro durante el periodo experimental.

#### *Alimentación y tratamientos*

Las vacas fueron suplementadas durante un periodo de 60 días con suplemento que cubría el 64% de sus requerimientos de energía metabolizable. El suplemento consistió en alimento comercial (N3), grasa protegida, melaza al 2% de urea y rastrojo de maíz (Cuadro 1). Después de estos 60 días, las vacas recibieron forraje y melaza por un periodo adicional de 20 días. En el potrero se construyeron dos corrales provisionales y se acondicionaron para que las vacas, separadas de su becerro, recibieran la suplementación todos los días aproximadamente a las 8:00 horas. Siete días previos al inicio del experimento las vacas recibieron cantidades ascendentes del suplemento para adaptar los microorganismos del rumen al suplemento, después de este periodo y durante los 60 días de suplementación los animales consumieron aproximadamente 10.2 kg/día. Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos (n=15) balanceados por días posparto y CC. El grupo control recibió el suplemento mientras que el grupo zilpaterol recibió la misma cantidad del suplemento pero adicionada con clorhidrato de zilpaterol (0.15 mg/kg de peso vivo Zilmax® MSD salud animal). Para evitar el efecto de consumo de suplemento sobre la secreción de hormonas metabólicas y el efecto positivo sobre la respuesta a la inducción de estros, doce días posteriores al fin de la suplementación se llevó a cabo un programa de inducción de estros usando un implante de norgestomet (3mg) mas 5mg de valerato de estradiol vía intramuscular (Crestar® MSD salud animal). El implante se retiró a los 9 días y el día del retiro del implante se aplicó una dosis luteolítica de PGF2- $\alpha$  (25 mg). Para reducir el efecto del amamantamiento sobre la secreción de LH se destetó a los becerros por



72 horas (de Medieros et al., 2004) comenzando al retiro del implante. Las vacas fueron detectadas en estro por 72 horas empezando a las 24 horas después de retirar el implante y aquellas en estro se inseminaron aproximadamente 10 horas posteriores al inicio del estro. A los 15 días después del retiro del implante las vacas entraron a un programa de empadre con 42 días de inseminación artificial y 21 días más de servicio natural. La tasa de ovulación y la fertilidad al estro inducido fueron evaluadas por ultrasonografía a los 12 y 30 días después de la primera inseminación.

Cuadro 1. Ingredientes contenidos y análisis químico proximal del suplemento nutricional usado durante el periodo experimental

<b>Ingredient</b>	<b>Control</b>	<b>Zilpaterol</b>
Consumo de alimento (Kg/ día)	5	5
Consumo de grasa de sobre paso (kg/día)	0.2	0.2
Clorhidrato de zilpaterol (mg/ día)	-	75
Melaza con 2% de urea (kg/ día)	2	2
Forraje (kg/day)	3	3
<b>TOTAL</b>	<b>10.2</b>	<b>10.2</b>
<b>Análisis químico proximal de toda la dieta</b>		
Materia seca (%)	83	83
Proteína cruda (%)	9.1	9.1
TND (%)	58.1	58.1
Energía metabolizable (Mcal/kg)	1.95	1.95

### *Composición Corporal y Análisis de Suero*

Las vacas fueron pesadas y la CC registrada desde diez días antes de iniciada la suplementación y cada dos semanas durante todo el periodo experimental. El espesor de la grasa dorsal y la profundidad muscular fueron medidas entre la 12va y 13va vertebra torácica usando un ultrasonido Aloka con una sonda lineal de 3.5 MHz (Brethour, 1992). La relación grasa músculo se calculó dividiendo los mm de grasa dorsal entre los mm de profundidad muscular. Los becerros se pesaron al inicio y al final del periodo experimental para evaluar diferencias en ganancia de peso de estos. Para evaluar los cambios hormonales y metabólicos se seleccionaron al azar 6 animales por grupo para colección de muestras sanguíneas semanales antes de suministrado el suplemento. Los sangrados se iniciaron una semana previa al inicio del experimento y durante todo el periodo experimental. Las muestras de sangre fueron tomadas por punción de la vena o arteria coccígea y se colocaron dentro de tubos con gel activador de la coagulación para obtener suero o en tubos con citrato de sodio para obtener plasma. Para determinar la presencia de actividad lútea se determinó la concentración de progesterona en todas las vacas que fueron sangradas semanalmente desde una semana previo al inicio del experimento y hasta el antes de poner el implante de progestágenos. Inmediatamente después de su colección las muestras de sangre se colocaron sobre hielo y se llevaron al laboratorio dentro de la primera hora para ser centrifugadas a 1000 x g durante 15 min. El suero y el plasma se vaciaron en tubos de polipropileno y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Las concentraciones de IGF-I, insulina, leptina, progesterona, glucosa, NEFAs, urea y triglicéridos fueron determinadas en duplicado de acuerdo a lo reportado en el capítulo 2. El IGF-I, insulina y leptina fueron medidas los días -10, 3, 32, 59, 67 y 78 del periodo

experimental. Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron 9.7% para IGF-I, 1.5% para insulina y 8.23% para leptina. La glucosa, NEFAs, urea y triglicéridos fueron medidos en todas las muestras colectadas. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 3% y 3.9% para glucosa, 6.4% y 9.7% para urea, 17.15 y 17.2% para triglicéridos y 4.8 y 5.3% para NEFAs respectivamente.

### *Análisis Estadístico*

Las diferencias entre grupos experimentales en peso corporal, CC, grasa dorsal y profundidad muscular fueron analizadas por ANOVA. La relación grasa/músculo se analizó mediante una prueba de  $t$  mientras que las diferencias en la respuesta reproductiva se analizaron mediante una prueba de Wilcoxon. Las concentraciones de hormonas y metabolitos se analizaron por medio de un ANOVA para mediciones repetidas incluyendo el tratamiento y el día de colección de la muestra y la interacción como variables fijas y a la vaca anidada dentro del tratamiento como una variable aleatoria.

## **Resultados**

### *Peso corporal, condición corporal, grasa dorsal y profundidad muscular*

La ganancia diaria de peso fue alrededor de 750 g tanto en las vacas en el grupo zilpaterol como en el grupo testigo, sin diferencias entre tratamiento ( $P > 0.05$ ). En ambos grupos hubo un incremento en la CC pero éste fue mayor en las vacas tratadas con zilpaterol ( $P < 0.05$ ; Cuadro 2). Las vacas del grupo zilpaterol tuvieron un incremento  $P < 0.05$  en la profundidad del músculo *Longissimus dorsi* y una reducción  $P < 0.05$  tanto en la grasa dorsal como en la relación grasa/músculo en comparación con las vacas en el grupo testigo (cuadro 2). Finalmente la ganancia diaria de peso de los becerros no fue diferente entre grupos (Cuadro 2).

### *Repuesta al protocolo de inducción de estros*

El porcentaje de animales ciclando antes de la inducción de estros fue de 33% para ambos grupos ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, el número de vacas que presentaron estro y fueron inseminadas después de la inducción de estros fue menor ( $P < 0.05$ ) en las vacas del grupo zilpaterol (8/15) que en las vacas del grupo control (13/15). No se observaron diferencias en la tasa de ovulación ni en la fertilidad a primer servicio ( $P > 0.05$ ). Finalmente, el porcentaje ciclando después de la inducción así como la tasa de preñez se redujeron ( $P < 0.05$ ) en las vacas del grupo zilpaterol (Cuadro 3).

Cuadro 2. Efecto del clorhidrato de zilpaterol sobre el peso corporal, la condición corporal (CC), la grasa dorsal, y la profundidad del músculo, en vacas productoras de carne lactando y suplementadas por un periodo de 60 días con una dieta que cubrió el 64% de sus requerimientos de energía metabolizable.

	<b>Control (n=15)</b>	<b>Zilpaterol (n=15)</b>	<b>SE</b>	<b>P</b>
Peso inicial de las vacas (kg)	413.2	390.4	12.9	0.22
Peso final de las vacas (kg)	462.1	448.7	15.18	0.53
Ganancia diaria de peso de las vacas (kg)	0.753	0.896	0.120	0.39
Peso inicial de los becerros (kg)	96.1	91.2	5.8	0.55
Peso final de los becerros (kg)	160.5	146.6	9.5	0.30
Ganancia diaria de peso de los becerros (kg)	0.991	0.881	70	0.27
CC inicial	3.1	3.1	0.31	0.88
CC final	4.1	5.1	0.38	0.09
Cambio en CC	1	2	0.27	0.01
Grasa dorsal inicial (cm)	0.69	0.71	0.036	0.69
Grasa dorsal final (cm)	0.82	0.65	0.054	0.032
Cambio en grasa dorsal (cm)	0.13	-0.06	0.038	0.002
Profundidad muscular inicial (cm)	3.79	3.69	0.21	0.74
Profundidad muscular final (cm)	4	4.66	0.15	0.005
Cambio en la profundidad muscular (cm)	0.21	0.97	0.18	0.005
Relación grasa/músculo inicial	0.18	0.20	0.01	0.37
Relación grasa/músculo final	0.20	0.14	0.01	0.0003

<sup>a</sup> Las medición de grasa dorsal y profundidad muscular se realizó por ultrasonografía entre la 12va y 13va

vertebra torácica

Cuadro 3. Efecto del clorhidrato de zilpaterol sobre la respuesta a un programa de inducción de estro en vacas productoras de carne lactando y suplementadas por un periodo de 60 días con una dieta que cubrió el 64% de sus requerimientos de energía metabolizable..

	<b>Testigo (n=15)</b>	<b>Zilpaterol (n=15)</b>	<b>P</b>
Vacas ciclando antes de la inducción de estros %	33 (5/15)	33 (5/15)	> 0.05
Vacas inseminadas %	87 (13/15)	53 (8/15)	0.05
Tasa ovulatoria %	73 (11/15)	60 (9/15)	0.44
Fertilidad a estro detectado %	54 (7/13)	63 (5/8)	0.70
Vacas ciclando después de la inducción de estros %	75 (6/8)	30 (3/10)	0.065
Tasa de preñez al final del periodo de empadre (%)	87 (13/15)	53 (8/15)	0.05

### *Hormonas y Metabolitos*

A lo largo del periodo suplementación, las concentraciones de IGF-I se incrementaron en ambos grupos, sin embargo cuando se finalizó la suplementación, IGF-I se redujo. Aunque las concentraciones de IGF-I fueron menores en la vacas del grupo zilpaterol respecto al grupo testigo, solo al momento del retiro del implante de progestágenos hubo una diferencia estadística ( $P < 0.05$ ; Figura 1A). La concentración de insulina se incrementó durante el periodo experimental, sin diferencia entre grupos ( $P > 0.05$ ; Figura 1B). Las concentraciones de leptina no tuvieron cambios en el grupo control a lo largo del periodo experimental y no hubo interacción tiempo por tratamiento, sin embargo en el grupo zilpaterol hubo una reducción con el tiempo ( $P < 0.05$ ). Esto resultó en una diferencia entre el grupo control y el grupo zilpaterol ( $P < 0.05$ ) al momento del retiro del implante (Figura 1C).

Las concentraciones medias de NEFAs, glucosa, urea y triglicéridos se presentan en la figura 2. Las concentraciones de NEFAs se redujeron en ambos grupos con la suplementación, sin diferencias entre ellos ( $P > 0.05$ ). Siete días después de finalizada la suplementación los NEFAs se incrementaron en ambos grupos, pero el incremento en el grupo zilpaterol fue menor ( $P < 0.05$ ) respecto al grupo control (Figure 2A). Las concentraciones de glucosa (Figura 2B) y triglicéridos (Figura 2D) no fueron diferentes entre grupos durante el periodo experimental. Las concentraciones de urea (Figura 2C) fueron muy variables a lo largo del periodo experimental en ambos grupos, sin diferencias entre ellos.



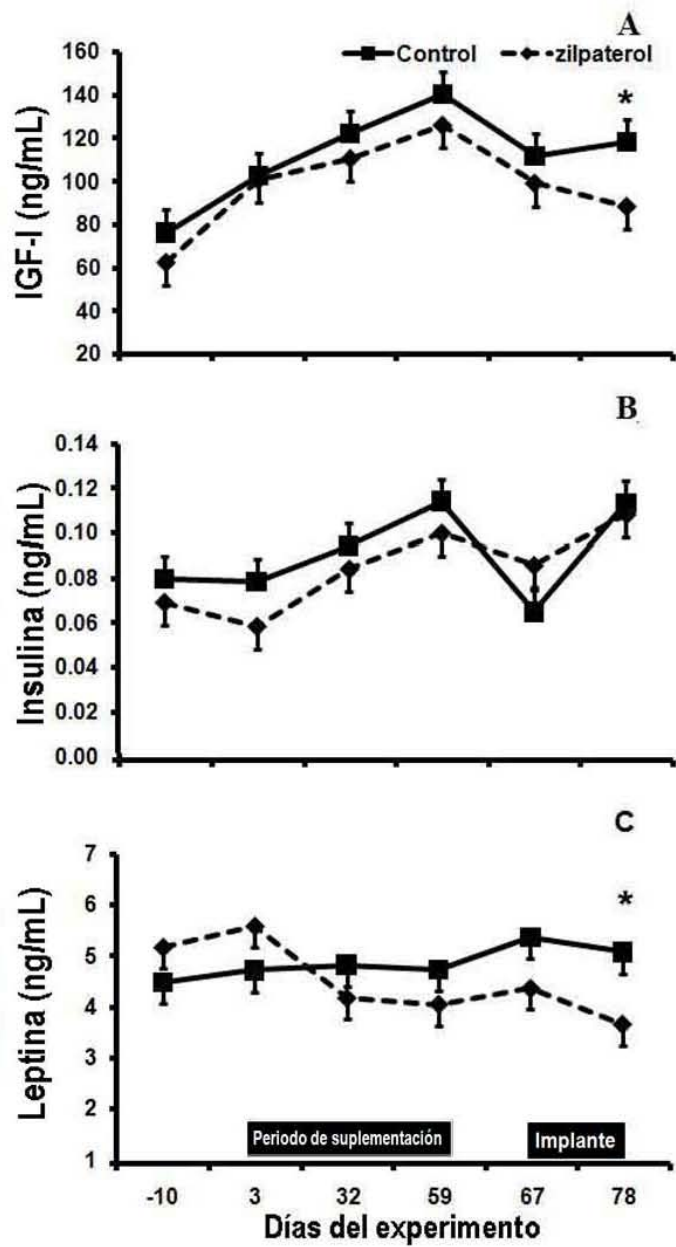


Figura 1. Efecto del clorhidrato de zilpaterol sobre las concentraciones de IGF-I (A), insulina (B) y leptina (C) en vacas productoras de carne lactando y suplementadas por un periodo de 60 días con una dieta que cubrió el 64%

de sus requerimientos de energía metabolizable.. \* muestra diferencia ( $P < 0.05$ ) entre zilpaterol y control en el mismo día

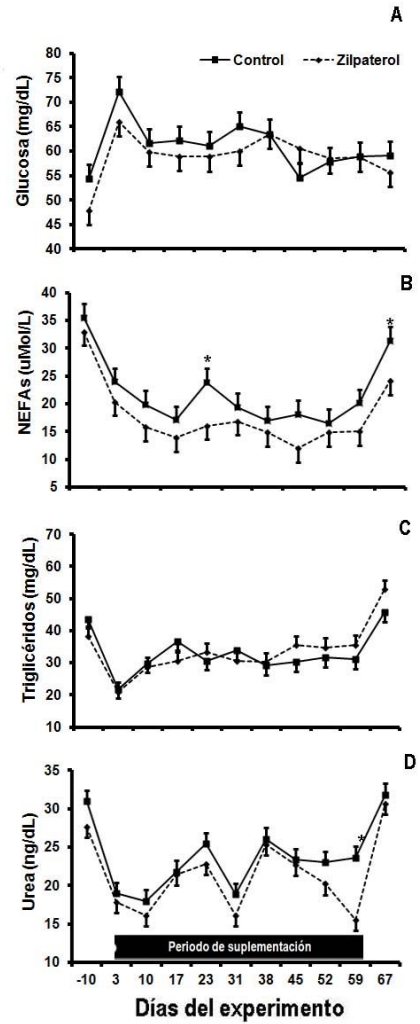


Figura 2. Efecto del clorhidrato de zilpaterol sobre las concentraciones de NEFAs (A), glucosa (B), urea (C) y triglicéridos (D), en vacas productoras de carne lactando y suplementadas por un periodo de 60 días con una dieta que cubrió el 64% de sus requerimientos de energía metabolizable. \* muestra diferencia ( $P < 0.05$ ) entre zilpaterol y control en el mismo día

## **Discusión**

Los resultados del presente trabajo muestran que en vacas posparto alimentadas con una dieta para acumular reservas de energía corporal, el tratamiento con zilpaterol incrementa la CC por una acumulación de masa muscular sin aumento en grasa dorsal. Esta condición de la composición corporal se acompañó de una reducción en las concentraciones de IGF-I y leptina, sin efecto sobre insulina. La reducción de IGF-I y leptina en el grupo tratado con zilpaterol fue acompañada con una reducción en el número de vacas en estro, vacas ciclando y tasa de preñez.

La cantidad de reservas energéticas ha sido asociada con la eficiencia reproductiva en vacas productoras de carne (Hess et al., 2005; Crowe, 2008). Por ejemplo, el ganado productor de carne en anestro nutricional o anestro posparto alimentado con una dieta para ganar entre 0.9 y 1.5 kg/día, gana más CC y reinicia su actividad ovárica más rápido que el ganado alimentado para ganar de entre 0.45 y 0.6 kg/día (Bossis et al., 2000; Ciccioli et al., 2003). De la misma manera, las vacas que paren con  $CC \geq 5$  tienen un anestro posparto 30 días más corto que vacas que paren con menos de 5 puntos CC en la escala de 1 a 9 (Lents et al., 2008). En el presente experimento, el número de vacas inseminadas, el de vacas ciclando después de la inducción de estros y la tasa de preñez fueron reducidas en un 39%, 60% y 39% en vacas tratadas con zilpaterol en comparación con vacas testigo. Debido a que el incremento de la CC ocasionado por el zilpaterol fue por un aumento en tejido muscular más que de tejido graso, estos resultados así como reportes previos de nuestro grupo de trabajo (capítulo 2) apoyan la teoría de que la acumulación de grasa en el tejido adiposo es necesaria y afecta positivamente la eficiencia reproductiva en animales posparto (Lamond , 1970). Sin embargo es importante señalar que el incremento de masa muscular ocasionado por zilpaterol puede incrementar las demandas de energía de animal y reducir la respuesta

al protocolo de inducción de estros, ya que en el experimento del capítulo 2, los animales solo incrementaron masa muscular sin cambios en grasa dorsal pero también tuvieron pobre desempeño reproductivo (capítulo 2).

El IGF-I, la insulina y la leptina han sido sugeridos como los principales mediadores químicos entre el estatus energético del animal y su función reproductiva (Wettemann et al., 2003; Hess et al., 2005). En el presente experimento durante el periodo de suplementación hubo un incremento en IGF-I en ambos grupos. Sin embargo 19 días después de finalizada la suplementación hubo una reducción de IGF-I en vacas tratadas con zilpaterol, pero no en las vacas del grupo testigo. De esta manera al momento del retiro del implante de progestágenos, el IGF-I fue 25.4% menor en el grupo zilpaterol respecto al grupo testigo y casi 50% mayor que en las vacas tratadas con zilpaterol en el experimento del capítulo 2, sin embargo la respuesta reproductiva en las vacas tratadas con zilpaterol en el presente experimento es similar a la respuesta de las vacas del grupo control en el experimento del capítulo 2. La baja CC en vacas y novillas reduce la secreción de LH y las concentraciones de IGF-I e induce anestro nutricional (Richards et al., 1991; Bossis et al., 2000). Mientras que la realimentación de los animales incrementa la CC (León et al., 2004), se restablece la secreción de LH y hay un incremento en las concentraciones de IGF-I (Bossis et al., 2000). Nuestros resultados sugieren la reducción de IGF-I, debido a que la reducción de la grasa corporal (León et al., 2004), o el balance energético negativo en que entraron los animales del grupo zilpaterol compromete el reinicio de la actividad ovárica posparto, a pesar del incremento en CC. Resultados previos de nuestro grupo de trabajo sustentan esta hipótesis, ya que aunque el zilpaterol incrementa la CC, las concentraciones

de IGF-I son bajas y mantienen la relación entre sus concentraciones y la eficiencia reproductiva en ganado posparto (Capítulo 2).

La leptina es producida principalmente por los adipocitos y su concentración está en relación directa con la cantidad grasa acumulada en el tejido adiposo de los animales (Chilliard et al., 2005). Además, la leptina estimula la secreción de LH en vacas productoras de carne (Zieba et al., 2003). Por lo anterior, la leptina ha sido considerada como un importante mediador entre el estatus energético y el reinicio de la actividad ovárica posparto (Hess et al., 2005). En el presente experimento al momento del retiro del implante de progestágenos, a pesar del incremento en CC en la vacas tratadas con zilpaterol, hubo una reducción del 27.9% en las concentraciones de leptina (3.6 ng/mL) respecto a las vacas control (5.1 ng/mL). En acuerdo con estos resultados, Strauch et al. (2003) reportan que en vacas que paren con buena CC (7 en escala de 1 a 10) hay un correlación negativa (-0.27) entre la duración de anestro posparto y las concentraciones de leptina, además de que vacas con un anestro posparto corto (30 a 37 días) tienen mayor concentración de leptina (5.9 ng/mL) que vacas con anestro posparto largo (78 a 132 días). En contraste, en animales con baja CC ( $\leq 4$ ), Ciccicoli et al. (2003) y Konigsson et al. (2008), no encontraron asociación entre las concentraciones de leptina (alrededor de 2.5 ng/mL) y la eficiencia reproductiva en vacas productoras de carne posparto. Los resultados del presente experimento y las evidencias arriba presentadas, sugieren que en animales con buena CC las concentraciones de leptina se incrementan debido al incremento de grasa corporal y de esta manera pueden favorecer el reinicio de la actividad ovárica.

Las concentraciones de insulina oscilan a lo largo del día y se sabe que la cantidad de reservas energéticas y el consumo de nutrientes son los principales factores que controlan su secreción (Hayirli, 2006). El papel de la insulina sobre la eficiencia reproductiva en ganado productor de carne es poco claro y se asocia con otras hormonas metabólicas. En el presente experimento las concentraciones de insulina no difirieron entre el grupo control y el grupo zilpaterol. En contraste, recientemente reportamos que en vacas amamantando con baja CC ( $3.1 \pm 1.4$ ) el zilpaterol reduce la concentración de insulina y la respuesta a un protocolo de inducción de estros, aunque la insulina no es predictiva de actividad lútea pos-inducción de estros (capítulo 2). Las diferencias encontradas entre estos dos trabajos se pueden deber a que en el presente experimento los animales fueron suplementados con aproximadamente el 64% de sus requerimiento de energía metabolizable, lo cual incrementó las concentraciones de insulina, mientras que en el experimento previo, los animales fueron suplementado con poca cantidad de concentrado (2kg/animal/día; 20 de requerimientos de EM) y tenían baja CC, por lo tanto el cambio en acumulación de reservas de energía pudo ocasionar la reducción de insulina (Capítulo 2). Además los animales en el presente experimento recibieron forraje y melaza desde el final del consumo del concentrado y hasta el retiro del implante, lo cual pudo incrementar las concentraciones en sangre de insulina.

Aunque IGF-I, insulina y leptina son los principales mediadores entre el estatus energético y la función reproductiva, otras hormonas producidas por el tejido adiposo como la adiponectina y la resistina pueden estar involucradas. Las concentraciones de adiponectina se incrementan con el ayuno y la pérdida reservas corporales de energía (Michalakis y Segars, 2010) y la adiponectina inhibe la secreción de GnRH y LH (Lu e tal., 2008, Wen et

al., 2008; Michalakis y Segars, 2010). En ratas macho, la infusión intracerebroventricular, de adiponectina reduce la frecuencia pulsátil de LH comparado con el control o el nivel basal, además en cultivo de neuronas productoras de GnRH, el tratamiento con adiponectina reduce la secreción de GnRH (Cheng et al., 2011) por reducir el potencial de membrana (Wen et al., 2008). Por su parte la resistina esta correlacionada positivamente con la cantidad de grasa corporal (Tortoriello et al., 2007) y sus efectos sobre la función reproductiva no son muy claros (Metwally et al., 2008), sin embargo en cultivo de células foliculares de folículos grandes (8 a 22 mm) de vaca, la resistina incrementa la producción de estradiol mediada por FSH e IGF-I (Spicer et al., 2011). En el presente experimento la reducción de grasa dorsal y el incremento en masa muscular podría estar asociado a un incremento en la concentración de adiponectina y una reducción de resistina que contribuyo a la reducida respuesta al protocolo de inducción de estros.

Las concentraciones de NEFAs, glucosa, urea y triglicéridos son buenos indicadores del metabolismo energético del animal, estos metabolitos no han sido asociados con la eficiencia reproductiva en vacas posparto (Hess et al., 2005). En el presente experimento, la suplementación redujo las concentraciones de NEFAs. Sin embargo 8 días después de finalizada la suplementación los NEFAs se incrementaron. El incremento en NEFAs fue menor en vacas tratadas con zilpaterol probablemente debido a la menor cantidad de grasa corporal ocasionada por el A $\beta$ A. Aunque se ha visto que las vacas que quedan gestantes después del protocolo de inducción de estros tienen menor concentración de NEFAs que las vacas no gestantes (Grimard et al., 1997), en el presente experimento las concentraciones de NEFAs no estuvieron relacionadas con la respuesta reproductiva. Igualmente las concentraciones de glucosa no fueron diferentes entre grupos a lo largo del periodo

experimental y no parecen influir la respuesta reproductiva. Resultados similares han sido reportados por Vizcarra et al. (1998) y Ciccioli et al. (2003), quienes no encontraron relación entre las concentraciones de glucosa y el retorno a la ciclicidad en vacas productoras de carne durante el posparto.

El incremento de la estimulación beta adrenérgica del ovario se relaciona con la formación de quistes foliculares en vacas (Paredes et al., 2011) y ratones (Barria et al., 1993). Esto sugiere que un efecto directo del zilpaterol sobre el ovario pudo ser la causa de la baja respuesta al protocolo de inducción de estros. Sin embargo, en el experimento 1 (capítulo 2; datos no presentados), el diámetro del folículo ovulatorio al momento de la inseminación, evaluado mediante ultrasonografía, no fue diferente entre grupos ( $15.2 \pm 3.2$  mm grupo zilpaterol vs  $14.9 \pm 3.3$  mm grupo testigo) y en ninguna vaca se observó diámetro folicular ( $>25$  mm) que sugiriera presencia de un quiste folicular. En novillas en las cuales se sincronizó la ola de crecimiento folicular con GnRH, el tratamiento con zilpaterol por 8 días incrementó el diámetro del folículo ovulatorio ( $14.04 \pm 0.44$  mm grupo zilpaterol vs  $12.9 \pm 0.44$  mm grupo testigo) pero sin presencia de quistes foliculares (datos sin publicar). Además, aunque el método de inducción de estros (GnRH induce ovulación de quistes) y la raza pudieron influir (animales de *bos-taurus* tienen anestro posparto menor que *bos-indicus*), resultados en vacas con CC alta el tratamiento con zilpaterol no se afecta la fertilidad a primer servicio (Capítulo 4).

Los efectos del zilpaterol sobre la composición corporal y la eficiencia productiva en novillos de engorda han sido evaluados ampliamente (Avendaño-Reyes et al., 2006; Vasconcelos et al., 2008; Elam et al., 2009; Montgomery et al., 2009; Holland et al., 2010).



En el presente experimento el zilpaterol no mejoró la ganancia diaria de peso, pero sí incremento la profundidad muscular y redujo la grasa dorsal. Resultados similares fueron reportados en novillos, donde se muestra que la suplementación con zilpaterol durante los últimos 20, 30 o 40 días del periodo de engorada, incrementa el área del músculo *Longissimus dorsi* y reduce la grasa total de la 12va costilla sin afectar la ganancia diaria de peso (Vasconcelos et al., 2008; Holland et al., 2010). En contraste en otros trabajos el tratamiento con zilpaterol incrementa la ganancia de peso (Elam et al., 2009) pero no modifica la grasa dorsal (Beckett et al., 2009).

En conclusión, los resultados de este experimento muestran que vacas suplementados con una dieta alta en energía para acumular grasa en el tejido adiposo, el uso de zilpaterol incrementa la acumulación de masa muscular y no de tejido adiposo, lo cual pudo comprometer la respuesta a un protocolo de inducción de estros. Además, las vacas que presentaron baja respuesta reproductiva bajo estas condiciones experimentales, tuvieron una reducción en las concentraciones de IGF-I y leptina, pero no de insulina.

### **Agradecimientos**

El soporte financiero del proyecto fue por parte del Macroproyecto SDEI-PTID-7.31, UNAM. A. Guzmán Agradece al CONACyT por la beca otorgada para llevar a cabo sus estudios de Doctorado. Agradecemos también a Dr. Perera, M en C. Rodriguez y M en C. Rojas por su apoyo en la cuantificación de hormonas y metabolitos.

### **Referencias**

Avendaño-Reyes L, Torres-Rodríguez V, Meraz-Murillo FJ, Pérez-Linares C, Figueroa-Saavedra F, Robinson PH. 2006. Effects of two beta-adrenergic agonists on finishing

performance, carcass characteristics, and meat quality of feedlot steers. *J Anim Sci.* 84(12):3259-3265.

Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. 1993. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology.* 133(6):2696-703.

Beckett JL, Delmore RJ, Duff GC, Yates DA, Allen DM, Lawrence TE, Elam N. 2009. Effects of zilpaterol hydrochloride on growth rates, feed conversion, and carcass traits in calf-fed Holstein steers. *J Anim Sci.* 87(12):4092-4100.

Becú-Villalobos D, García-Tornadú I, Shroeder G, Salado EE, Gagliostro G, Delavaud C, Chilliard Y, Lacau-Mengido IM. 2007. Effect of fat supplementation on leptin, insulin-like growth factor I, growth hormone, and insulin in cattle. *Can J Vet Res.* 71(3):218-225.

Blache D, Martin GB. 2009. Multi-dimensional control of the reproductive system by nutrition. Congreso, Innovaciones en Reproducción Animal. Colegio de Posgraduados del 23 al 25 de Septiembre. Estado de México.

Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra J, Spicer LJ. 2000. Nutritionally induced anovulation in beef Heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol Reprod.* 62(5):1436-44.

Brandt MM, Keisler DH, Meyer DL, Schmidt TB, Berg EP. 2007. Serum hormone concentrations relative to carcass composition of a random allotment of commercial-fed beef cattle. *J Anim Sci.* 85(1):267-275

Brethour JR. 1992. The repeatability and accuracy of ultrasound in measuring backfat of cattle. *J Anim Sci.* 70(4):1039-1044.

Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR, Lucy MC, Martin GB, Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW, Webb R. 2007. Invited review: New

perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 90(9):4022-32.

Cheng XB, Wen JP, Yang J, Yang Y, Ning G, Li XY. 2011. GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Endocrine.* 39(1):6-12.

Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Faulconnier Y, Leroux C, Djiane J, Bocquier F. 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol.* Nov;21(4):271-95.

Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M. 2005. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 29(1):3-22.

Chilliard, Y., Delavaud, C., Bonnet, M., 2005. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 3-22.

Ciccioli NH, Wettemann RP, Spicer LJ, Lents CA, White FJ, Keisler DH. 2003. Influence of body condition at calving and postpartum nutrition on endocrine function and reproductive performance of primiparous beef cows. *J Anim Sci.* 81(12):3107-3120.

Crowe MA. 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 43 Suppl 5:20-28.

Crowe, M. A., 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43(Suppl. 5), 20-28.

de Medeiros Bastos G, Brenner RH, Willke FW, Neves JP, de Oliveira JF, Bragança JF, Machado SA, Porciúncula PM, Gonçalves PB. 2004. Hormonal induction of ovulation and

artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. *Theriogenology*. 1;62(5):847-53.

Elam NA, Vasconcelos JT, Hilton G, VanOverbeke DL, Lawrence TE, Montgomery TH, Nichols WT, Streeter MN, Hutcheson JP, Yates DA, Galyean ML. 200. Effect of zilpaterol hydrochloride duration of feeding on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *J Anim Sci*. 87(6):2133-41.

Geary TW, McFadin EL, MacNeil MD, Grings EE, Short RE, Funston RN, Keisler DH. 2003. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *J Anim Sci*. 81(1):1-8.

Grimard B, Humblot P, Mialot JP, Jeanguyot N, Sauvant D, Thibier M. 1997. Absence of response to oestrus induction and synchronization treatment is related to lipid mobilization in suckled beef cows. *Reprod Nutr Dev*. 37(2):129-40.

Grimard, B., Humblot, P., Mialot, J. P., Jeanguyot, N., Sauvant, D., Thibier, M., 1997. Absence of response to oestrus induction and synchronization treatment is related to lipid mobilization in suckled beef cows. *Reprod. Nutr. Dev*. 37, 129-140.

Hayirli A. 2006. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet Res Commun*. 30(7):749-74.

Hess BW, Lake SL, Scholljegerdes EJ, Weston TR, Nayigihugu V, Molle JDC, and Moss GE. 2005. Nutritional controls of beef cow reproduction. *J Anim Sci*, 83: E90 - 106.

Holland BP, Krehbiel CR, Hilton GG, Streeter MN, Vanoverbeke DL, Shook JN, Step DL, Burciaga-Robles LO, Stein DR, Yates DA, Hutcheson JP, Nichols WT, Montgomery JL. 2010. Effect of extended withdrawal of zilpaterol hydrochloride on performance and carcass traits in finishing beef steers. *J Anim Sci*. 88(1):338-348.

Holland BP, Krehbiel CR, Hilton GG, Streeter MN, Vanoverbeke DL, Shook JN, Step DL, Burciaga-Robles LO, Stein DR, Yates DA, Hutcheson JP, Nichols WT, Montgomery JL. 2010. Effect of extended withdrawal of zilpaterol hydrochloride on performance and carcass traits in finishing beef steers. *J Anim Sci.* 88(1):338-348.

Konigsson K, Savoini G, Govoni N, Invernizzi G, Prandi A, Kindahl H, Veronesi MC. 2008. Energy balance, leptin, NEFA and IGF-I plasma concentrations and resumption of post partum ovarian activity in Swedish Red and White breed cows. *Acta Vet Scand.* 9;50:3.

Lamond, D. R., 1970. The influence of undernutrition on the reproduction of the cow. *Anim. Breed. Abstr.* 38, 359-372.

Lents CA, White FJ, Ciccioioli NH, Wettemann RP, Spicer LJ, Lalman DL. 2008. Effects of body condition score at parturition and postpartum protein supplementation on estrous behavior and size of the dominant follicle in beef cows. *J Anim Sci.* 86(10):2549-56.

León HV, Hernández-Cerón J, Keislert DH, Gutiérrez CG. 2004. Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J Anim Sci.* 82(2):445-451.

Lu JY, Huang KC, Chang LC, Huang YS, Chi YC, Su TC, Chen CL, Yang WS. 2008. Adiponectin: a biomarker of obesity-induced insulin resistance in adipose tissue and beyond. *J Biomed Sci.* 15(5):565-76.

Metwally M, Ledger WL, Li TC. 2008. Reproductive endocrinology and clinical aspects of obesity in women. *Ann N Y Acad Sci.* 1127:140-146.

Michalakis KG, Segars JH. 2010. The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertil Steril.* 94(6):1949-57.

Montgomery JL, Krehbiel CR, Cranston JJ, Yates DA, Hutcheson JP, Nichols WT, Streeter MN, Bechtol DT, Johnson E, TerHune T, Montgomery TH. 2009. Dietary zilpaterol hydrochloride. I. Feedlot performance and carcass traits of steers and heifers. *J Anim Sci.* 87(4):1374-83.

Paredes AH, Salvetti NR, Diaz AE, Dallard BE, Ortega HH, Lara HE. 2011. Sympathetic nerve activity in normal and cystic follicles from isolated bovine ovary: local effect of beta-adrenergic stimulation on steroid secretion. *Reprod Biol Endocrinol.* 16;9:66.

Richards MW, Wettemann RP, Spicer LJ, Morgan GL. 1991. Nutritional anestrus in beef cows: effects of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. *Biol Reprod.* 44(6):961-966.

Spicer LJ, Schreiber NB, Lagaly DV, Aad PY, Douthit LB, Grado-Ahuir JA. 2011. Effect of resistin on granulosa and theca cell function in cattle. *Anim Reprod Sci.* 124(1-2):19-27.

Strauch TA, Neuendorff DA, Brown CG, Wade ML, Lewis AW, Keisler DH, Randel RD. 2003. Effects of lasalocid on circulating concentrations of leptin and insulin-like growth factor-I and reproductive performance of postpartum Brahman cows. *J Anim Sci.* 81(6):1363-1370.

Tortoriello DV, McMinn JE, Chua SC. 2007. Increased expression of hypothalamic leptin receptor and adiponectin accompany resistance to dietary-induced obesity and infertility in female C57BL/6J mice. *Int J Obes (Lond).* 31(3):395-402.

Vasconcelos JT, Rathmann RJ, Reuter RR, Leibovich J, McMeniman JP, Hales KE, Covey TL, Miller MF, Nichols WT, Galyean ML. 2008. Effects of duration of zilpaterol hydrochloride feeding and days on the finishing diet on feedlot cattle performance and carcass traits. *J Anim Sci.* 86(8):2005-2015.

Vizcarra JA, Wettemann RP, Spitzer JC, Morrison DG. 1998. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *J Anim Sci.* 76(4):927-936.

Wen JP, Lv WS, Yang J, Nie AF, Cheng XB, Yang Y, Ge Y, Li XY, Ning G. 2008. Globular adiponectin inhibits GnRH secretion from GT1-7 hypothalamic GnRH neurons by induction of hyperpolarization of membrane potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 371(4):756-61.

Wettemann, R. P., Lents, C. A., Ciccioli, N. H., White F. J., Rubio, I., 2003. Nutritional- and suckling-mediated anovulation in beef cows. *J. Anim. Sci.* 81, E48-E59.

Zieba, D. A., Amstalden, M., Maciel, M. N., Keisler, D. H., Raver, N., Gertler, A., Williams, G. L., 2003. Divergent effects of leptin on luteinizing hormone and insulin secretion are dose dependent. *Exp. Biol. Med.* 228, 325-330.

## Capítulo 4

**El uso de un agonista beta-adrenérgico ( $\beta$ AR) en vacas productoras de carne posparto con condición corporal alta, reduce la grasa corporal pero no la respuesta a un programa de inducción de estro.**

Artículo en preparación



**El uso de un agonista beta-adrenérgico ( $\beta$ AR) en vacas productoras de carne posparto con condición corporal alta, reduce la grasa corporal pero no la respuesta a un programa de inducción de estro.**

## **Resumen**

En estudios previos el uso de un  $A\beta$ A (zilpaterol) disminuyó la respuesta a un programa de inducción de estros en vacas con baja condición corporal alimentadas para acumular (capítulo 3) o no (capítulo 2) reservas energéticas. Esta reducción en la respuesta a la inducción de estro se asoció a la reducción en grasa corporal ocasionada por el zilpaterol, sin embargo no sabemos si en vacas con alta CC el zilpaterol puede reducir la grasa corporal para afectar la eficiencia reproductiva posparto, y los cambios metabólicos asociados al uso de zilpaterol. Por lo anterior el objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de un  $\beta$ AR sobre la respuesta reproductiva a un programa de inducción de estros en vacas de carne con CC alta donde las reservas corporales de energía son elevadas. En vacas angus lactando ( $n=112$ ) con  $34\pm 9$  días postparto,  $CC= 7\pm 0.6$  y  $630\pm 76.8$  kg de peso vivo fueron asignadas al grupo zilpaterol ( $n=46$ ) y al grupo testigo ( $n = 66$ ). Las vacas recibieron 0.900 kg de maíz molido/vaca/d, y al grupo zilpaterol se le adicionó 0.15 mg/kg de peso de zilpaterol. El día 40 de suplementación, los animales fueron sincronizados usando CIDR (5 días), dos inyecciones de GnRH (al insertar el CIDR y al momento de la inseminación), y dos inyecciones de PGF2- $\alpha$  (al retiro del CIDR y 8 h después). Los animales se inseminaron a tiempo fijo 72 horas posteriores al retiro del CIDR. El  $\beta$ AR mejoró el peso vivo y redujo la grasa dorsal y del glúteo. El  $\beta$ AR no afectó la respuesta a la inducción de estro, ni las concentraciones de leptina e IGF-I. En conclusión en vacas de carne lactando con CC alta, la reducción de grasa corporal por efecto del  $\beta$ AR no afecta la

respuesta reproductiva a la sincronización. Esto puede ser debido a que la reducción en grasa no es suficiente para afectar las concentraciones de IGF-I ni leptina y por lo tanto tampoco la respuesta reproductiva a la inducción de estros.

**Palabras clave:** IGF-I, leptina, inducción de estros, metabolitos, vacas productoras de carne, anestro posparto.

## Introducción

La condición corporal (CC) es una buena herramienta que nos permite estimar las reservas energéticas corporales y su relación con el desempeño reproductivo en vacas productoras de carne (Crowe et al., 2008). No obstante, en vacas productoras de carne lactando, la reducción de grasa corporal (capítulo 3) o la reducción en la relación grasa/músculo (capítulo 2) inducida por el uso de un agonista beta adrenérgico (A $\beta$ A) reduce la respuesta reproductiva a un protocolo de inducción de estros aun cuando hay un incremento en CC. Las vacas lactando con baja CC ( $2.9 \pm 0.20$ ) que reciben el A $\beta$ A más 2 kg/animal/día de alimento comercial como vehículo, tienen mayor ganancia de peso corporal (375g/día) y CC ( $3.6 \pm 0.13$ ) que el grupo testigo (ganancia peso = 41 g/día y CC =  $3.1 \pm 0.13$ ). Sin embargo, el incremento de CC en los animales tratados con el A $\beta$ A fue por un incremento en masa muscular y no tejido adiposo, condición que estuvo relacionada con una reducción de la tasa de ovulación y la ciclicidad después de la inducción de estros (capítulo 2). Por otra parte en animales (CC =  $3.1 \pm 0.31$ ) que recibieron una dieta para inducir una tasa mayor de ganancia de peso en el posparto, el uso del A $\beta$ A indujo un mayor incremento en CC (+ 2 vs +1 puntos) y profundidad del músculo Longissimus dorsi (0.97 vs 0.21 cm), pero con reducción de la grasa dorsal (-0.06 vs 0.13 cm) respecto al grupo control (capítulo 3). Asimismo, los animales tratados con el A $\beta$ A tuvieron una respuesta a un protocolo de inducción de estros menos eficiente que los del grupo control (capítulo 3). Estos experimentos muestran que la CC puede no ser el mejor indicador de la composición corporal, pero apoyan la hipótesis de que vacas productoras de carne posparto deben tener o acumular cierta cantidad de tejido adiposo para tener un mejor desempeño reproductivo.

El IGF-I, la insulina y la leptina han sido sugeridas como los principales mediadores químicos entre el estatus energético y la eficiencia reproductiva en ganado posparto (Hess et al., 2005). En reportes previos en vacas con baja CC ( $3.3 \pm 0.13$ ), las concentraciones de IGF-I estuvieron asociadas con la ocurrencia de actividad lútea después de la inducción de estros, sin aparente influencia de insulina y leptina. Además el tratamiento con el A $\beta$ A redujo las concentraciones de IGF-I e insulina. Por otra parte en vacas con una CC moderada ( $5.1 \pm 0.38$ ) animales tratados con zilpaterol tuvieron concentraciones de IGF-I y leptina menores que vacas del grupo control (capítulo 3). Estos resultados permiten sugerir que IGF-I puede ser el principal mediador entre las reservas energéticas y la función reproductiva en vacas posparto, sin embargo bajo cierta cantidad de tejido adiposo, la leptina puede alcanzar un umbral en sus concentraciones para favorecer el reinicio de la actividad ovárica posparto. Basados en estas evidencias el objetivo del presente trabajo fue evaluar si la suplementación con zilpaterol ( $\beta$ AR) durante el posparto temprano de vacas productoras de carne con CC alta reduce la grasa corporal y la respuesta a un protocolo de inducción de estros y así mismo describir la asociación entre las hormonas metabólicas (IGF-I y leptina) con la respuesta reproductiva a la inducción de estros.

## **Materiales y Métodos**

### *Animales y Tratamientos*

El presente experimento se realizó en una granja que pertenece al sistema penitenciario del estado de Virginia USA de noviembre 2008 a Enero 2009. Se usaron 112 vacas lactando de la raza Angus con  $34 \pm 9$  días posparto, CC =  $7 \pm 0.6$  (1 = emaciada 9 = obesa) y un peso corporal de  $630 \pm 76.8$  kg. Durante el periodo experimental de 45 días, las vacas estuvieron alojadas en potreros con pasturas naturales y recibían todas las mañanas 6.8 kg/animal/día

de ensilado de maíz. Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos los cuales estuvieron balanceados por días posparto y CC. El grupo control (n=66) fue suplementado con 900 g/animal/día de maíz molido en tanto que el grupo zilpaterol (n=46) recibió la misma cantidad de maíz molido mas clorhidrato de zilpaterol (0.15 mg/kg de peso vivo; Zilmax® MSD salud animal). Al día 40 después de iniciada la suplementación se colocó un dispositivo intravaginal de liberación controlado (CIDR) más una inyección de GnRH (Cystorelin 100 mcg/ mL/vaca Merial ®). El CIDR fue retirado 5 días después de la inserción, se dieron dos inyecciones de PGF2- $\alpha$  (Lutalyse 25 mg/ vaca Pfizer ®) con un intervalo de 8 horas y se colocaron parches kamar como auxiliares en la detección de estros. Los animales en estro se detectaron al momento de la inseminación de acuerdo al color del kamar. Las vacas fueron inseminadas a tiempo fijo aproximadamente 72 horas después del retiro del CIDR y se usó una segunda aplicación de GnRH al momento de la inseminación.

#### *Colección de datos de campo*

Todas las vacas fueron pesadas y se calificó la CC antes del inicio del experimento y a los 21 y 45 días del periodo experimental. Adicionalmente, en 33 vacas por grupo en los mismos días mencionados se midió la grasa dorsal a la altura de la 12a costilla (capítulo 2), y sobre el glúteo (Schröder and Staufenbiel, 2006) así como la profundidad del músculo *Longissimus dorsi* (capítulo 2) por medio de ultrasonografía usando un equipo Aloka SSD-500 con una sonda lineal de 3.5 Mhz. Los becerros fueron pesados al inicio y final del periodo experimental para evaluar los efectos del zilpaterol sobre la ganancia de peso de los becerros.

### *Muestras de suero y plasma y determinación de hormonas y metabolitos*

Los cambios en IGF-I, leptina, glucosa NEFAS, urea y triglicéridos se evaluaron en seis animales por grupo que fueron seleccionados al azar. Semanalmente se obtuvieron 15 mL de sangre de la vena yugular mediante un jeringa y se pusieron 10 mL de sangre en un tubo con gel activador de la coagulación para obtener suero y los restantes 5 mL de sangre se colocaron dentro de un tubo con heparina y litio para obtener plasma. Las muestras se pusieron inmediatamente sobre hielo y se trasladaron dentro de la primera hora al laboratorio donde se centrifugaron a 1000 x g durante 15 min. El suero y el plasma se vaciaron en tubos diferentes y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Adicionalmente se tomaron muestras de suero de todas las vacas dos veces (con un intervalos de 7 días entre ellas) antes del inicio del experimento y previo a la inserción del CIDR para evaluar el porcentaje de animales con actividad lútea mediante la cuantificación de progesterona. Los animales con más de 1ng/mL de progesterona fueron considerados con actividad lútea (Zalesky et al., 1984).

Las concentraciones de IGF-I y leptina fueron determinadas por RIA de acuerdo a lo reportado por Ciccioli et al. (2003). Los coeficientes de variación en el ensayo de IGF-I fueron 14.6 % para la dosis baja (34.21 ng/mL) y 10.3% para la dosis alta (92.5 ng/mL). Los coeficientes de variación del ensayo de leptina fueron 6.27% para la dosis baja (3.26 ng/mL) y 14.4 para la dosis alta (7.37 ng/mL). Las concentraciones de glucosa, NEFAs, urea y triglicéridos se determinaron de acuerdo a lo reportado en el capítulo 2. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 6.3 y 6.1% para glucosa, 5.5 y 3.8% para NEFAs, 2.5 y 4.2% para urea y 8.4 y 12.3% para triglicéridos.

### *Análisis estadístico*

Para todos los análisis los datos de dos vacas del grupo testigo se eliminaron debido a que se mezclaron con las del grupo zilpaterol. Los datos de peso, condición corporal y profundidad muscular fueron analizados por ANOVA usando las respectivas mediciones iniciales como covariable y los grupos experimentales como tratamientos. La ganancia diaria de peso de los becerros fue analizada por t-student. Las variables reproductivas fueron analizadas mediante la prueba de Wilcoxon. Debido a que, en las vacas que se sangraron periódicamente se obtuvo una muestras de grasa al momento del retiro de CIDR en el área del maslo de la cola mediante cirugía, para evitar complicaciones de ésta, estos animales no se incluyeron en los análisis de porcentajes de animales en estro, animales en estro resultaron gestantes y animales que no presentaron estro y se gestaron. Los cambios en grasa dorsal y del glúteo, así como las concentraciones de metabolitos fueron analizadas mediante un ANOVA de mediciones repetidas incluyendo el tratamiento, el día de muestreo y la interacción como variables fijas y la vaca anidada dentro del tratamiento como variable aleatoria. Finalmente, las concentraciones de IGF-I y leptina fueron analizadas mediante un ANOVA de mediciones repetidas, usando la concentración inicial como covariable.

## **Resultados**

*Peso corporal, condición corporal (CC), profundidad muscular y grasa dorsal y del glúteo*

Los resultados de peso corporal, CC y profundidad muscular se presentan en el cuadro 1. Las vacas tratadas con zilpaterol tuvieron en promedio mayor peso al final ( $P < 0.05$ ) del periodo de tratamiento respecto al grupo testigo. Las vacas en el grupo testigo perdieron alrededor de 400 g de peso diarios, mientras que las vacas en el grupo zilpaterol no perdieron peso corporal ( $P < 0.05$ ). El tratamiento con zilpaterol no afectó la ganancia diaria de peso de los becerros ( $P > 0.05$ ). La CC, el cambio de CC, la profundidad muscular y el cambio en profundidad muscular, al final del periodo experimental no fueron diferentes ( $P > 0.05$ ) entre grupos (cuadro 1). Finalmente la grasa dorsal (Figura 1A) y la del glúteo (Figura 1 B) fueron reducidas ( $P < 0.05$ ) durante el periodo experimental en ambos grupos. Sin embargo, la reducción en grasa dorsal y la grasa en el área del glúteo fue mayor ( $P < 0.05$ ) en las vacas tratadas con zilpaterol respecto al grupo control



Cuadro 1. Efecto de la suplementación con zilpaterol durante 45 días sobre el peso corporal, la condición corporal (CC) y la profundidad muscular en vacas productoras de carne lactando.

	<b>Control (n=64)</b>	<b>Zilpaterol (n=46)</b>	<b>P</b>
Peso Final kg	608.5 ± 4.4	631 ± 5.2	0.001
Ganancia diaria de peso vacas kg	-0.476 ± 0.09	-0.01 ± 0.10	0.0001
Ganancia diaria de peso becerros kg	0.986±0.02	0.962±0.02	0.53
CC final escala 1 a 9	6.4± 0.10	6.6±0.12	0.14
Cambio en CC	-0.62 ± 0.10	-0.38 ± 0.12	0.14
Profundidad muscular final (cm)	5.3 ± 0.11	5.5 ±0.12	0.16
Cambio en profundidad muscular (cm)	-0.19 ± 0.11	0.04± 0.12	0.16

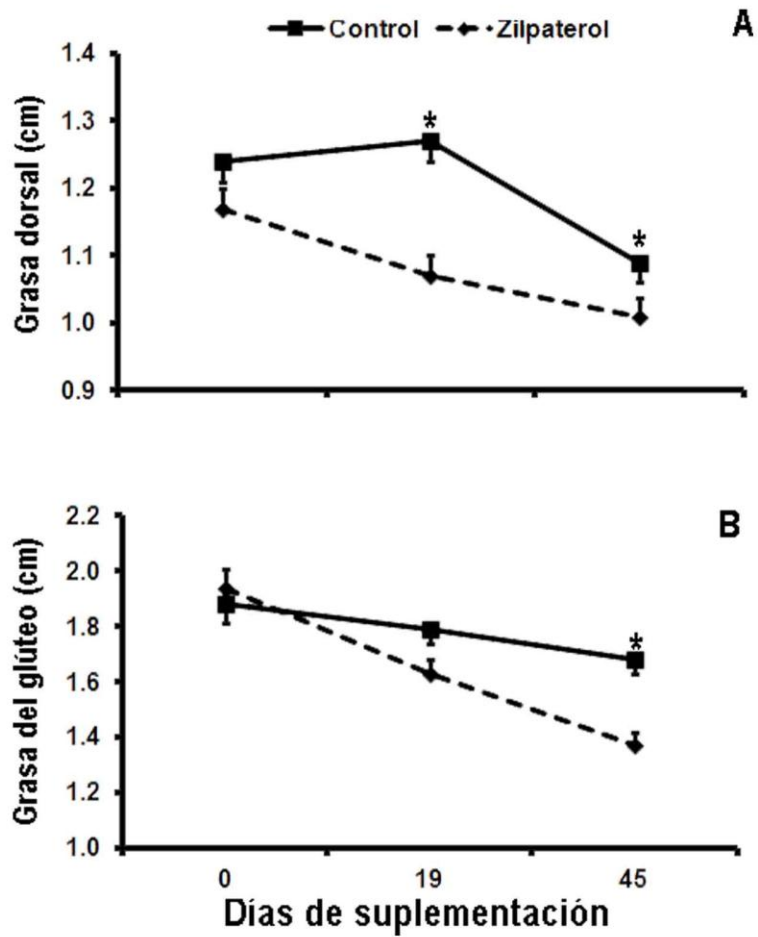


Figura 1. Efecto de la suplementación con zilpaterol durante 45 días sobre la grasa dorsal (A) y del glúteo (B) en vacas productoras de carne lactando. \* = muestra diferencias ( $P < 0.05$ ) entre grupo zilpaterol y grupo control en el mismo día

### *Respuesta reproductiva*

Los resultados de la respuesta al programa de inducción de estros se presentan en el cuadro 2. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de vacas con actividad lútea, vacas que presentaron estro, fertilidad al servicio sincronizado y tasa de preñez entre vacas del grupo control y las vacas del grupo zilpaterol.

### *Hormonas y Metabolitos*

Las concentraciones de IGF-I fueron similares ( $P > 0.05$ ) en las vacas del grupo control y las vacas del grupo zilpaterol (Figura 2A). A los 28 días del periodo experimental hubo una reducción ( $P < 0.05$ ) de IGF-I en ambos grupos, sin embargo, para el día 41 IGF-I se incrementó y su concentración en sangre no fue diferente respecto al inicio del experimento. Durante el periodo experimental, las concentraciones de leptina no fueron diferentes entre el grupo control y el grupo zilpaterol (Figura 2B). Las concentraciones de leptina durante el periodo experimental se redujeron en ambos grupos ( $P < 0.05$ ).

Las concentraciones de glucosa y NEFAs fueron menores ( $P < 0.05$ ) en vacas del grupo zilpaterol respecto a las vacas control (Figura 3A y 3B). Las concentraciones de triglicéridos y urea fueron muy variables a lo largo del periodo experimental, sin embargo a final del periodo de suplementación no se observaron diferencias en sus concentraciones ( $30.22 \pm 0.93$  mg/dL triglicéridos y  $24.30 \pm 0.56$  urea) entre grupos.

Cuadro 2. Efecto de la suplementación con zilpaterol durante 45 días sobre la respuesta a un programa de sincronización de estros y durante el empadre en vacas productoras de carne lactando.

	<b>Testigo</b>	<b>Zilpaterol</b>	<b>P</b>
Vacas con actividad lútea al inicio de la suplementación %	78.1 (50/64)	73.9 (34/46)	0.61
Vacas con actividad lútea al final de la suplementación %	89.1 (57/64)	80.4 (37/46)	0.20
Vacas que presentaron estro %	72.4 (42/58)	62.5 (25/40)	0.30
Vacas que presentaron estro y se gestaron %	47.6 (20/42)	44.0 (11/25)	0.77
Vacas que no mostraron estro y se gestaron %	31.2 (5/16)	53.3 (8/15)	0.22
Fertilidad a al servicio sincronizado %	48.4 (31/64)	52.2 (24/46)	0.70
Tasa de preñez %	96.9 (62/64)	93.5 (43/46)	0.40

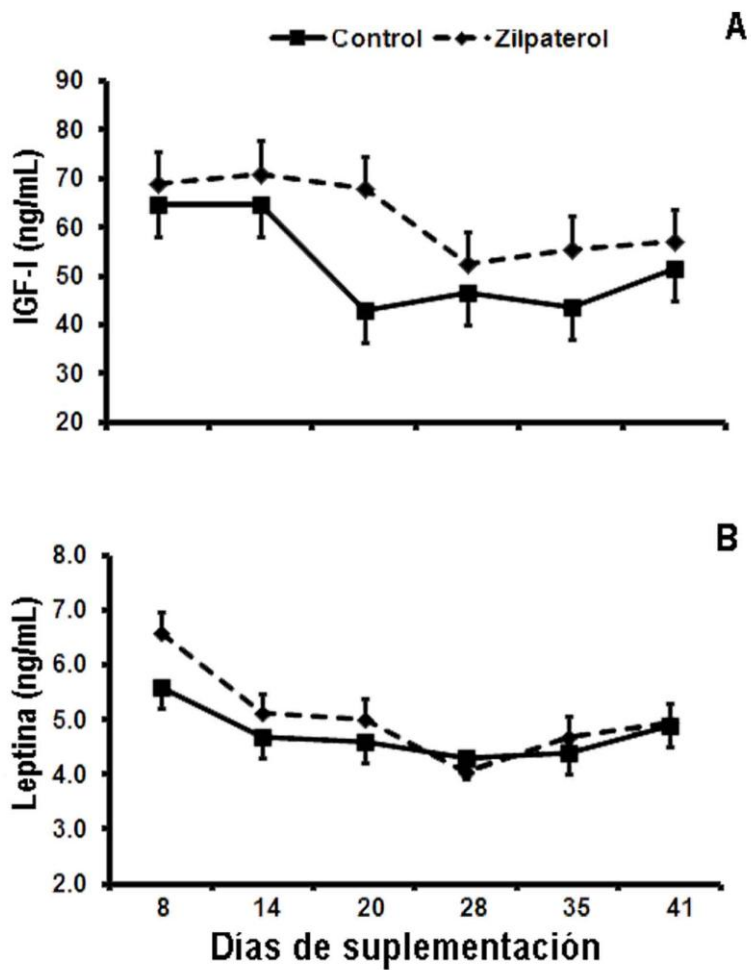


Figura 2. Efecto de la suplementación con zilpaterol durante 45 días, sobre las concentraciones en plasma de IGF-I (A), leptina (B) en vacas productoras de carne lactando.

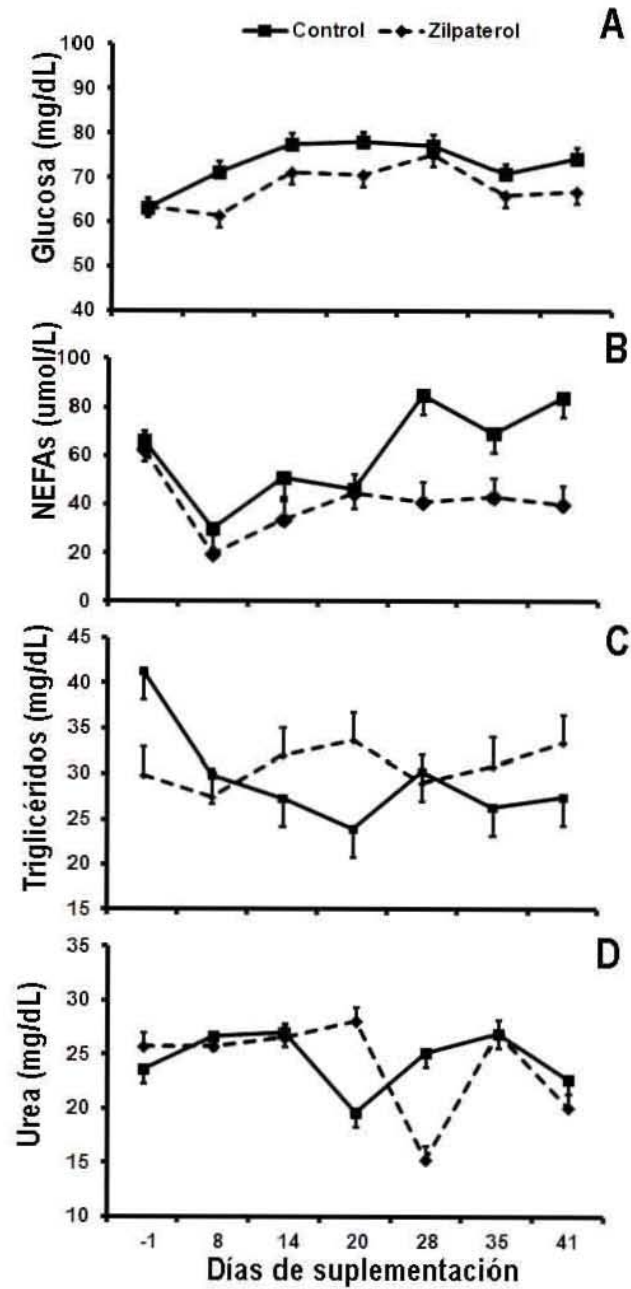


Figura 3. Efecto de la suplementación con zilpaterol durante 45 días, sobre las concentraciones en plasma de glucosa (A), NEFAs (B) triglicéridos (C) and urea (D) en vacas productoras de carne lactando.

## Discusión

Los resultados del presente experimento muestran que el uso del A $\beta$ A zilpaterol en vacas productoras de carne con buena condición corporal durante el posparto temprano, disminuye la pérdida de peso corporal pero incrementa la pérdida de grasa dorsal y la grasa en el área del glúteo. Sin embargo, esta reducción de grasa corporal no afectó la respuesta al tratamiento de sincronización, probablemente debido a que en vacas con alta CC la reducción en grasa corporal no es suficiente para que el organismo perciba una CC pobre. Por otra parte el IGF-I y la leptina no fueron diferentes entre las vacas del grupo control y las vacas del grupo zilpaterol lo cual podría explicar porque no hubo diferencias en la respuesta reproductiva entre grupos experimentales.

Resultados previos sugieren que el incremento en CC corporal dada por músculo y no grasa, compromete la respuesta a un programa de inducción de estros en vacas productoras de carne lactando durante el posparto (capítulo 2 y capítulo 3). Por lo anterior es probable que para que estas vacas reinicien su actividad ovárica deben acumular cierta cantidad de grasa corporal. En vacas con una CC =  $3.1 \pm 1.4$  el tratamiento con zilpaterol no afectó la grasa dorsal ( $0.55 \pm 0.02$  cm en zilpaterol vs  $0.58 \pm 0.02$  en control), pero si incrementó la profundidad muscular, reduciendo la relación grasa/músculo y la respuesta a un protocolo de inducción de estros (capítulo 2). Mientras que en vacas con CC =  $5.1 \pm 0.38$  tratadas también con zilpaterol, tienen menor grasa dorsal ( $0.65 \pm 0.05$  cm) que las vacas del grupo control ( $0.82 \pm 0.05$  cm). De la misma forma que en el experimento del capítulo 2, el tratamiento con zilpaterol redujo la respuesta al protocolo de inducción de estros (capítulo 3). En el presente experimento hubo una reducción en la grasa dorsal y del glúteo en ambos grupos a lo largo del periodo experimental, sin embargo al final del experimento las vacas

tratadas con zilpaterol tuvieron menor grasa dorsal ( $1 \pm 0.03$  cm) y del glúteo ( $1.37 \pm 0.05$ ) en comparación con las vacas del grupo control ( $1.1 \pm 0.03$  y  $1.68 \pm 0.05$  grasa dorsal y del glúteo respectivamente). Contrario a lo reportado en el capítulo 2 y 3 en el presente experimento, el zilpaterol no modificó la respuesta a la inducción de estros y aunque el genotipo y el protocolo de inducción pudieron influir en el resultado, la mayor cantidad de grasa dorsal tanto en las vacas del grupo zilpaterol y control en este estudio respecto a las vacas del los experimento del capítulo 2 y 3 también pueden explicar los resultados. Basados en estos resultados es probable que una mayor cantidad de grasa dorsal ( $> 0.8$  cm) favorezca una mejor fertilidad a estro detectado o sincronizado (alrededor del 50%) y una fertilidad al final del empadre por encima del 80%.

El factor de crecimiento similar a la insulina y leptina han sido sugeridos como los mensajeros químicos que monitorean el estatus energético del animal para favorecer el reinicio de la actividad ovárica en vacas posparto (Wettemann et al., 2003; Hess et al., 2005). Animales bajo restricción nutricional, pierden peso, CC, entran en anestro (Richards et a., 1989; Rhodes et al., 1996) y hay reducción en las concentraciones de IGF-I (Bossis et al., 2000). Mientras que las concentraciones de leptina están negativamente relacionadas con la duración de anestro posparto (Strauch et al., 2003). Además en vacas productoras de carne posparto el zilpaterol reduce la grasa corporal, las concentraciones de IGF-I (capítulo 2 y capítulo 3) y leptina (capítulo 3) y la eficiencia reproductiva. En el presente experimento no hubo diferencias en las concentraciones de IGF-I y leptina entre los grupos experimentales lo cual puede explicar porque no se modifico la respuesta a la sincronización de estro.



Las concentraciones medias de NEFAs y glucosa fueron menores en el grupo zilpaterol respecto al grupo testigo en un 34.19 y un 7.3% respectivamente. Resultados similares fueron reportados en las concentraciones de NEFAs con el uso de zilpaterol (capítulo 2) en el cual se concluye que debido a que el tejido muscular puede usar NEFAs como fuente de energía, la movilización de grasa ocasionada por el zilpaterol indirectamente aumenta la entrada de NEFAs a las células musculares, reduciendo de esta manera su concentración en sangre. Respecto a las concentraciones de glucosa es posible que el zilpaterol estimule la captación de glucosa por tejido muscular para favorecer la ganancia de peso, sin embargo en el capítulo 2 y 3 el zilpaterol no afectó las concentraciones de glucosa similar a lo reportado por otros autores con el uso de otros A $\beta$ As (Chikhou et al., 1991; O'Connor et al., 1991; Larsen et al., 2002 Walker et al., 2007). Las diferencias entre estos resultados y los reportes previos pueden deberse a que tanto en el experimento del capítulo 1 y 2 las vacas tratadas con zilpaterol ganaron peso y fueron suplementadas lo cual pudo incrementar el incremento las concentraciones de glucosa, mientras que en el presente estudio las vacas tratadas con zilpaterol no ganaron peso y no fueron suplementadas.

Respecto a las concentraciones de triglicéridos en el presente experimento el zilpaterol no afectó sus concentraciones de manera similar a lo reportado anteriormente (capítulo 2 y capítulo 3), En contraste Larsen et al. (2002) reportan en humanos un incremento en las concentraciones de triglicéridos cuando usan un A $\beta$ A específico de receptores  $\beta$ 3. Las concentraciones de triglicérido en sangre tienen dos orígenes, los triglicéridos de la dieta y los sintetizados en el hígado (Drackley, 1999), en el presente experimento los animales fueron alimentados con la misma dieta y dado que suponemos que los NEFAs fueron usados por tejido muscular como fuente de energía, es probable que en los animales

tratados con zilpaterol no hubiera mayor síntesis de triglicéridos por el hígado, explicando porque no hubo diferencias en las concentraciones de este metabolito. Aun cuando los A $\beta$ A reducen el catabolismo de la proteína (Mersmann, 1998) lo cual sugeriría una reducción en las concentraciones de urea, en el presente experimento los animales recibieron la misma dieta y aun cuando perdieron CC debido a que tenían suficientes reservas energéticas, solo usaron tejido adiposo y no músculo explicando porque no hubo efecto del zilpaterol sobre la concentraciones de urea, de manera similar a lo reportado por Chikhou et al. (1991) y Walker et al. (2007).

Uno de los principales efectos de los A $\beta$ A en tejido adiposo, es inducir la lipólisis a través de la activación de la lipasa sensible de hormonas, mientras que en el músculo estriado incrementan la síntesis y reducen el catabolismo de las proteínas (Mersmann , 1998). En el presente experimento las vacas en el grupo control perdieron en promedio  $476 \pm 0.09$  g por día mientras que las vacas en el grupo zilpaterol mantuvieron su peso. Además hubo una reducción de grasa dorsal y del glúteo tanto en el grupo control como en el zilpaterol durante el periodo experimental pero esta reducción fue 7.5% y 18.6% (para grasa dorsal y del glúteo respectivamente) mayor en las vacas tratadas con zilpaterol. El uso de zilpaterol por 33 días, en novillos finalizados incrementó la ganancia diaria de peso, el rendimiento en canal y el área del músculo longissimus dorsi (LD), pero redujo el total de grasa en la 12a costilla (Avendaño-Reyes et al., 2006). Otros reportes indican que aunque zilpaterol puede no modificar la ganancia diaria de peso y el contenido de grasa de la 12a costilla, si incrementa el rendimiento de la canal caliente y el área del músculo LD (Montgomery et al., 2009; Holland et al., 2010). Resultados previos con vacas productoras de carne lactando muestran que la suplementación con zilpaterol durante 33 días incrementó la ganancia

diaria de peso y la profundidad muscular, sin cambios en la grasa dorsal (capítulo 2), mientras que en animales suplementados para acumular reservas de energía, el zilpaterol no modifica la ganancia de peso, incrementa la profundidad muscular y reduce la grasa dorsal (capítulo 3). Estos resultados indican claramente que el zilpaterol modifica la composición corporal, ya sea por reduciendo la grasa corporal, por incrementar la masa muscular o por ambas.

En conclusión, los resultados del presente experimento indican que en vacas productoras de carne con buena condición corporal, el zilpaterol redujo la grasa dorsal y del glúteo pero no afectó la respuesta reproductiva a un programa de inducción de estros probablemente porque no se afectan las concentraciones de IGF-I y leptina.

### **Agradecimientos**

El soporte financiero del proyecto fue por parte del Macroproyecto SDEI-PTID-7.31, UNAM. A. Guzmán Agradece al CONACyT por la beca otorgada para llevar a cabo sus estudios de Doctorado. Agradecemos también a Dr. Perera, M en C. Rodriguez y M en C. Rojas por su apoyo en la cuantificación y hormonas y metabolitos.

### **Referencias**

Avendaño-Reyes L, Torres-Rodríguez V, Meraz-Murillo FJ, Pérez-Linares C, Figueroa-Saavedra F, Robinson PH. 2006. Effects of two beta-adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics, and meat quality of feedlot steers. *J Anim Sci.*;84(12):3259-65.

Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra J, Spicer LJ. 2000. Nutritionally induced anovulation in beef Heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol Reprod.* 2000 May;62(5):1436-44.

Chikhou F, Moloney AP, Austin FH, Roche JF, Enright WJ. 1991. Effects of cimaterol administration on plasma concentrations of various hormones and metabolites in Friesian steers. *Domest Anim Endocrinol.* 1991 Oct;8(4):471-80.

Ciccioli NH, Wettemann RP, Spicer LJ, Lents CA, White FJ, Keisler DH. 2003. Influence of body condition at calving and postpartum nutrition on endocrine function and reproductive performance of primiparous beef cows. *J Anim Sci.* 2003 Dec;81(12):3107-20.

Crowe, M.A. 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reproduction in Domestic Animal.* 43 Supplement 5:20-28.

Drackley, J.K., 1999. ADSA foundation scholar award. *Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?* *J. Dairy Sci.* 82, 2259–2273.

Hess, B.W., Lake, S.L., Scholljegerdes, E.J., Weston, T.R., Nayigihugu, V., Molle J.D. C. and Moss G.E., 2005. Nutritional controls of beef cow reproduction. *Journal of Animal Science.* 83, E90-E106.

Holland BP, Krehbiel CR, Hilton GG, Streeter MN, Vanoverbeke DL, Shook JN, Step DL, Burciaga-Robles LO, Stein DR, Yates DA, Hutcheson JP, Nichols WT, Montgomery JL. 2010. Effect of extended withdrawal of zilpaterol hydrochloride on performance and carcass traits in finishing beef steers. *J Anim Sci.* 88(1):338-348.

Larsen TM, Toubro S, van Baak MA, Gottesdiener KM, Larson P, Saris WH, Astrup A. 2002. Effect of a 28-d treatment with L-796568, a novel beta(3)-adrenergic receptor

agonist, on energy expenditure and body composition in obese men. *Am J Clin Nutr.* 2002 Oct;76(4):780-8.

Mersmann HJ. 1998. Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *Anim Sci.* 1998 Jan;76(1):160-72.

Montgomery JL, Krehbiel CR, Cranston JJ, Yates DA, Hutcheson JP, Nichols WT, Streeter MN, Bechtol DT, Johnson E, TerHune T, Montgomery TH. 2009. Dietary zilpaterol hydrochloride. I. Feedlot performance and carcass traits of steers and heifers. *J Anim Sci.* 87(4):1374-83.

O'Connor, R. M., Butler, W. B., Finnerty, K. D., Hogue, D. E., Beermann, D. H., 1991. Acute and chronic hormone and metabolite changes in lambs fed the beta-agonist, cimaterol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 8, 537-548.

Rhodes, FM, Entwistle, KW, Kinder E. 1996. Changes in Ovarian Function and Gonadotropin Secretion Preceding the Onset of Nutritionally Induced Anestrus in *Bos indicus* Heifers. *Biol Reprod.* 55;1437-1443

Richards, M.W., Wettemann, R.P., Schoenemann, H.M. 1989. Nutritional anestrus in beef cows: body weight change, body condition, luteinizing hormone in serum and ovarian activity. *Journal of Animal Science.* 67:1520-1526.

Schröder UJ, Staufenbiel R. 2006. Invited review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness. *J Dairy Sci.* 2006 Jan;89(1):1-14.

Strauch TA, Neuendorff DA, Brown CG, Wade ML, Lewis AW, Keisler DH, Randel RD. 2003. Effects of lasalocid on circulating concentrations of leptin and insulin-like growth

factor-I and reproductive performance of postpartum Brahman cows. *J Anim Sci.* 2003 Jun;81(6):1363-70.

Walker, D. K., Titgemeyer, E. C., Sissom, E. K., Brown, K. R., Higgins, J. J., Andrews, G. A., Johnson, B. J., 2007. Effects of steroidal implantation and ractopamine-HCl on nitrogen retention, blood metabolites and skeletal muscle gene expression in Holstein steers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91, 439-447.

Wettemann, R. P., Lents, C. A., Ciccioli, N. H., White F. J., Rubio, I., 2003. Nutritional- and suckling-mediated anovulation in beef cows. *J. Anim. Sci.* 81, E48-E59.

Zalesky DD, Day ML, Garcia-Winder M, Imakawa K, Kittok RJ, D'Occhio MJ, Kinder JE. 1984. Influence of exposure to bulls on resumption of estrous cycles following parturition in beef cows. *J Anim Sci.* 1984 Nov;59(5):1135-9.

## Capítulo 5

### Discusión General

Los resultados de la presente tesis muestran cuatro aspectos importantes de cómo las reservas energéticas controlan el funcionamiento reproductivo en vacas productoras de carne posparto; primero, sustentan la hipótesis de que la cantidad de tejido adiposo del animal, juega un papel determinante en el reinicio de la actividad ovárica y la respuesta a un protocolo de inducción de estros; segundo, estos estudios muestran que la medida subjetiva de CC no es la mejor herramienta para evaluar las reservas energéticas del animal ya que animales con un incremento en CC por tejido muscular, no ciclan si no hay un incremento de reservas energéticas en forma de grasa; tercero, parece que existe un umbral de tejido adiposo después del cual aun cuando hay un reducción de grasa corporal, no se afecta la respuesta a la inducción de estros y cuarto, en animales por debajo del umbral de tejido adiposo, parece que IGF-I es el principal mediador entre el estatus energético y la eficiencia reproductiva. Por su parte insulina y leptina, aunque pueden afectar la función reproductiva en el posparto, su acción puede ser secundaria.

Los estudios presentados en esta tesis lograron la disociación el aumento de masa muscular y deposición de grasa que normalmente que se observa naturalmente cuando el animal mejora su CC. La CC corporal ha sido ampliamente usada como una buena herramienta para evaluar los efectos de la reservas energéticas sobre la función reproductiva en vacas productoras de carne posparto (Crowe, 2008). Por ejemplo, en novillas en anestro nutricional con una CC = 3.8 (Bossis et al., 2000) y vacas productoras de carne posparto con CC de 4 o 5 (Ciccioli et al., 2003), muestran que animales que son alimentados con dietas altas en energía, ganan CC y reinician más pronto la actividad ovárica en comparación con las vacas que reciben una dieta baja en energía. En contraste, en la presente tesis los animales que ganan peso por acumulación de tejido muscular y no tejido adiposo aun cuando tienen mayor CC presentan una menor respuesta a un programa de inducción de estros (capítulo 2 y capítulo 3). Esta reducción en la eficiencia reproductiva puede deberse a que el tratamiento con zilpaterol redujo la grasa corporal, lo cual sustenta la

hipótesis propuesta por Lamond, (1970) de que cierta cantidad de tejido adiposo es necesaria para reiniciar la actividad ovárica posparto. Con base a estos resultados el uso del zilpaterol en las condiciones de ésta tesis, es un buen modelo para estudiar los efectos específicos de la cantidad de tejido adiposo del animal sobre el reinicio de la actividad ovárica en vacas posparto. Este modelo nos puede ayudar a evaluar el umbral necesario de tejido adiposo que tiene que alcanzar el animal para reiniciar la actividad ovárica después del parto, así como los mediadores químicos entre el estatus energético y la función reproductiva.

Respecto al umbral de tejido adiposo necesario para el reinicio de la actividad ovárica nuestros resultados sugieren algunos datos importantes. En vacas con baja CC ( $3.1 \pm 1.4$ ; capítulo 2) las vacas del grupo testigo tuvieron en promedio  $0.58 \pm 0.02$  cm de grasa dorsal y una respuesta a protocolo de inducción de estros regular (51% de vacas en estros, 62% de tasa de ovulación y 45% de fertilidad en el primer servicio). En el experimento del capítulo 3, las vacas del grupo control tuvieron más grasa dorsal ( $0.82 \pm 0.03$ ) y mejor respuesta reproductiva tanto que el experimento previo (capítulo 2), como las vacas del grupo zilpaterol de este experimento (capítulo 3), las cuales tuvieron en promedio  $0.65 \pm 0.03$  cm de grasa dorsal. Las vacas tratadas con zilpaterol en este experimento (capítulo 3) tuvieron un respuesta reproductiva (53% de vacas en estros, 60% de tasa de ovulación y 63% de fertilidad a 1er servicio) similar a las vacas del grupo control del experimento del capítulo 2. Finalmente en vacas con CC alta del capítulo 4, tanto las tratadas con zilpaterol como las del grupo control tuvieron más de 1 cm de grasa dorsal y la respuesta a la inducción de estros fue elevada. Estos resultados sugieren que una mayor cantidad de grasa dorsal ( $> 0.8$  cm) favorezca una mejor fertilidad a estro detectado o sincronizado (alrededor del 50%) y una fertilidad al final del empadre por encima del 80%.

Las concentraciones de IGF-I, insulina y leptina tienen una relación directa con las reservas energéticas del animal. Novillas con baja CC tienen bajas concentraciones de IGF-I, insulina y leptina, pero cuando estos animales ganan peso y CC hay un incremento en las concentraciones de estas hormonas (León et al., 2004). Además, estas hormonas metabólicas han sido sugeridas como los principales mensajeros que informan a las



neuronas productoras de GnRH sobre el estatus energético del animal para bloquear o restablecer la secreción de GnRH y con ello controlar la actividad reproductiva posparto (Wettemann et al., 2003; Hess et al., 2005).

El tratamiento con zilpaterol redujo las concentraciones de IGF-I tanto en el capítulo 2 como en el capítulo 3 y redujo la respuesta al protocolo de inducción de estros. Además, las concentraciones de IGF-I fueron asociadas positivamente con el establecimiento de la ciclicidad después de la inducción del estro (capítulo 2). Finalmente, en vacas con  $CC \geq 6$ , el zilpaterol reduce la grasa corporal pero no afecta la respuesta reproductiva ni las concentraciones de IGF-I en comparación con lo observado en las vacas del grupo testigo (capítulo 4). En novillas (Bossis et al., 2000) y vacas (Roberts et al., 1997) en anestro tienen bajas concentraciones de IGF-I, en comparación con animales ciclando, además en novillas el incremento en las concentraciones de IGF-I fue asociado con la primera ovulación posanestro (Bossis et al., 2000). En vacas productoras de carne posparto que ganan 0.9/kg/día de peso restablecen más rápido la actividad ovárica y tienen concentraciones mayores de IGF-I en comparación con vacas que ganan 0.45/kg/día durante este mismo periodo (Ciccioli et al., 2003). Estas evidencias y nuestros resultados sustentan fuertemente que en animales con CC moderada el IGF-I es el principal mediador entre el estatus energético del animal y la eficiencia reproductiva. Por otro lado, en vacas con buena CC, aunque el tratamiento con zilpaterol reduce la grasa corporal no modifica las concentraciones de IGF-I ni la eficiencia reproductiva. Esto sugiere que niveles elevados de IGF-I pueden garantizar una buena eficiencia reproductiva durante el posparto. Un incremento en las concentraciones de IGF-I puede favorecer la función reproductiva por estimular en el hipotálamo la síntesis y liberación de GnRH (Etgen et al., 2006) o por estimular el desarrollo folicular y la producción de estradiol a nivel folicular (Rivera y Fortune, 2003).

Las concentraciones de insulina han sido relacionadas con la función reproductiva en ganado posparto (Hess et al., 2005; Chagas et al., 2007). El incremento en las concentraciones de insulina reduce el intervalo parto a primera ovulación en vacas lecheras (Gong et al., 2002; Gutiérrez et al., 2006), mientras que en vacas productoras de carne con

concentraciones elevadas de insulina ( $> 8$  mIU/L) tienen un intervalo parto primera ovulación menor que vacas con menos de 5 mIU/L de insulina (Sinclair et al., 2002). En contraste, en la presente tesis a pesar de que el tratamiento con zilpaterol en animales con baja CC (capítulo 2) reduce las concentraciones de insulina, esta hormona se relaciona con la ocurrencia de la actividad lútea después del programa de inducción de estros. Además, en vacas (capítulo 3) que recibieron una dieta alta en energía (1.95 Mcal/kg), hubo un incremento lineal en las concentraciones de insulina tanto en aquellas tratadas con zilpaterol como en las del grupo control, sin diferencias entre grupos. Estos resultados sugieren que aun cuando la insulina puede favorecer el desarrollo folicular (Gutiérrez et al., 1997) y la secreción de GnRH (Burcelin et al., 2003) y con ello la eficiencia reproductiva posparto (Gong et al., 2002; Sinclair et al., 2002; Gutiérrez et al., 2006) su papel como mediador entre el estatus energético y la función reproductiva en vacas productoras de carne posparto no parece ser tan importante. Esto debido a que las concentraciones de esta hormona varían grandemente a lo largo del día y el incremento en el consumo de energía es el principal estímulo para la síntesis y secreción de insulina por los islotes de Langerhans en el páncreas (Hayirli, 2006). De esta manera después del consumo de alimento, o en algún momento durante el día, la insulina puede alcanzar concentraciones elevadas en sangre que no necesariamente estimulan el reinicio de la actividad ovárica posparto.

Las concentraciones de leptina están en directa relación con la cantidad de tejido adiposo (Chilliard et al., 2005) y dado que se sabe que cierta cantidad de tejido adiposo es necesaria para estimular la actividad ovárica (Lamond, 1970; Frisch and McArthur, 1974; resultados de esta tesis), esta hormona ha sido considerada como el principal mediador entre el estatus energético y la función reproductiva en rumiantes (Chilliard et al., 2005) y ratones (Castellano et al., 2009). La evidencia más importante de la leptina como regulador de la función reproductiva es que ratones hembra knockout en el gen *ob/ob*, son obesas e infértiles, pero la administración de leptina humana recombinante, restablece la fertilidad (Chehab et al., 1996). En la presente tesis, nuestro objetivo era reducir la grasa dorsal y con ello las concentraciones de leptina. Sin embargo, el tratamiento con zilpaterol, tuvo efectos diferentes dependiendo de la cantidad de reservas energéticas del animal. En vacas con muy baja CC ( $3.1 \pm 1.4$ ) y limitada cantidad de tejido adiposo, el tratamiento con zilpaterol no

causo disminución de las concentraciones de leptina después de 33 días de tratamiento (capítulo 2), en tanto que en vacas con moderada CC ( $5.1 \pm 0.38$ ) el cambio en composición corporal ocasionado por el zilpaterol redujo las concentraciones de leptina (capítulo 3). Al igual que insulina los resultados de esta tesis sugieren que la leptina no tiene un papel central como regulador entre el estatus energético y la función reproductiva en vacas productoras de carne posparto. Dado que las concentraciones de esta hormona están más relacionadas con la cantidad de tejido adiposo (León et al., 2005; Chilliard et al., 2005), es probable que en vacas con baja CC los cambios en leptina no sean suficientes para modificar la secreción de GnRH y la función reproductiva. Sin embargo, cuando los animales acumulan reservas energéticas hay incremento de leptina, en este nivel de CC ( $\geq 5$ ), pequeños cambios en leptina si pueden modificar la eficiencia reproductiva. Similar a esta conclusión, True et al. (2011a) reportan que leptina tiene un efecto positivo sobre la función reproductiva en relación al status energético, sin embargo su papel más que causal es permisivo y otros factores diferentes a leptina deben estar relacionados (True et al., 2011a). Esta idea es sustentada por experimentos donde se muestra en animales con un balance energético negativo que la administración de dosis elevadas de leptina incrementan la secreción de LH (Zieba et al. 2003; Maciel et al. 2004) cosa que no sucede en animales bien alimentados (Nagatani et al. 2000), además en animales bajo estrés nutricional la administración de dosis fisiológicas de leptina no modifica la secreción de LH (True et al., 2011b).

Si bien, los resultados de la tesis sustentan que IGF-I puede ser el principal mediador entre el estatus energético y la función reproductiva, debido a que el zilpaterol redujo la grasa corporal, es probable que otras hormonas producidas por el tejido adiposo se modificaran y afectaran la eficiencia reproductiva. La adiponectina es producida por el tejido adiposo principalmente y animales en ayuno o perdiendo peso tienen concentraciones elevadas de adiponectina (Michalakis y Segars, 2010). Además experimentos in vitro muestran que adiponectina inhibe la secreción de GnRH y LH (Lu et al., 2008, Wen et al., 2008; Michalakis y Segars, 2010). En ratas macho, la infusión intracerebroventricular de adiponectina, reduce la frecuencia pulsátil de LH comparado con el control o el nivel basal, además en cultivo de neuronas productoras de GnRH, el tratamiento con adiponectina

reduce la secreción de GnRH (Cheng et al., 2011) por reducir el potencial de membrana (Wen et al., 2008). Otra hormona producida por los adipocitos es la resistina la cual esta correlacionada positivamente con la cantidad de grasa corporal (Tortoriello et al., 2007). En cultivo de células foliculares de folículos grandes (8 a 22 mm) de vaca, la resistina incrementa la producción de estradiol mediada por FSH e IGF-I (Spicer et al., 2011). En el presente experimento la reducción de grasa dorsal y el incremento en masa muscular podría estar asociado a un incremento en la concentración de adiponectina y una reducción de resistina que contribuyo a la reducida respuesta al protocolo de inducción de estros.

Aunque los cambios endocrinos ocasionados por el zilpaterol pueden explicar claramente la reducción en la eficiencia reproductiva en vacas posparto, efectos directos del A $\beta$ A sobre la secreción de GnRH-LH y función ovárica no pueden ser descartados. El incremento de la estimulación beta adrenérgica del ovario se relaciona con la formación de quistes foliculares en vacas (Paredes et al., 2011) y ratones (Barria et al., 1993). Esto sugiere que un efecto directo del zilpaterol sobre el ovario pudo ser la causa de la baja respuesta al protocolo de inducción de estros. Sin embargo, en el experimento 1 (capítulo 2; datos no presentados), el diámetro del folículo ovulatorio al momento de la inseminación, evaluado mediante ultrasonografía, no fue diferente entre grupos ( $15.2 \pm 3.2$  mm grupo zilpaterol vs  $14.9 \pm 3.3$  mm grupo testigo) y en ninguna vaca se observo diámetro folicular ( $>25$  mm) que sugiriera presencia de un quiste folicular. En novillas en las cuales se sincronizo la ola se crecimiento folicular con GnRH, el tratamiento con zilpaterol por 8 días incremento el diámetro del folículo ovulatorio ( $14.04 \pm 0.44$  mm grupo zilpaterol vs  $12.9 \pm 0.44$  mm grupo testigo) pero sin presencia de quistes foliculares (datos sin publicar). Además, aunque el método de inducción de estros (GnRH induce ovulación de quistes) y la raza pudieron influir (animales de *bos-taurus* tienen ancestro posparto menor que *bos-indicus*), resultados

en vacas con CC alta el tratamiento con zilpaterol no se afecta la fertilidad a primer servicio (Capítulo 4).

Aunque las concentraciones de NEFAs, glucosa, triglicéridos y urea son un buen indicador del estatus metabólico del animal, en los presentes experimentos no se observó asociación entre estos metabolitos y la respuesta reproductiva a la inducción de estros. En concordancia con esto, las concentraciones de glucosa y NEFAs no predicen la actividad lútea durante un empadre de 60 días (Vizcarra et al., 1998), el primer estro posparto en vacas productoras de carne (Cicciooli et al., 2003), ni la primera ovulación pos-anestro nutricional en novillas (Bossis et al., 2000).

Reportes en relación a los efectos de los A $\beta$ A sobre las concentraciones de IGF-I son contrastantes. Similar a los efectos del zilpaterol sobre IGF-I observados por nosotros (capítulo 3 y 4), en novillos (Chikhou et al., 1991) y corderos (Beermann et al., 1987) tratados con cimaterol (A $\beta$ A) por 13 o 30 días respectivamente hay una reducción en las concentraciones medias de IGF-I. En contraste, resultados de esta tesis muestran que en vacas con buena CC el zilpaterol no modificó las concentraciones de IGF-I. De acuerdo con este resultado en novillos, el uso de otro A $\beta$ A llamado ractopamina durante los últimos 28 o 37 días del periodo de engorda no modificó las concentraciones de IGF-I (Walker et al., 2007; Winterholler et al., 2008). Las diferencias en los efectos A $\beta$ As sobre las concentraciones de IGF-I pueden estar asociadas a varios factores como especie, efecto directo de A $\beta$ As sobre el eje somatotrófico, duración de tratamiento, estado fisiológico, cambios en la composición corporal, cantidad de reservas energéticas o combinación de factores. En vacas con baja CC y suplementadas con poca cantidad de alimento el zilpaterol reduce IGF-I, (capítulo 2), debido probablemente a que la estimulación beta adrenérgica incrementa la secreción de somatostatina (Giustina y Veldhuis, 1998). Sin embargo en vacas suplementadas con aproximadamente 5.2 kg de concentrado mas forraje y melaza IGF-I no difiere durante el periodo de tratamiento con zilpaterol, pero 19 días después de retirado tanto la suplementación del concentrado y el zilpaterol, IGF-I es menor en vacas que fueron tratadas con zilpaterol (capitulo 4). Esto resultados se pueden explicarse debido a que al momento del retiro de la suplementación, las vacas tratadas con zilpaterol entraron

en BEN mayor que las vacas del grupo testigo dado que tenían menores reservas de energía en el tejido adiposo. Finalmente en vacas con reservas energéticas altas (capítulo 4) el zilpaterol no modifica las concentraciones de IGF-I probablemente porque el efecto de reservas energéticas sobre IGF-I es más importante que el efecto de zilpaterol sobre el eje somatotrófico.

Los efectos del zilpaterol sobre las concentraciones de insulina y leptina parecen estar condicionados a otros factores como el consumo de nutrientes (insulina) y la cantidad de reservas energéticas en forma de tejido adiposo (leptina) del animal. En vacas con baja CC que mantienen su peso y CC (capítulo 2), zilpaterol reduce la secreción de insulina respecto al grupo control. Por otro parte, en vacas que consumen una dieta alta en energía (capítulo 3) el zilpaterol no modificó las concentraciones de insulina respecto al grupo control. En novillas con baja CC tienen baja concentración de insulina pero cuando las novillas reciben una dieta para ganar peso y CC, la insulina se incrementa inmediatamente después de iniciado el consumo de la dieta (Bossis et al., 2000; León et al., 2004). Es bien sabido que el consumo de energía incrementa la secreción de insulina (Hayirli, 2006), lo cual explica porque en vacas que ganan peso, el tratamiento con zilpaterol no modifica la concentración de insulina. Mientras que en vacas con bajas reservas corporales la pérdida proporcional de grasa, sumada al bajo consumo de energía puede explicar el porqué zilpaterol reduce la concentración de insulina. Respecto a leptina en animales con baja CC (capítulo 2) aun cuando el zilpaterol redujo sus concentraciones a los 14 días de tratamiento probablemente por el efecto directo del A $\beta$ A sobre la secreción de leptina por el tejido adiposo (Ricci et al., 2005), a los 33 días de tratamiento ya no se observaron diferencias en leptina entre la vacas del grupo control y las vacas tratadas por zilpaterol. Por otro lado en vacas con baja CC que acumulan reservas corporales (capítulo 3), el zilpaterol si reduce la concentración de leptina, pero en animales con buena CC (capítulo 4) el zilpaterol no tiene efecto sobre leptina. Las concentraciones de leptina están en proporción directa a la cantidad de tejido adiposo (Chilliard et al., 2005; León et al., 2004). Por esta razón los efectos de zilpaterol sobre las concentraciones de leptina no son directos y están relacionados más a los efectos del zilpaterol sobre la movilización de la grasa corporal.

Independientemente de la condición corporal (capítulo 2 y 4) o el consumo de energía (capítulo 3), el zilpaterol redujo la concentración de NEFAs. En contraste, tanto en novillos (Chikhou et al., 1991), corderos (O'Connoer et al., 1991) y humanos (Larsen et al., 2002), el uso de A $\beta$ As incrementa las concentraciones de NEFAs. El músculo así como otros tejidos, pueden a través de la beta-oxidación, usar NEFAs como fuente de energía (Drackley, 1999; Koonen et al., 2005). Por lo anterior, el incremento en masa muscular ocasionado por el zilpaterol pudo incrementar indirectamente la captación de NEFAs por el tejido muscular, reduciendo así la concentración de este metabolito en la sangre.

El zilpaterol no afectó las concentraciones de glucosa, (capítulo 2) urea y triglicéridos (Capítulo 3 y 4). En acuerdo con estos resultados Walker et al. (2007), no reportan diferencias en glucosa y urea entre novillos tratados con ractopamina y novillos sin tratar, además en humanos (Larsen et al., 2002) y corderos (O'Connoer et al., 1991) el uso de un agonista de receptores  $\beta_3$  o cimaterol (respectivamente), tampoco modifica la concentración de glucosa y urea. En relación con los efectos de zilpaterol sobre triglicéridos no se observaron diferencias entre vacas que consumieron zilpaterol y las vacas del grupo control, contrario a lo reportado por Larsen et al. (2002), esto probablemente se debe a la reducción de NEFAs observadas en estos estudios.

Los principales efectos de los A $\beta$ As, son reducir el catabolismo e incrementar la síntesis de proteína en células musculares y en el tejido adiposo estimular la lipasa sensible de hormonas para activar la lipólisis (Mersmann, 1998). Estos efectos metabólicos se ven reflejados en una reducción de la grasa corporal y/o un incremento de la masa muscular. En vacas con baja CC corporal (Capítulo 2), el zilpaterol mejora el peso corporal e incrementa la profundidad muscular, sin embargo no modificó la grasa dorsal, de manera similar a lo reportado en novillos (Winterholler et al., 2008; Montgomery et al., 2009; Holland et al., 2010). Por otro lado en vacas ganando peso y CC (Capítulo 3) aunque no hubo diferencias entre vacas tratadas con zilpaterol y las del grupo control ganando peso, si hubo una reducción de grasa dorsal y un incremento en profundidad muscular. En acuerdo con estos resultados, en novillos el uso de zilpaterol por 33 días incrementa el rendimiento en canal y el área del músculo longissimus dorsi (LD), y reduce el total de grasa en la 12a costilla

(Avendaño-Reyes et al., 2006). Por último, en vacas con buena CC (Capítulo 4), el zilpaterol no modificó la profundidad muscular, pero redujo tanto la grasa dorsal como la grasa del anca. La diferencia del efecto de zilpaterol observado sobre la grasa corporal y masa muscular puede estar asociada con la cantidad de reservas corporales tanto en forma de grasa como músculo y la dieta que reciben los animales.

En conclusión los estudios presentados aquí muestran que el uso de zilpaterol no tiene efectos directos negativos sobre la secreción de GnRH o el desarrollo folicular, por lo que, gracias a que reduce la grasa corporal e incrementa la masa muscular, es una buena herramienta para evaluar los efectos específico de la grasa corporal sobre la función reproductiva en vacas posparto. En este sentido parece que una cantidad de grasa dorsal por arriba de 0.8 cm puede garantizar una buen repuesta a un protocolo de inducción de estros. Por último, nuestros resultados muestran que el IGF-I más que insulina o leptina, es el principal mediador entre el estatus energético y la eficiencia reproductiva en vacas productoras de carne durante el posparto.



## Referencias Generales

- Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. 2000. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci.* 57:1050-1093.
- Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1985. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev.* 6(3):400-20
- Adewuyi AA, Gruys E, van Eerdenburg FJ. 2005. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Vet Q.* 27(3):117-126.
- Amstalden, M., Garcia, M. R., Stanko, R. L., Nizielski, S. E., Morrison, C. D., Keisler, D. H., Williams, G. L., 2002. Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows. *Biol. Reprod.* 66, 1555-1561.
- Avendaño-Reyes L, Torres-Rodríguez V, Meraz-Murillo FJ, Pérez-Linares C, Figueroa-Saavedra F, Robinson PH. 2006. Effects of two beta-adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics, and meat quality of feedlot steers. *J Anim Sci.* 84(12):3259-3265.
- Bach MA, Bondy CA. 1992. Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology.* 131:2588-94.
- Bareille, N., Faverdin, P., Hay, M., 1997. Modification of feed intake response to a beta 2-agonist by bovine somatotropin in lactating or dry dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 80, 52-66.
- Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. 1993. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology.* 133(6):2696-703.
- Bauchart D, Gruffat D, Durand D. 1996. Lipid absorption and hepatic metabolism in ruminants. *Proc Nutr Soc.* 55(1B):39-47
- Bauman, DE, Perfield II, JW, de Veth, MJ, Lock AL. 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proc. Cornell Nutr. Conf.* pp. 175-189.
- Baxter RC. 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278:E967-976.

- Beckett JL, Delmore RJ, Duff GC, Yates DA, Allen DM, Lawrence TE, Elam N. 2009. Effects of zilpaterol hydrochloride on growth rates, feed conversion, and carcass traits in calf-fed Holstein steers. *J Anim Sci.* 87(12):4092-4100.
- Becú-Villalobos D, García-Tornadú I, Shroeder G, Salado EE, Gagliostro G, Delavaud C, Chilliard Y, Lacau-Mengido IM. 2007. Effect of fat supplementation on leptin, insulin-like growth factor I, growth hormone, and insulin in cattle. *Can J Vet Res.* 71(3):218-225.
- Beg MA, Ginther OJ. 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction.* 132(3):365-377.
- Beermann DH, Butler WR, Hogue DE, Fishell VK, Dalrymple RH, Ricks CA, Scanes CG. 1987. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *J Anim Sci.* 65(6):1514-1524
- Bewley JM, Peacock AM, Lewis O, Boyce RE, Roberts DJ, Coffey MP, Kenyon SJ, Schutz MM. 2008. Potential for estimation of body condition scores in dairy cattle from digital images. *J Dairy Sci.* 91(9):3439-3453.
- Bishop DK, Wettemann RP, Spicer LJ. 1994. Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. *J Anim Sci.* 72(10):2703-2708.
- Blache D, Martin GB. 2009. Multi-dimensional control of the reproductive system by nutrition. Congreso, Innovaciones en Reproducción Animal. Colegio de Posgraduados del 23 al 25 de Septiembre. Estado de México.
- Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra J, Spicer LJ. 2000. Nutritionally induced anovulation in beef Heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol Reprod.* 2000 May;62(5):1436-44.
- Brandt MM, Keisler DH, Meyer DL, Schmidt TB, Berg EP. 2007 Serum hormone concentrations relative to carcass composition of a random allotment of commercial-fed beef cattle. *J Anim Sci.* 85(1):267-275
- Brethour JR. 1992. The repeatability and accuracy of ultrasound in measuring backfat of cattle. *J Anim Sci.* 70(4):1039-1044.
- Briski KP, Sylvester PW. 1998. Role of endogenous opiates in glucoprivic inhibition of the luteinizing hormone surge and fos expression by preoptic gonadotropin-releasing

- hormone neurones in ovariectomized steroid-primed female rats. *J Neuroendocrinol.* 10(10):769-776.
- Bucholtz DC, Vidwans NM, Herbosa CG, Schillo KK, Foster DL. 1996. Metabolic interfaces between growth and reproduction. V. Pulsatile luteinizing hormone secretion is dependent on glucose availability. *Endocrinology.* 137(2):601-607.
- Burcelin R, Thorens B, Glauser M, Gaillard RC, Pralong FP. 2003. Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: stimulation by insulin and potentiation by leptin. *Endocrinology.* 144(10):4484-4491.
- Butler ST, Pelton SH, Butler WR. 2004. Insulin increases 17 beta-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction.* 127(5):537-545.
- Butler WR. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 60-61:449-457.
- Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Roa J, Vigo E, Pineda R, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes.* 2006;55:2602-10.
- Castellano, J.M., Roa, J., Luque, R. M., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere M., 2009. KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative pathophysiological implications. *Peptides.* 30, 139-145.
- Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR, Lucy MC, Martin GB, Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW, Webb R. 2007. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 90(9):4022-32.
- Chakroborty D, Sarkar C, Basu B, Dasgupta PS, Basu S. 2009. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 69(9):3727-30.
- Chehab, F. F., Lim, M. E., Lu, R. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat. Genet.* 12, 318-320.

- Cheng XB, Wen JP, Yang J, Yang Y, Ning G, Li XY. 2011. GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Endocrine*. 39(1):6-12.
- Chikhou F, Moloney AP, Austin FH, Roche JF, Enright WJ. 1991. Effects of cimaterol administration on plasma concentrations of various hormones and metabolites in Friesian steers. *Domest Anim Endocrinol*. 1991 Oct;8(4):471-80.
- Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Faulconnier Y, Leroux C, Djiane J, Bocquier F. 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol*. Nov;21(4):271-95.
- Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M. 2005. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol*. 29(1):3-22.
- Chilliard Y, Ferlay A, Faulconnier Y, Bonnet M, Rouel J, Bocquier F. 2000. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc Nutr Soc*. 59(1):127-134.
- Chilliard, Y., Bocquier, F., Delavaud, C., Guerre-Millo, M., Bonnet, M., Martin, P., 1998. Leptin in ruminants: effects of species, breed, adiposity, photoperiod,  $\beta$ -agonists and nutritional status. Page 65-74 in *Proc. of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. New York USA.
- Church DC. 1993. *The Ruminant Animal : Digestive Physiology and Nutrition*. 1ra Ed. USA.
- Ciccioli, N. H., Wettemann, R. P., Spicer, L. J., Lents, C. A., White, F. J. Keisler, D. H., 2003. Influence of body condition at calving and postpartum nutrition on endocrine function and reproductive performance of primiparous beef cows. *J. Anim. Sci.* 81, 3107-3120.
- Clarkson J, Herbison AE. 2009. Oestrogen, kisspeptin, GPR54 and the pre-ovulatory luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol*. 21:305-311.
- Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, O'Rahill S. 2004. Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:2557-2562.

- Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. 2007. The hormonal control of food intake. *Cell*. 20;129:251-262.
- Cooper, J, Bloom FE, Roth RH. 2003. *The biochemical basis of neuropharmacology*. 8a Ed. ED Oxford University. USA. 405 pp.
- Corcoran MP, Lamon-Fava S, Fielding RA. 2007. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am J Clin Nutr*. 85:662-77.
- Crowe MA. 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod Domest Anim*. 43 Suppl 5:20-28.
- Crown A, Clifton DK, Steiner RA. 2007. Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology*. 86:175-182.
- Cunningham MJ. 2004. Galanin-like peptide as a link between metabolism and reproduction. *J Neuroendocrinol*. 16:717-723.
- Daftary SS, Gore AC. 2005. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Exp Biol Med (Maywood)*. 230:292-306.
- Daniel PM. 1976. Anatomy of the hypothalamus and pituitary gland. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)*. 7:1-7.
- Dawson, J. M., Craigon, J., Buttery, P. J., Beever, D. E., 1993. Influence of diet and beta-agonist administration on plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in young steers. *Br. J. Nutr*. 70, 93-102.
- de Medeiros Bastos G, Brenner RH, Willke FW, Neves JP, de Oliveira JF, Bragança JF, Machado SA, Porciúncula PM, Gonçalves PB. 2004. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. *Theriogenology*. 1;62(5):847-53.
- De Souza MJ, Miller BE, Loucks AB, Luciano AA, Pescatello LS, Campbell CG, Lasley BL. High frequency of luteal phase deficiency and anovulation in recreational women runners: blunted elevation in follicle-stimulating hormone observed during luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;12:4220-4232.
- Donahoo, W. T., Jensen, D. R., Yost, T. J., Eckel, R. H., 1997. Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 82, 4139-4143.

- Drackley, J. K., 1999. ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J. Dairy Sci.* 82, 2259-2273.
- Drackley, JK, Overton, TR, Douglas GN. 2001. Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows During the Periparturient Period. *J. Dairy Sci.* 84:E100-E112.
- Duncombe, W. G., 1964. The colorimetric micro-determination of Non-esterified fatty acids in plasma. *Clin. Chim. Acta.* 9, 122-125.
- Dungan Lemko HM, Clifton DK, Steiner RA, Fraley GS. 2008. Altered response to metabolic challenges in mice with genetically targeted deletions of galanin-like peptide. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295:E605-612.
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G., 1989. A body condition score chart for Holstein cows *J Anim Sci.* 72, 68–78.
- Eisemann, J. H, Bristol, D. G., 1998. Change in insulin sensitivity or responsiveness is not a major component of the mechanism of action of ractopamine in beef steers. *J. Nutr.* 128, 505-511.
- Elam NA, Vasconcelos JT, Hilton G, VanOverbeke DL, Lawrence TE, Montgomery TH, Nichols WT, Streeter MN, Hutcheson JP, Yates DA, Galyean ML. 200. Effect of zilpaterol hydrochloride duration of feeding on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *J Anim Sci.* 87(6):2133-41.
- Etgen AM, González-Flores O, Todd BJ. 2006. The role of insulin-like growth factor-I and growth factor-associated signal transduction pathways in estradiol and progesterone facilitation of female reproductive behaviors. *Front Neuroendocrinol.* 27:363-375.
- Eva C, Serra M, Mele P, Panzica G, Oberto A. 2006. Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. *Front Neuroendocrinol.* 27:308-339.
- Fernandez-Galaz MC, Naftolin F, Garcia-Segura LM. 1999. Phasic synaptic remodeling of the rat arcuate nucleus during the estrous cycle depends on insulin-like growth factor-I receptor activation. *J Neurosci Res.* 55(3):286-292.
- Fraley GS, Scarlett JM, Shimada I, Teklemichael DN, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. 2004. Effects of diabetes and insulin on the expression of galanin-like peptide in the hypothalamus of the rat. *Diabetes.* 53:1237-1242.

- Friedman JM, Halaas JL. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395:763-770.
- Frisch, R. E., McArthur, J. W., 1974. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science*. 13, 185: 949-951.
- Gamba M, Pralong FP. 2006. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: the role of leptin and insulin. *Mol Cell Endocrinol*. 25:254-255:133-9.
- Geary TW, McFadin EL, MacNeil MD, Grings EE, Short RE, Funston RN, Keisler DH. 2003. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *J Anim Sci*. 81(1):1-8.
- Gerozissis K. 2008. Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol*. 585(1):38-49.
- Giustina A, Veldhuis JD. 1998. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev*. 19(6):717-797.
- Gong, J. G., Lee, W. J., Garnsworthy, P. C., Webb, R., 2002. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 123, 419-427.
- Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ. 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*. 148:5752-5760.
- Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Galanin-like peptide as a link in the integration of metabolism and reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15:215-221.
- Greenaway J, Connor K, Pedersen G.H, Coomber L.B, Lamarre J, and Petrik J.2004. Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor, Flk-1/KDR, Are Cytoprotective in the Extravascular Compartment of the Ovarian Follicle. *Endocrinology* 145:2896–2905.
- Grimard B, Humblot P, Mialot JP, Jeanguyot N, Sauvant D, Thibier M. 1997. Absence of response to oestrus induction and synchronization treatment is related to lipid mobilization in suckled beef cows. *Reprod Nutr Dev*. 37(2):129-40.

- Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod.* 56(3):608-16.
- Gutiérrez, C.G., Gong, J. G., Bramley, T. A., Webb, R., 2006. Selection on predicted breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development, milk production and body weight. *Anim. Reprod. Sci.* 95, 193-205.
- Guzmán, S. A., Garcés-Yepez, P., González-Padilla, E., Rosete, F. J., Calderón C. R., Gutiérrez, C. G., 2008. La Respuesta a un programa de inducción de la ciclicidad de vacas productoras de carne con cría es afectada por la condición corporal. Page 1867. In XXI Congreso panamericano de Ciencias Veterinarias. Guadalajara México.
- Hadley, M.E. 1996. Pancreatic hormones and metabolic regulation. *Endocrinology.* 4a Ed. ED. Prentice Hall. NY USA. 231-255.
- Hady PJ, Domecq JJ, Kaneene JB. 1994. Frequency and precision of body condition scoring in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 77(6):1543-1547.
- Havel PJ. 2004. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes.* 1:S143-51.
- Hayirli A. 2006. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet Res Commun.* 30(7):749-74.
- Hess, B. W., Lake, S. L., Scholljegerdes, E. J., Weston, T. R., Nayigihugu, V., Molle J. D. C., Moss, G. E., 2005. Nutritional controls of beef cow reproduction. *J. Anim. Sci.* 83, E90-E106.
- Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. 2008. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294:E827-832.
- Hiney JK, Ojeda SR, Dees WL. 1991. Insulin-like growth factor I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. *Neuroendocrinology.* 54:420-423.
- Hiney JK, Srivastava V, Nyberg CL, Ojeda SR, Dees WL. 1996. Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology.* 137:3717-3728.



- Holland BP, Krehbiel CR, Hilton GG, Streeter MN, Vanoverbeke DL, Shook JN, Step DL, Burciaga-Robles LO, Stein DR, Yates DA, Hutcheson JP, Nichols WT, Montgomery JL. 2010. Effect of extended withdrawal of zilpaterol hydrochloride on performance and carcass traits in finishing beef steers. *J Anim Sci.* 88(1):338-348.
- Honparkhe, M., Singh, J., Dadarwal, D., Dhaliwa, G. S., Kumar, A., 2008. Estrus induction and fertility rates in response to exogenous hormonal administration in postpartum anestrous and subestrus bovines and buffaloes. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 1327-1331.
- Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H. 2002. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol Reprod.* 67(4):1099-105.
- Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. 2007. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293(1):G1-4.
- Jenkins TC. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J Dairy Sci.* 76(12):3851-3863.
- Jennes L, Conn PM. 1994. Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in rat brain. *Front Neuroendocrinol.* 15:51-77.
- Jur us A, Cunningham MJ, McClain ME, Clifton DK, Steiner RA. 2000. Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology.* 141(7):2703-2706.
- Kadokawa H, Matsui M, Hayashi K, Matsunaga N, Kawashima C, Shimizu T, Kida K, Miyamoto A. 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *Endocrinol.* 196(2):331-334.
- Kageyama H, Takenoya F, Kita T, Hori T, Guan JL, Shioda S. 2005. Galanin-like peptide in the brain: effects on feeding, energy metabolism and reproduction. *Regul Pept.* 126:21-26.
- Kalamatianos T, Grimshaw SE, Poorun R, Hahn JD, Coen CW. 2008. Fasting reduces KiSS-1 expression in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV): effects of fasting on the expression of KiSS-1 and neuropeptide Y in the AVPV or arcuate nucleus of female rats. *J Neuroendocrinol.* 20:1089-1097.

- Kammula RG. 1976. Metabolism of ketone bodies by ovine brain in vivo. *Am J Physiol.* 231(5 Pt. 1):1490-1494.
- Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Montoya CA, Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake Y, Schams D, Miyamoto A. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction.* 2007;133:155-63.
- Kawashima, C., Fukihara, S., Maeda, M., Kaneko, E., Montoya, C. A., Matsui, M., Shimizu, T., Matsunaga, N., Kida, K., Miyake, Y., Schams, D., Miyamoto, A., 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction* 133, 155-163.
- Kearns CF, McKeever KH, Malinowski K. 2006. Changes in adiponectin, leptin, and fat mass after clenbuterol treatment in horses. *Med Sci Sports Exerc.* 38(2):262-267.
- Kim HH, DiVall SA, Deneau RM, Wolfe A. 2005. Insulin regulation of GnRH gene expression through MAP kinase signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol.* 20;242:42-49.
- Konigsson K, Savoini G, Govoni N, Invernizzi G, Prandi A, Kindahl H, Veronesi MC. 2008. Energy balance, leptin, NEFA and IGF-I plasma concentrations and resumption of post partum ovarian activity in Swedish Red and White breed cows. *Acta Vet Scand.* 9;50:3.
- Könner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, Xu C, Enriori P, Hampel B, Barsh GS, Kahn CR, Cowley MA, Ashcroft FM, Brüning JC. 2007. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab.* 5:438-449.
- Koonen, D. P., Glatz, J. F., Bonen, A., Luiken, J. J., 2005. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1, 163-180.
- Lamond, D. R., 1970. The influence of undernutrition on the reproduction of the cow. *Anim. Breed. Abstr.* 38, 359-372
- Larsen TM, Toubro S, van Baak MA, Gottesdiener KM, Larson P, Saris WH, Astrup A. 2002. Effect of a 28-d treatment with L-796568, a novel beta(3)-adrenergic receptor

- agonist, on energy expenditure and body composition in obese men. *Am J Clin Nutr.* 2002 Oct;76(4):780-8.
- Le Roith D. 2003. The insulin-like growth factor system. *Exp Diabetes Res.* 4:205-12.
- Lehninger AL. 2005. *Principios Básicos de Bioquímica.* 4ta Ed. ED Omega. Barcelona España. 1158 pp.
- Lents CA, White FJ, Ciccioli NH, Wettemann RP, Spicer LJ, Lalman DL. 2008. Effects of body condition score at parturition and postpartum protein supplementation on estrous behavior and size of the dominant follicle in beef cows. *J Anim Sci.* 86(10):2549-56.
- León HV, Hernández-Cerón J, Keislert DH, Gutiérrez CG. 2004. Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J Anim Sci.* 82(2):445-451.
- Liefers SC, Veerkamp RF, Te Pas MF, Chilliard Y, Van der Lende T. 2005. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. *Domest Anim Endocrinol.* 29(1):227-38.
- Loes DJ, Barloon TJ, Yuh WT, DeLaPaz RL, Sato Y.MR 1991. Anatomy and pathology of the hypothalamus. *AJR Am J Roentgenol.* 156:579-585.
- Lu JY, Huang KC, Chang LC, Huang YS, Chi YC, Su TC, Chen CL, Yang WS. 2008. Adiponectin: a biomarker of obesity-induced insulin resistance in adipose tissue and beyond. *J Biomed Sci.* 15(5):565-76.
- Maciel MN, Zieba DA, Amstalden M, Keisler DH, Neves JP, Williams GL. 2004. Leptin prevents fasting-mediated reductions in pulsatile secretion of luteinizing hormone and enhances its gonadotropin-releasing hormone-mediated release in heifers. *Biol Reprod.* 70(1):229-235.
- Magoffin DA, Weitsman SR. 1994. Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod.* 51(4):766-75.
- Man PS, Lawrence CB. 2008. Galanin-like peptide: a role in the homeostatic regulation of energy balance? *Neuropharmacology.* 55:1-7.

- Mason, G. L. and R. D. Randel. 1983. Effect of monensin and suckling on the GnRH induced luteinizing hormone surge and the effect of monensin on the postpartum interval in Brangus cows. *Theriogenology*. 19:33-31.
- Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. 1997. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. 138(8):3320-3329.
- McManus CJ, Fitzgerald BP. 2003. Effect of daily clenbuterol and exogenous melatonin treatment on body fat, serum leptin and the expression of seasonal anestrus in the mare. *Anim Reprod Sci*. 76(3-4):217-30.
- Mersmann HJ. 1998. Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *Anim Sci*. 1998 Jan;76(1):160-72.
- Metwally M, Ledger WL, Li TC. 2008. Reproductive endocrinology and clinical aspects of obesity in women. *Ann N Y Acad Sci*. 1127:140-146.
- Michalakis KG, Segars JH. 2010. The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertil Steril*. 94(6):1949-57.
- Miller DW, Blache D, Martin GB. 1995. The role of intracerebral insulin in the effect of nutrition on gonadotrophin secretion in mature male sheep. *J Endocrinol*. 147:321-329.
- Miller DW, Harrison JL, Bennett EJ, Findlay PA, Adam CL. 2007. Nutritional influences on reproductive neuroendocrine output: insulin, leptin, and orexigenic neuropeptide signaling in the ovine hypothalamus. *Endocrinology*. 148:5313-5322.
- Montgomery JL, Krehbiel CR, Cranston JJ, Yates DA, Hutcheson JP, Nichols WT, Streeter MN, Bechtol DT, Johnson E, TerHune T, Montgomery TH. 2009. Dietary zilpaterol hydrochloride. I. Feedlot performance and carcass traits of steers and heifers. *J Anim Sci*. 87(4):1374-83.
- Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA, Stanhope KL, Fernández-Otero MP, Havel PJ. 2002. Effects of Trecadrine, a beta3-adrenergic agonist, on leptin secretion, glucose and lipid metabolism in isolated rat adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 26(7):912-919.

- Morrison DG, Spitzer JC, Perkins JL. 1999. Influence of prepartum body condition score change on reproduction in multiparous beef cows calving in moderate body condition. *J Anim Sci.* 77(5):1048-1054.
- Nagatani S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL, Jaffe CA. 2000. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinology.* 141(11):3965-75.
- National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: 7a Ed.* USA. 296 pp.
- Board on Agriculture and Natural Resources (BANR)
- O'Connor, R. M., Butler, W. B., Finnerty, K. D., Hogue, D. E., Beermann, D. H., 1991. Acute and chronic hormone and metabolite changes in lambs fed the beta-agonist, cimaterol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 8, 537-548.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau US. 2008. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol.* 20:732-742.
- Paredes AH, Salvetti NR, Diaz AE, Dallard BE, Ortega HH, Lara HE. 2011. Sympathetic nerve activity in normal and cystic follicles from isolated bovine ovary: local effect of beta-adrenergic stimulation on steroid secretion. *Reprod Biol Endocrinol.* 16;9:66.
- Pesta M, Muszynska A, Kucharski J, Superata J, Kotwica J. Beta-adrenergic receptors in corpora lutea from different stages of the estrous cycle in conscious and slaughtered cattle. *Biol Reprod.* 50(1):215-221.
- Randel RD. 1990. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *J Anim Sci.* 68(3):853-862.
- Raposinho PD, Broqua P, Pierroz DD, Hayward A, Dumont Y, Quirion R, Junien JL, Aubert ML. 1999. Evidence that the inhibition of luteinizing hormone secretion exerted by central administration of neuropeptide Y (NPY) in the rat is predominantly mediated by the NPY-Y5 receptor subtype. *Endocrinology.* 140:4046-55.
- Rhodes, FM, Entwistle, KW, Kinder E. 1996. Changes in Ovarian Function and Gonadotropin Secretion Preceding the Onset of Nutritionally Induced Anestrus in *Bos indicus* Heifers. *Biol Reprod.* 55;1437-1443

- Ricci, M.R., Lee, M. J., Russell, C. D., Wang, Y., Sullivan, S., Schneider, S. H., Brodin, R. E., Fried, S. K., 2005. Isoproterenol decreases leptin release from rat and human adipose tissue through posttranscriptional mechanisms. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E798-E804.
- Richards MW, Wettemann RP, Schoenemann HM. 1989b. Nutritional anestrus in beef cows: concentrations of glucose and nonesterified fatty acids in plasma and insulin in serum. *J Anim Sci.* 67:2354-2362.
- Richards MW, Wettemann RP, Spicer LJ, Morgan GL. 1991. Nutritional anestrus in beef cows: effects of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. *Biol Reprod.* 44(6):961-966.
- Richards, M.W., Wettemann, R.P., Schoenemann, H.M. 1989a. Nutritional anestrus in beef cows: body weight change, body condition, luteinizing hormone in serum and ovarian activity. *Journal of Animal Science.* 67:1520-1526.
- Rivera MG, Fortune EJ. 2003. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology* 144:437-46.
- Roberts AJ, Nugent RA 3rd, Klindt J, Jenkins TG. Circulating insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and resumption of estrus in postpartum cows subjected to dietary energy restriction. *J Anim Sci.* 1997;75:1909-17.
- Roberts, A. J., Nugent, R. A., 3rd ., Klindt, J., Jenkins, T. G., 1997. Circulating insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and resumption of estrus in postpartum cows subjected to dietary energy restriction. *J. Anim. Sci.* 75, 1909-1917.
- Robertson SA, Leininger GM, Myers MG Jr. 2008. Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol Behav.* 6;94:637-642
- Roche, J.R., Friggens, N.C., Kay, J.K., Fisher, M.W., Stafford, K.J., Berry, D.P. 2009. Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J Dairy Sci.* 92, 5769-801.

- Rosales AM, Guzmán A. 2008. Apoptosis in follicular atresia and luteal regression. Review. *Téc Pec. Méx.* 46 (2): 159-182
- Roseweir AK, Millar RP. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum Reprod Update.* 2009;15:203-212.
- Rutter LM, Manns JG. 1987. Hypoglycemia alters pulsatile luteinizing hormone secretion in the postpartum beef cow. *J Anim Sci.* 64(2):479-488.
- Rutter LM, Randel RD, Schelling GT, Forrest DW. 1983. Effect of abomasal infusion of propionate on the GnRH-induced luteinizing hormone release in prepuberal heifers. *J Anim Sci.* 56(5):1167-73.
- Sainsbury A, Schwarzer C, Couzens M, Jenkins A, Oakes SR, Ormandy CJ, Herzog H. 2002. Y4 receptor knockout rescues fertility in ob/ob mice. *Genes Dev.* 16(9):1077-88.
- Saleem SN, Said AH, Lee DH. 2007. Lesions of the hypothalamus: MR imaging diagnostic features. *Radiographics.* 27:1087-1108.
- Salvi R, Castillo E, Voirol MJ, Glauser M, Rey JP, Gaillard RC, Vollenweider P, Pralong FP. 2006. Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology.* 147:816-826.
- Sandhu MS, Heald AH, Gibson JM, Cruickshank JK, Dunger DB, Wareham NJ. 2002. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance: a prospective observational study. *Lancet.* 18;359:1740-1745.
- Schillo KK. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci.* 70:1271-1282.
- Schneider JE. 2004. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav.* 81:289-317.
- Schröder UJ, Staufenbiel R. 2006. Invited review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness. *J Dairy Sci.* 2006 Jan;89(1):1-14.
- Shimada MA. 2003. *Nutrición Animal.* 1ra Ed. ED.Trillas. Mexico D.F. 397 pp.
- Shimizu T, Murayama C, Sudo N, Kawashima C, Tetsuka M, Miyamoto A. 2008. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim Reprod Sci.* 106(1-2):143-152.

- Simpson RB, Chase CC Jr, Spicer LJ, Vernon RK, Hammond AC, Rae DO. 1994. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *J Reprod Fertil.* 102(2):483-492.
- Sinclair KD, Molle G, Revilla R, Roche JF, Quintans G, Marongiu L, Sanz A, Mackey DR, Diskin MG. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 post partum in suckling beef cows. *Animal Science.* 2002;75:115-126.
- Sinclair, K. D., Molle, G., Revilla, R., Roche, J. F., Quintans, G., Marongiu, L., Sanz, A., Mackey, D. R., Diskin, M. G., 2002. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 post partum in suckling beef cows. *Anim. Sci.* 75, 115-126.
- Sissom, E. K., Reinhardt, C. D., Hutcheson, J. P., Nichols, W. T., Yates, D. A., Swingle, R. S., Johnson, B. J., 2007. Response to ractopamine-HCl in heifers is altered by implant strategy across days on feed. *J. Anim. Sci.* 85, 2125-2132.
- Smith MJ, Jennes L. 2001. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction.* 122:1-10.
- Spicer LJ. 2001. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol.* 21:251-70.
- Spicer LJ, Schreiber NB, Lagaly DV, Aad PY, Douthit LB, Grado-Ahuir JA. 2011. Effect of resistin on granulosa and theca cell function in cattle. *Anim Reprod Sci.* 124(1-2):19-27.
- Stagg K, Spicer LJ, Sreenan JM, Roche JF, Diskin MG. 1998. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. *Biol Reprod.* 59(4):777-783.
- Stanley SA, Davies S, Small CJ, Gardiner JV, Ghatei MA, Smith DM, Bloom SR. 2003. gamma-MSH increases intracellular cAMP accumulation and GnRH release in vitro and LH release in vivo. *FEBS Lett.* 22;543:66-70.
- Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. 1995. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced



- steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J Anim Sci.* 73(12):3719-3731.
- Strauch TA, Neuendorff DA, Brown CG, Wade ML, Lewis AW, Keisler DH, Randel RD. 2003. Effects of lasalocid on circulating concentrations of leptin and insulin-like growth factor-I and reproductive performance of postpartum Brahman cows. *J Anim Sci.* 1(6):1363-70.
- Suzuki S, Kadokawa H, Hashizume T. 2008. Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci.* 30;103:360-365.
- Taylor JA, Goubillon ML, Broad KD, Robinson JE. 2007. Steroid control of gonadotropin-releasing hormone secretion: associated changes in pro-opiomelanocortin and preproenkephalin messenger RNA expression in the ovine hypothalamus. *Biol Reprod.* 76:524-531.
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev.* Feb;15(1):80-101.
- Tortoriello DV, McMinn JE, Chua SC. 2007. Increased expression of hypothalamic leptin receptor and adiponectin accompany resistance to dietary-induced obesity and infertility in female C57BL/6J mice. *Int J Obes (Lond).* 31(3):395-402.
- Trayhurn, P., Duncan, J. S., Hoggard, N., Rayner, D. V., 1998. Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proc. Nutr. Soc.* 57, 413-419.
- Trojan J, Cloix JF, Ardourel MY, Chatel M, Anthony DD. 2007. Insulin-like growth factor type I biology and targeting in malignant gliomas. *Neuroscience.* 30;145:795-811.
- True C, Gove KL, Smith S. 2011a. Beyond leptin: emerging candidates for the integration of metabolic and reproductive function during negative energy balance. *Frontiers of Endocrinology.* 53:1-12.
- True C, Kirigiti MA, Kievit P, Grove KL, Smith MS. 2011b. Leptin is not the critical signal for kisspeptin or luteinising hormone restoration during exit from negative energy balance. *J Neuroendocrinol.* 23(11):1099-1112.
- Uenoyama Y, Tsukamura H, Kinoshita M, Yamada S, Iwata K, Pheng V, Sajapitak S, Sakakibara M, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda KI. 2008. Oestrogen-dependent

- stimulation of luteinising hormone release by galanin-like peptide in female rats. *J Neuroendocrinol.* 20:626-31.
- Vasconcelos JT, Rathmann RJ, Reuter RR, Leibovich J, McMeniman JP, Hales KE, Covey TL, Miller MF, Nichols WT, Galyean ML. 2008. Effects of duration of zilpaterol hydrochloride feeding and days on the finishing diet on feedlot cattle performance and carcass traits. *J Anim Sci.* 86(8):2005-2015.
- Vernon RG, Flint DJ. 1988. Lipid metabolism in farm animals. *Proc Nutr Soc.* 47(3):287-93.
- Vernon RG. 2005. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J Dairy Res.* 72(4):460-469.
- Vizcarra JA, Wettemann RP, Spitzer JC, Morrison DG. 1998. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *J Anim Sci.* 76(4):927-936.
- Wagner JJ, Lusby KS, Oltjen JW, Rakestraw J, Wettemann RP, Walters LE. 1988. Carcass composition in mature Hereford cows: estimation and effect on daily metabolizable energy requirement during winter. *J Anim Sci.* 66(3):603-612.
- Walker, D. K., Titgemeyer, E. C., Sissom, E. K., Brown, K. R., Higgins, J. J., Andrews, G. A., Johnson, B. J., 2007. Effects of steroidal implantation and ractopamine-HCl on nitrogen retention, blood metabolites and skeletal muscle gene expression in Holstein steers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91, 439-447.
- Ward DR, Dear FM, Ward IA, Anderson SI, Spergel DJ, Smith PA, Ebling FJ. 2009. Innervation of gonadotropin-releasing hormone neurons by peptidergic neurons conveying circadian or energy balance information in the mouse. *PLoS One.* 4:e5322.
- Watanobe H. 2002. Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *J Physiol.* 545:255-68.
- Wen JP, Lv WS, Yang J, Nie AF, Cheng XB, Yang Y, Ge Y, Li XY, Ning G. 2008. Globular adiponectin inhibits GnRH secretion from GT1-7 hypothalamic GnRH neurons by induction of hyperpolarization of membrane potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 371(4):756-61.

- Werner H, Weinstein D, Bentov I. 2008. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways. *Arch Physiol Biochem.* 114:17-22.
- Wettemann, R. P., Lents, C. A., Ciccioli, N. H., White F. J., Rubio, I., 2003. Nutritional- and suckling-mediated anovulation in beef cows. *J. Anim. Sci.* 81, E48-E59.
- Winterholler, S. J., Parson, G. L., Walker, D. K., Quinn, M. J., Drouillard, J. S., Johnson, B. J., 2008. Effect of feedlot management system on response to ractopamine-HCl in yearling steers. *J. Anim. Sci.* 86, 2401-2414.
- Xu J, Kirigiti MA, Cowley MA, Grove KL, Smith MS. 2009. Suppression of basal spontaneous gonadotropin-releasing hormone neuronal activity during lactation: role of inhibitory effects of neuropeptide Y. *Endocrinology.* 150:333-340.
- Yang MJ, Wang F, Wang JH, Wu WN, Hu ZL, Cheng J, Yu DF, Long LH, Fu H, Xie N, Chen JG. 2010. PI3-k integrates the effects of insulin and leptin on large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*
- Yost WM, Young JW, Schmidt SP, McGilliard AD. 1977. Gluconeogenesis in ruminants: propionic acid production from a high-grain diet fed to cattle. *J Nutr.* 107(11):2036-43.
- Zalesky DD, Day ML, Garcia-Winder M, Imakawa K, Kittok RJ, D'Occhio MJ, Kinder JE. 1984. Influence of exposure to bulls on resumption of estrous cycles following parturition in beef cows. *J Anim Sci.* 1984 Nov;59(5):1135-9.
- Zhang, Y. Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-432
- Zieba, D. A., Amstalden, M., Maciel, M. N., Keisler, D. H., Raver, N., Gertler, A., Williams, G. L., 2003. Divergent effects of leptin on luteinizing hormone and insulin secretion are dose dependent. *Exp. Biol. Med.* 228, 325-330.
- Zieba, D. A., Amstalden, M., Williams, G. L., 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 166-185.