



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

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

**ANÁLISIS DE LA RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LOS ESTADOS  
ENERGÉTICOS ESTÁTICO Y DINÁMICO Y SU PAPEL EN LA  
REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA EN RUMIANTES**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**MARIO ALFREDO ESPINOSA MARTÍNEZ**

**TUTOR: EVERARDO GONZÁLEZ PADILLA**

**COMITÉ TUTORAL: HÉCTOR R. VERA ÁVILA**

**ALEJANDRO VILLA GODOY**

**MÉXICO D.F.**

**2010**



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.

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b>	<b>IV</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Estacionalidad reproductiva de cabras</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Efectos de la nutrición sobre la reproducción de cabras</b>	<b>5</b>
2.2.1 Reinicio de la actividad ovárica	5
2.2.2. Desarrollo folicular	6
2.2.3 Concentración de hormonas en la circulación	7
2.2.4 Duración del ciclo estral y la presentación de estro	10
<b>2.3 Efectos de la condición energética sobre la reproducción de cabras</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Hormonas y metabolitos asociados a la movilización de energía</b>	<b>13</b>
2.4.1 Leptina	13
2.4.2 Insulina	19
2.4.3 Glucagón	25
2.4.4 Glucosa	28
2.4.5 Ácidos Grasos no Esterificados	35
2.4.6 Urea	38
2.4.7 Cuerpos cetónicos	39
2.4.8 Hormona del crecimiento	40
2.4.9 Catecolaminas	41
2.4.10 Hormonas tiroideas	41
<b>2.5 Mecanismos que regulan los efectos de la nutrición sobre la secreción de GnRH-LH</b>	<b>46</b>
2.5.1 Glucosa	46
2.5.2 Insulina	48
2.5.3 Leptina	50
2.5.4 Otros señalizadores	55
<b>2.6 Leptina y su ritmo circadiano de secreción</b>	<b>55</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>60</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>60</b>

<b>V.</b>	<b>LEPTIN CIRCADIAN RHYTHM EXPRESSION IN GOATS WITH DIFFERENT BODY MASS INDEX AND DURING DIFFERENT SEASONS</b>	<b>61</b>
<b>VI.</b>	<b>CONSUMO DE ALIMENTO COMO REGULADOR DE LAS CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE METABOLITOS, SECRECIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE Y HORMONAS METABÓLICAS</b>	<b>65</b>
	6.1 Introducción	65
	6.2 Hipótesis	66
	6.3 Objetivos	66
	6.4 Material y Métodos	66
	6.5 Resultados	70
	6.6 Discusiones	86
	6.7 Conclusiones	95
	6.8 Literatura citada	96
<b>VII.</b>	<b>INSULINA COMO REGULADOR DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE</b>	<b>101</b>
	7.1 Introducción	101
	7.2 Hipótesis	102
	7.3 Objetivos	102
	7.4 Material y Métodos	102
	7.5 Resultados	106
	7.6 Discusiones	115
	7.7 Conclusiones	119
	7.8 Literatura citada	119
<b>VIII.</b>	<b>GLUCOSA COMO REGULADOR DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE</b>	<b>122</b>
	8.1 Introducción	122
	8.2 Hipótesis	123
	8.3 Objetivos	123
	8.4 Material y Métodos	123
	8.5 Resultados	126
	8.6 Discusiones	134
	8.7 Conclusiones	138
	8.8 Literatura citada	139
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>141</b>
<b>X.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>142</b>

## RESUMEN

Con la finalidad de analizar la relación existente entre señales del estado energético dinámico (asociadas a la alimentación) y estático (asociadas al índice de masa corporal), sobre la secreción de la hormona luteinizante (LH) en cabras y su modulación de acuerdo a la etapa del ciclo reproductivo anual, se realizaron cuatro estudios. En el primero, se determinó la presencia de ritmos circadianos en la concentración circulante de leptina en cabras ovariectomizadas y con un implante sc conteniendo  $17\beta$ -estradiol y la expresión de estos ritmos bajo un diferente estado energético estático y etapa del ciclo reproductivo anual. Se observaron ritmos circadianos ( $P < 0.10$ ) en 5/8 cabras y su presentación fue mayor en animales con un índice de masa corporal alto (IMCA) vs un índice de masa corporal bajo (IMCB), sólo durante la época reproductiva ( $P < 0.001$ ). En el segundo estudio, se analizaron las respuestas de señales asociadas al metabolismo energético dinámico y su modulación por el estado energético estático y etapa del ciclo reproductivo anual, sobre la regulación de la secreción de hormona luteinizante, como indicador de la función reproductiva de la especie caprina. Cabras en condiciones de ayuno disminuyeron ( $P = 0.046$ ) la frecuencia de pulsos de LH en comparación a las cabras en estado posprandial. Por otro lado, la interacción entre la época y la alimentación afectó de manera significativa la amplitud de los pulsos de LH ( $P = 0.047$ ), y las concentraciones circulantes de insulina ( $P < 0.001$ ), glucosa ( $P = 0.004$ ) y la relación insulina:glucagón ( $P < 0.001$ ), presentándose mayores valores en las cabras en estado posprandial vs en ayuno, sólo durante la época de transición (ET). En un tercer estudio, se analizó la función de insulina (estado hiperinsulinémico-euglicémico, EHE) sobre la regulación de la secreción de LH en cabras y su modulación por el estado energético estático y etapa del ciclo reproductivo anual. Se observó una depresión ( $P = 0.057$ ) en la frecuencia de pulsos de LH durante el periodo del EHE en comparación al periodo previo. Adicionalmente, la concentración promedio ( $P = 0.004$ ) y basal de LH ( $P = 0.005$ ) fueron mayores en animales con un IMCA vs un IMCB, sólo durante la ET. Finalmente, se analizó la función de glucosa como reguladora de la secreción de LH y su modulación por el estado energético estático y/o etapa del ciclo reproductivo anual. Durante un periodo de disminución metabólica de glucosa, por la administración de 2-deoxiglucosa (2DG), existió una caída en la frecuencia pulsátil de LH en comparación al periodo previo, sólo en animales con un IMCA ( $P = 0.087$ ). Además, durante el periodo de administración de 2DG aumentaron las concentraciones circulantes de insulina ( $P < 0.001$ ) y glucosa ( $P < 0.001$ ), en comparación al periodo previo. Se concluye que el estado posprandial y una mayor cantidad de reservas corporales de energía en segundo

término, tienen efectos favorables sobre la secreción de LH durante la ET. Insulina y glucosa pueden actuar como reguladores de la secreción de LH, aunque sus efectos son opuestos y leptina tiene un menor involucramiento en esta regulación de la actividad reproductiva en la especie caprina.

Palabras clave: Cabras, LH, IMC, Insulina, Glucosa, Leptina

## ABSTRACT

Four studies were made to analyze the relationship between dynamic and static energy metabolism on LH secretion in goats and its modulation by the stage of annual reproductive cycle. Initially, the occurrence of circadian rhythms of serum leptin concentrations was determined in ovariectomized goats with a sc implant containing  $17\beta$ -estradiol, and the expression of these rhythms under different body mass index (BMI) and stage of the annual reproductive cycle. There were circadian rhythms ( $P < 0.10$ ) in 5 out of 8 goats and there were more rhythms in goats with a high body mass index (HBMI) vs low body mass index (LBMI) but only during reproductive season ( $P < 0.001$ ). In a second study, the response of signals associated to dynamic energy metabolism and its modulation by static energy status (body mass index) and annual reproductive cycle on regulation of luteinizing hormone secretion in caprine species was analyzed. Fasted goats showed lower LH pulse frequency vs goats in postprandial status ( $P = 0.046$ ). Additionally, the season x feeding interaction affected the LH pulse amplitude ( $P = 0.047$ ) and circulating concentrations of insulin ( $P < 0.001$ ), glucose ( $P < 0.004$ ) and insulin:glucagon ( $P < 0.001$ ) with higher values in postprandial vs fasted goats only during transition season (TS). In a third study, the role of insulin (hyperinsulinemic-euglycemic status) on regulation of LH secretion and its modulation by static energy status and stage of the annual reproductive cycle was analyzed. LH pulse frequency ( $P = 0.057$ ) was lower during the hyperinsulinemic-euglycemic condition vs the previous period. Additionally, both the mean and basal LH concentrations were higher in goats with HBMI vs LBMI only during TS. Finally, the role of glucose as regulator of LH secretion and its modulation by static energy status and annual reproductive cycle was analyzed. During a period of glucose metabolic deprivation by iv administration of 2-deoxyglucose (2DG), there was a lower LH pulse frequency vs the previous period, only in goats with a HBMI ( $P = 0.087$ ). Additionally 2DG administration raised the circulating concentrations of insulin ( $P < 0.001$ ) and glucose ( $P < 0.001$ ) vs the previous period. It is concluded that a postprandial condition and higher body energy reserves caused a higher LH pulse frequency during transition to anestrus season. Insulin and glucose can act as regulators of LH secretion, having opposite effects and leptin is less involved in this regulation in goat species.

Key words: Goats, LH, BMI, Insulin, Glucose, Leptin.

## **LISTA DE CUADROS**

### **LEPTIN CIRCADIAN RHYTHM EXPRESSION IN GOATS WITH DIFFERENT BODY MASS INDEX AND DURING DIFFERENT SEASONS**

Table 1. Leptin circadian rhythms in female goats with different body mass index, during different seasons of the year.

Table 2. Leptin circadian rhythms in goats with different body mass index, during different seasons of the year ( $P < 0.001$ ).

Table 3. Leptin Mesor, amplitude and serum basal concentrations in goats with different body mass index, during different seasons of the year.

### **CONSUMO DE ALIMENTO COMO REGULADOR DE LAS CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE METABOLITOS, DE LA HORMONA LUTEINIZANTE Y HORMONAS METABÓLICAS**

Cuadro 1. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, alimentación, época y sus interacciones dobles sobre hormonas y metabolitos.

Cuadro 2. Valores promedio de las diferentes hormonas y metabolitos de acuerdo al índice de masa corporal, alimentación y época (medias mínimo cuadráticas).

Cuadro 3. Coeficiente de correlación y valor de probabilidad para las diferentes variables asociadas a LH, hormonas metabólicas y metabolitos en cabras.

Cuadro 4. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, época, tiempo y sus interacciones dobles sobre hormonas y metabolitos, durante el ayuno de cabras.

Cuadro 5. Valores promedio de las diferentes hormonas y metabolitos de acuerdo al índice de masa corporal y época, durante el ayuno de cabras (medias mínimo cuadráticas).

Cuadro 6. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, época, tiempo y sus interacciones dobles sobre hormonas y metabolitos, durante el posprandio de cabras.

Cuadro 7. Valores promedio de las diferentes hormonas y metabolitos de acuerdo al índice de masa corporal y época, en estado posprandial (medias mínimo cuadráticas).



## INSULINA COMO REGULADOR DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA LUTENIZANTE

Cuadro 1. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, administración de insulina y época y sus interacciones dobles sobre la secreción de LH, leptina, insulina y glucosa de cabras.

Cuadro 2. Valores promedio de características de secreción de LH, leptina, insulina y glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal, administración de insulina, diferente dosis de insulina y época (medias mínimo cuadráticas).

Cuadro 3. Valores de índice de masa corporal para los factores índice de masa corporal, dosis de insulina administrada y época del año y valores de probabilidad para sus diferentes interacciones.

Cuadro 4. Coeficiente de correlación y valor de probabilidad para las variables asociadas a LH, leptina, insulina y glucosa en cabras.

Cuadro 5. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, dosis de insulina y época y sus interacciones sobre la secreción de LH, leptina, insulina y glucosa durante las 4 h de administración de insulina en cabras.

Cuadro 6. Valores promedio de secreción de LH, leptina, insulina y glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal, dosis administrada de insulina y en diferente época, posterior a la administración de insulina (medias mínimo cuadráticas).

Cuadro 7. Cantidad de glucosa administrada durante el periodo de aplicación de insulina, a cabras con diferente índice de masa corporal, dosis de insulina, época y valores de probabilidad para las diferentes interacciones dobles.

## GLUCOSA COMO REGULADOR DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE

Cuadro 1. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, administración de 2DG y época y sus interacciones dobles sobre la secreción de LH, leptina, insulina y glucosa de cabras.

Cuadro 2. Valores promedio de características de secreción de LH, leptina, insulina y glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal, administración de 2DG y época (medias mínimo cuadráticas).

Cuadro 3. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, dosis de 2DG, época y sus interacciones dobles sobre la secreción de LH, leptina, insulina y glucosa de cabras.

Cuadro 4. Valores promedio de características de secreción de LH, leptina, insulina y glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal, dosis de 2DG y época (medias mínimo cuadráticas $\pm$ ee).

Cuadro 5. Valores de índice de masa corporal para los factores Índice de masa corporal, dosis de 2DG administrada y época del año y valores de probabilidad para las diferentes interacciones dobles.

Cuadro 6. Coeficientes de correlación y valores de probabilidad entre leptina, insulina, glucosa, pulsos de LH y concentración promedio, basal y amplitud de LH.

## LISTA DE GRÁFICAS

CONSUMO DE ALIMENTO COMO REGULADOR DE LAS CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE METABOLITOS, DE LA HORMONA LUTEINIZANTE Y HORMONAS METABÓLICAS

Gráfica 1. Amplitud de pulsos de LH en cabras en ayuno y posprandio durante la época reproductiva y en transición al anestro ( $P=0.047$ ).

Gráfica 2. Concentración sérica de leptina en cabras en ayuno y posprandio durante la época reproductiva y en transición al anestro ( $P<0.001$ ).

Gráfica 3. Concentración sérica de insulina en cabras en ayuno y posprandio, durante la época reproductiva y en transición al anestro ( $P<0.001$ ).

Gráfica 4. Relación Insulina:Glucagón en cabras durante el ayuno y posprandio en diferente época ( $P<0.001$ ).

Gráfica 5. Relación Insulina:Glucagón en cabras con diferente índice de masa corporal, durante la época reproductiva y de transición al anestro ( $P=0.097$ ).

Gráfica 6. Relación Insulina:Glucagón en cabras con diferente índice de masa corporal, durante el ayuno y posprandio ( $P=0.095$ ).

Gráfica 7. Concentración sérica de glucosa en cabras en ayuno y posprandio, durante la época reproductiva y en transición al anestro ( $P=0.004$ ).

Gráfica 8. Concentración sérica de glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal, en ayuno y posprandio ( $P=0.095$ ).

Gráfica 9. Concentración sérica de ácidos grasos no esterificados en cabras con diferente índice de masa corporal, en ayuno y posprandio ( $P=0.094$ ).

Gráfica 10. Índice de masa corporal en cabras en estado de ayuno o posprandial durante la época reproductiva y de transición ( $P=0.002$ ).

Gráfica 11. Estimación del índice de masa corporal en cabras con baja (IMCB) y alta (IMCA) cantidad de reservas corporales de energía durante la época reproductiva y de transición ( $P<0.001$ ). IMCA= Índice de masa corporal alto.

Gráfica 12. Concentración plasmática de glucosa durante el ayuno de cabras ( $P=0.015$ )

Gráfica 13. Concentración sérica de glucagón en cabras durante el ayuno en la época reproductiva y en transición al anestro ( $P=0.004$ ).

Gráfica 14. Concentración sérica de ácidos grasos no esterificados durante el ayuno de cabras con diferente índice de masa corporal ( $P=0.080$ ).

Gráfica 15. Concentración plasmática de glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal durante la época reproductiva y en transición al anestro (estado de ayuno;  $P=0.001$ ).

Gráfica 16. Concentración sérica de urea en cabras con diferente índice de masa corporal durante la época reproductiva y de transición al anestro (estado de ayuno;  $P=0.072$ ).

Gráfica 17. Concentración circulante de glucosa ( $P=0.002$ ), urea ( $P=0.079$ ) y glucagón ( $P=0.005$ ), durante el estado posprandial de cabras.

Gráfica 18. Concentración sérica de ácidos grasos no esterificados durante el estado posprandial de cabras ( $P<0.001$ ).

Gráfica 19. Concentración sérica de insulina en cabras con diferente índice de masa corporal durante el posprandio ( $P=0.017$ ).

Gráfica 20. Relación Insulina:Glucagón en cabras con diferente índice de masa corporal durante el posprandio ( $P=0.060$ ).

Gráfica 21. Concentración sérica de insulina en cabras con diferente índice de masa corporal durante la época reproductiva y de transición al anestro ( $P=0.030$ ).

Gráfica 22. Relación Insulina:Glucagón en cabras con diferente índice de masa corporal durante la época reproductiva y en transición al anestro ( $P=0.008$ ).

Gráfica 23. Concentración sérica de glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal durante la época reproductiva y en transición al anestro ( $P=0.015$ ).

## INSULINA COMO REGULADOR DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA LUTENIZANTE

Gráfica 1. Concentración promedio de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época ( $P=0.004$ ).

Gráfica 2. Concentración basal de LH en cabras con diferente índice de masa corporal, durante la época reproductiva o de transición al anestro ( $P=0.005$ ).

Gráfica 3. Concentración plasmática de leptina en cabras con diferente índice de masa corporal y en época reproductiva o de transición al anestro ( $P=0.007$ ).

Gráfica 4. Concentración plasmática de leptina en cabras durante el periodo previo y posterior a la administración de insulina en época reproductiva o de transición ( $P=0.007$ ).

Gráfica 5. Concentración de leptina en cabras con diferente índice de masa corporal durante el periodo previo y posterior a la administración de insulina ( $P=0.063$ ).

Gráfica 6. Índice de masa corporal en cabras con diferente cantidad de reservas corporales de energía, durante la época reproductiva o de transición al anestro ( $P=0.004$ ).

Gráfica 7. Concentración de glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal y dosis de insulina, posterior a su administración (P=0.08).

Gráfica 8. Amplitud de pulsos de LH en cabras con diferente dosis administrada de insulina y en diferente época, posterior a la administración de insulina (P=0.33)

Gráfica 9. Concentración promedio de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época, posterior a la administración de insulina (P=0.006).

Gráfica 10. Concentración basal de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época, posterior a la administración de insulina (P=0.007).

## GLUCOSA COMO REGULADOR DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE

Gráfica 1. Frecuencia de pulsos de LH en cabras con diferente índice de masa corporal, durante el periodo previo y posterior a la administración de 2DG (P=0.087).

Gráfica 2. Frecuencia de pulsos de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y diferente época del año (P=0.034).

Gráfica 3. Concentración plasmática promedio de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.018).

Gráfica 4. Concentración basal de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.014).

Gráfica 5. Concentración plasmática de leptina en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P<0.001).

Gráfica 6. Concentración plasmática de insulina en cabras con diferente índice de masa corporal y diferente dosis de 2DG administrada (P=0.035).

Gráfica 7. Frecuencia de pulsos de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.065).

Gráfica 8. Amplitud de pulsos de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.097).

Gráfica 9. Concentración promedio de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.098).

Gráfica 10. Concentración basal de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.105).

Gráfica 11. Concentración plasmática de insulina en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.094).

## I. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales retos a resolver en el planeta es mantener y ampliar la capacidad de alimentar a una población que se encuentra en un ritmo constante de crecimiento. La población humana se duplicó en un lapso de 40 años (de 3 mil millones en 1959 a 6 mil millones en 1999) y se espera que para el año 2040 llegue a 9 mil millones (U.S. Census Bureau, 2009). Entre las diferentes fuentes de alimentación, existe la generada a través de la producción de carne de animales domésticos. En el caso de los caprinos, la producción es notablemente menor que la de otras especies tanto a nivel nacional como mundial. La FAO (2008) estima que la población mundial de cabras para el año 2007 fue de 850,219,925 cabezas. En América, México es el segundo productor de esta especie, sólo detrás de Brasil (8,900,000 vs 10,320,000 cabezas, respectivamente).

A pesar de su baja producción, la especie caprina se destina generalmente para alimentación de poblaciones humanas en zonas marginadas y por gente de escasos recursos económicos, que habitan lejos de los centros principales de distribución de alimentos, lo que representa para ellos una fuente disponible de leche y carne principalmente, además de un recurso del cual echar mano en momentos de apremio económico (Devendra, 2000; Majele-Sibanda *et al.*, 2000).

Un parámetro fundamental de la eficiencia en la producción de una especie es su capacidad de reproducirse y en este sentido la caprina tiene características particulares como la estacionalidad de su reproducción; en esta especie se ha observado una respuesta diferente a las señales nutricionales sobre aspectos reproductivos, dependiendo de la etapa de la estación de reproducción en que se encuentra. Mientras que en plena época reproductiva la cabra parece no responder a claves nutricionales, derivadas del consumo de alimento o de la cantidad de reservas corporales de energía, durante las etapas de transición estas señales pueden afectar la secreción de LH (Estrada *et al.*, 2005b; Mani *et al.*, 1996). Esto hace que esta especie pueda servir como modelo para estudiar y contrastar la relación entre señales nutricionales y las características de secreción de LH en diferentes etapas de la época reproductiva.

Algunos factores adicionales a la nutrición, como la cantidad de reservas corporales de energía, pueden modificar las respuestas en la secreción de LH. Un ayuno de 3 días provocó una disminución en la secreción de esta hormona, sólo en cabras con menor cantidad de reservas de energía (Tanaka *et al.*, 2002).

Por otro lado, aunque está ampliamente demostrado el efecto que tiene la nutrición sobre aspectos reproductivos, como la presentación de la pubertad, el reinicio de la actividad ovárica posparto y la presentación del anestro (Perry *et al.*, 1991; Schillo, 1992), la mayor parte de estos estudios en rumiantes se ha realizado en bovinos y ovinos y en mucho menor grado en la especie caprina, la cual tiene atributos únicos entre los rumiantes domésticos (Devendra, 2000). Es un hecho aceptado en lo general, que el principal efecto de la nutrición sobre la reproducción, es regulando la frecuencia de la secreción de GnRH-LH (Schillo, 1992), aunque el mecanismo por el cual se da esta regulación no ha sido aclarado. Se ha sugerido que algunos señalizadores para el sistema nervioso central que regula la secreción de GnRH-LH son insulina, leptina, glucosa y algunos aminoácidos. Aunque insulina puede deprimir la frecuencia pulsátil de LH, este efecto podría estar asociado a la hipoglicemia resultante y no por un efecto directo de insulina. Adicionalmente, la disponibilidad de glucosa a nivel central también puede regular esta secreción de LH y se ha sugerido que la leptina (como un indicador de la cantidad de reservas corporales de energía), podría actuar como modulador de señales asociadas a la disponibilidad de glucosa y sus efectos sobre la reproducción (Schneider *et al.*, 2000).

Por lo anterior, este trabajo analizó la relación existente entre señales del metabolismo energético dinámico (asociadas a la alimentación) y estático (asociadas al índice de masa corporal), sobre la secreción de la hormona luteinizante en cabras y su modulación de acuerdo a la etapa del ciclo reproductivo anual.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Estacionalidad reproductiva de cabras

Una de las características más importantes dentro de la reproducción de algunas especies es la estacionalidad. El fotoperiodo, a diferencia de otras señales medioambientales como la época de lluvias, es un factor que manifiesta un cambio mínimo año con año, por lo que a través de la evolución, especies como la ovina y caprina lo han tomado como referencia clave para iniciar o terminar su actividad reproductiva anual. Al igual que las ovejas, las cabras inician su periodo estacional de reproducción, cuando las horas luz comienzan a descender y se prolonga hasta que se comienza a dar un aumento en esta cantidad de horas; por esta razón, se les conoce como especies con reproducción de días cortos. La respuesta al cambio del fotoperiodo requiere de hasta 90 días y depende de la historia fotoperiódica del animal. En cabras criollas, la actividad ovárica inició tres meses después del inicio en el descenso del fotoperiodo (Escobar, 2001).

La duración de la época reproductiva en la especie caprina puede ser muy variable. En cabras criollas la actividad reproductiva inició en los meses de junio-julio y disminuyó durante enero-febrero, sin mostrar un anestro profundo (marzo-mayo); sin embargo, cabras Granadina tuvieron un anestro más prolongado y profundo (Valencia *et al.*, 1988). Resultados similares se observaron en cabras criollas en San Luis Potosí, México (Urrutia *et al.*, 2008). Además de la raza, otros factores adicionales al fotoperiodo, como la disponibilidad de alimento (Molokwu y Oliveira, 1981) y la presencia del macho (Delgadillo *et al.*, 2004; Rivas-Muñoz *et al.*, 2007; Urrutia *et al.*, 2008) están involucrados en la duración de la épocas de anestro-reproducción. Cabras que recibieron el 100% de sus requerimientos nutricionales tuvieron un menor periodo anovulatorio, en comparación a aquellas que recibieron una alimentación alterna de 100 (11 d) y 60% (10 d) de sus requerimientos (Estrada *et al.*, 2009). Por otro lado, la exposición de hembras en anestro a machos sexualmente activos (mediante fotoperiodo y/o implantes de melatonina) provocó una mayor presentación de hembras en estro, en



comparación a aquellas que fueron expuestas a machos sexualmente inactivos (Delgadillo *et al.*, 2006; Veliz *et al.*, 2002)

La manera en que el fotoperiodo afecta la reproducción, implica una modificación en el patrón de secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y en consecuencia de la hormona luteinizante (LH). De este modo, la frecuencia de pulsos de LH aumenta durante la época reproductiva y disminuye durante el anestro. La vía de comunicación de las condiciones del fotoperiodo, para alterar la secreción de GnRH-LH, inicia con la recepción de la luz a nivel de fotorreceptores ubicados en la retina, posteriormente la señal viaja a través de un tracto nervioso hasta el núcleo supraquiasmático (NSQ), el principal reloj endógeno. La señal llega al núcleo paraventricular y de ahí al ganglio cervical posterior (este comunica con el resto del organismo, ya que forma parte del sistema nervioso simpático) de donde parte la inervación a la glándula pineal. Aquí, la señal neuronal es transferida a una señal hormonal, la melatonina (Malpoux *et al.*, 1997). Aunque hay gran afinidad para la melatonina en el *pars tuberalis* de la adenohipófisis, se piensa que el hipotálamo mediobasal es el blanco por el que esta hormona ejerce sus efectos. Es probable que la melatonina llegue a través del tercer ventrículo al hipotálamo, provocando cambios en el patrón de secreción de LH. La acción de melatonina es modulada a su vez por medio de interneuronas; el núcleo dopaminérgico A15 y terminales dopaminérgicas de la eminencia media son parte de algunos de estos elementos involucrados (Malpoux *et al.*, 1996).

La melatonina se forma a partir del aminoácido triptófano; este aminoácido formará un compuesto llamado 5-hidroxitriptamina que posteriormente forma la serotonina. Esta, con ayuda de la enzima N-acetiltransferasa (la enzima limitante de la formación de melatonina), genera N-acetilserotonina, la cual finalmente dará origen a la hormona. Esta llegará a la circulación periférica mediante la vena de Galieno que drena la glándula pineal y su secreción se eleva drásticamente durante la noche (50-150 pg/ml en plasma de caprinos; Malpoux *et al.*, 1997; Malpoux *et al.*, 2001).

## **2.2 Efectos de la nutrición sobre la reproducción de cabras**

La nutrición puede tener efectos sobre diversos aspectos reproductivos como la pubertad, el reinicio de la actividad ovárica, el desarrollo folicular, la concentración circulante de hormonas y la duración del ciclo estral y presentación del estro

### *2.2.1 Reinicio de la actividad ovárica*

Un aspecto de gran interés en los sistemas de producción pecuarios es lograr que los periodos de inactividad ovárica posterior al parto sean lo más cortos posibles; esto permite reducir costos de mantenimiento derivados de un animal con mayores intervalos entre partos. De la misma manera, se intenta que los periodos de reproducción sean lo más largos posible, para permitir que el máximo de las hembras pueda ser apareadas y quedar gestantes. La duración de la estacionalidad reproductiva de la especie caprina podría ser modulada por la nutrición; hembras de la raza Payoya alimentadas con 1.5 veces sus requerimientos para mantenimiento retrasan en 25 días el término de su actividad reproductiva y adelantan su reinicio en 12 días, comparado con animales a los que se les suministró el 100% de sus requerimientos de mantenimiento (Zarazaga *et al.*, 2005). De la misma manera, cabras restringidas alternadamente en un 40% de sus requerimientos de mantenimiento (10 días de restricción-11 sin restricción, de manera continua) finalizaron su actividad ovulatoria de manera más temprana que aquellas que no fueron restringidas (Estrada, 2007).

A pesar de que el anterior estudio muestra el efecto positivo de una mejor nutrición sobre el reinicio de la actividad ovárica, en cabras con un consumo alto en energía durante el posparto (120% de sus requerimientos) no existió diferencia en el tiempo transcurrido a la primera ovulación posparto, comparado con animales que consumieron 80% de sus requerimientos (López *et al.*, 2002). Esto pudo deberse a que la restricción no fue tan severa como para afectar dichas variables en una especie que tiene gran capacidad para adaptarse a condiciones adversas para su mantenimiento y que en algunas regiones implica mantener un índice de masa corporal bajo y bajos requerimientos metabólicos para minimizar

sus requerimientos de mantenimiento y de agua. Esto le permite sobrevivir largos periodos de disponibilidad de alimento muy limitada, aprovechando al máximo los nutrientes y teniendo al rumen como almacén de agua hasta que se normalicen las condiciones de consumo de alimento (Silanikove, 2000).

### 2.2.2 Desarrollo folicular

Un adecuado desarrollo folicular ovárico favorecerá los eventos que llevan a la ovulación. Se han reportado efectos favorables asociados a un mayor consumo de energía sobre el desarrollo folicular en bovinos (Perry *et al.*, 1991), pero los pocos estudios realizados en caprinos muestran efectos diversos. En hembras mantenidas durante 9 semanas con un consumo del 54% de sus requerimientos nutricionales, el número de folículos primordiales fue mayor y hubo un menor diámetro de estos y de los primarios, comparado con aquellas que tuvieron un consumo del 209% de los requerimientos. No existió efecto sobre el número de folículos primarios en crecimiento, el número de células de la granulosa en los diferentes folículos y el tamaño folicular y del ovocito de los folículos de la etapas preantrales a las etapas antrales tempranas, lo que podría sugerir que el déficit energético no afecta el desarrollo final de los folículos primarios (Rondina *et al.*, 2005).

Cabras recibiendo 80 ó 120% de energía en la dieta, no mostraron diferencia en el tiempo requerido en el posparto para observar el primer folículo de 3 y de 5 mm o en el diámetro del folículo más grande previo a la ovulación (López *et al.*, 2002). Sin embargo, bajo los mismos niveles de consumo, el número de folículos totales y de 3-4 mm aumentaron con el nivel alto de energía durante los ciclos estrales iniciales posparto de cabras criollas, aunque no se observaron efectos sobre folículos de mayor tamaño (Espinosa *et al.*, 2003). Esto también podría sugerir que una restricción energética tiene un mayor efecto sobre el número de folículos de menor tamaño. Cabras que consumieron sólo el 25% de sus requerimientos de mantenimiento, tuvieron un menor número de folículos antrales, comparado con las que cubrieron sus requerimientos. Ya que en este estudio no se observaron diferencias en la secreción de gonadotropinas asociados

a los efectos sobre el desarrollo folicular, es probable que otros factores pudieran estar involucrados (Mani *et al.*, 1996).

### 2.2.3 Concentración de hormonas en la circulación

Una adecuada concentración de progesterona es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la gestación en cabras (Mani *et al.*, 1995). Al parecer la concentración plasmática de esta hormona es poco afectada por el nivel de nutrición, aunque en bovinos se ha descrito que los desórdenes lipídicos alteran la producción de progesterona y los índices de fertilidad (Galvis y Correa, 2002). Cabras criollas mantenidas con niveles de energía de 80 y 120% en la dieta, no mostraron diferencias sobre diversas variables asociadas a la concentración de progesterona de los ciclos estrales iniciales posparto (Espinosa *et al.*, 2003). Una restricción más severa en cabras Shiba, (30% del requerimiento), tampoco afectó esta hormona comparado con los animales consumiendo el 100% de los requerimientos (Tanaka *et al.*, 2004). En cabras suplementadas con raciones basadas en residuos de cosecha en el periodo de secas, no se afectó la concentración de progesterona desde el último tercio de la gestación hasta el día 15 posparto (Malau-Aduli *et al.*, 2004), comparado con animales no suplementados. Tampoco se han observado efectos sobre la concentración de progesterona de fases lúteas durante la transición al anestro en cabras con diferente índice de masa corporal, restricción nutricional o por su interacción (Estrada *et al.*, 2005b).

Es probable que restricciones de alimento más severas como un ayuno, podrían afectar de manera evidente la concentración de progesterona, sólo cuando disminuyen las reservas energéticas del animal. Cabras Ardi que fueron ayunadas en dos ocasiones por 4 días, iniciando en el día 10 de dos ciclos estrales sucesivos, mostraron una disminución en progesterona, pero sólo hasta el segundo ciclo estral, similar a la disminución observada en leptina, por lo que esta última hormona podría tener algún papel en el funcionamiento del cuerpo lúteo (Al-Azraqi, 2007).

Por otro lado, cabras Sannen y Toggenburg alimentadas con 100 ó 25% de sus requerimientos de energía y proteína para mantenimiento durante el ciclo estral no mostraron diferencias en la concentración plasmática de progesterona en los días 1 a 10 posterior al estro. Sin embargo, a media gestación la concentración fue ligeramente más alta en las cabras restringidas vs las cabras con una alimentación adecuada (Mani *et al.*, 1995). Se ha sugerido en otras especies que una menor concentración circulante de progesterona se debe a un metabolismo elevado (existente en animales en mejor condición nutricional), lo cual provoca una pronta eliminación de esta hormona (Kiyama *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2003; Wiltbank *et al.*, 2000), por lo que es muy probable que esto también aplique para la especie caprina. Sin embargo, el efecto del nivel de nutrición sobre el metabolismo de progesterona aún no ha sido estudiado en esta especie.

La nutrición también puede afectar la secreción de GnRH-LH. La maduración de los folículos ováricos requiere de un aumento en la secreción pulsátil de estas hormonas y existe consenso en que una mala nutrición o el ayuno, disminuyen la frecuencia pulsátil de LH; un solo día de ayuno en primates y roedores puede reducir la secreción pulsátil de LH (Brecchia *et al.*, 2006). En rumiantes, en un estudio realizado con cabras Shiba ovariectomizadas (OVX) implantadas con estrógenos ( $E_2$ ), Matsuyama *et al.* (2004) observaron que los intervalos de las descargas de la actividad múltiple en el hipotálamo (MUA), un indicador de las manifestaciones electrofisiológicas de la actividad del generador de pulsos de GnRH hipotalámico), aumentaron de manera progresiva de manera conjunta al progreso de un periodo de ayuno de 4 días.

Un consumo de sólo 30% de los requerimientos de energía durante 4 semanas, disminuyó la frecuencia pulsátil de LH en cabras, la cual se correlacionó con el índice de masa corporal ( $r= 0.81$ ) (Tanaka *et al.*, 2002). Del mismo modo, este nivel similar de consumo desde 32 días antes de la aplicación de un dispositivo intravaginal impregnado con progesterona (CIDR-G), provocó una menor frecuencia pulsátil de LH a las 32-40 h después de retirado el dispositivo, comparado con los animales que cubrieron sus requerimientos (Tanaka *et al.*,

2004). Un estudio adicional, que utilizó un nivel de consumo ligeramente menor (25% durante un ciclo estral), provocó que un menor número de cabras Saanen y Toggenburg en restricción mostraran una oleada preovulatoria de gonadotropinas y una magnitud reducida de esta oleada, aunque sin mostrar efecto sobre el nivel basal de LH, comparado con animales con un consumo del 100% de sus requerimientos. Estos resultados podrían deberse a que la restricción provocó una reducción en las reservas de gonadotropinas en la hipófisis o una reducción en la sensibilidad de ésta a la GnRH (Mani *et al.*, 1996).

El mecanismo por el que la desnutrición o ayuno disminuye la secreción pulsátil de GnRH-LH no está comprendido completamente, aunque una parte del sistema parece estar relacionado con la disponibilidad de glucosa en el sistema nervioso central (Ohkura *et al.*, 2000); esta información que se origina del estado de desnutrición o de un menor contenido de reservas de energía, quizá con leptina como su principal indicador, sería llevada finalmente a la cascada neuroendocrina que regula la liberación pulsátil de GnRH (Matsuyama *et al.*, 2004).

Prácticamente no existen reportes de los efectos asociados a la nutrición sobre la secreción de FSH. Espinosa *et al.* (2003), no observaron efectos sobre diversas variables de esta hormona durante los ciclos estrales iniciales posparto de cabras, empleando niveles de energía en la dieta de 80 y 120% de los requerimientos de mantenimiento. De la misma manera, Mani *et al.* (1996) no reportan diferencias en las concentraciones basales de FSH en cabras con un consumo del 25 y del 100% de los requerimientos. Lo anterior refleja la poca influencia que tiene la nutrición sobre las concentraciones circulantes de FSH. Para el caso de bovinos, los resultados de los efectos de la subnutrición sobre la secreción de esta hormona tampoco han sido consistentes (Galvis y Correa, 2002). Aunque carneros con mayor cantidad de reservas de energía mostraron una mayor concentración de FSH, no se observó un efecto de la cantidad (baja o alta) de nutrientes sobre esta hormona. Adicionalmente un ayuno de 5 días en estos carneros no provocó cambios en la concentración de FSH (Celi *et al.*, 2006).

El ayuno por periodos de 4 días, durante dos ciclos estrales consecutivos también ha provocado reducción en la concentración plasmática de testosterona en cabras (Al-Azraqi, 2007). En carneros, una mayor cantidad de reservas de energía se asoció con una mayor concentración de testosterona, aunque no se observó efecto debido a la cantidad de nutrientes suministrada por la dieta (bajo vs alto). Aunque un ayuno de 5 días provocó una disminución de testosterona en animales infundidos con líquido cefaloraquídeo, esto no ocurrió con aquellos infundidos con leptina por lo que esta hormona podría proteger la producción de testosterona de una disminución provocada por un desafío nutricional (Celi *et al.*, 2006).

#### *2.2.4 Duración del ciclo estral y presentación de estro*

Algunos otros efectos asociados a la nutrición (restricción crónica), han sido reportados sobre la presentación del estro y la duración del ciclo estral. La restricción del suministro de alimento en un 70% (aproximadamente 50 d) de los requerimientos de mantenimiento en cabras, evitó que los animales mostraran comportamiento estral, ovulación y una elevación subsecuente de progesterona, después de 12 días de retirar un dispositivo liberador de progesterona (CIDR-G; Tanaka *et al.*, 2004). Un consumo del 54% de los requerimientos durante nueve semanas, provocó que un menor número de cabras mostraran estro y ovulación, además de una mayor frecuencia de ciclos estrales irregulares (Rondina *et al.*, 2005). Finalmente, el uso de dietas de mantenimiento o supramantenimiento (un máximo de 700g de concentrado/animal/día), no afectó la presentación de estros o la duración de los ciclos estrales en cabras. Sólo la dieta de supramantenimiento favoreció la tasa de ovulación después del sexto estro luego de iniciado el tratamiento (Henniawati y Fletcher, 1986).

Por otro lado, cabras Payoya consumiendo 1.5 veces los requerimientos de mantenimiento mostraron una mayor proporción de ciclos estrales largos vs animales que consumieron el 100% de sus requerimientos (Zarazaga *et al.*, 2005). Adicionalmente, cabras alimentadas con 2.09 ó 0.54 veces los requerimientos de

mantenimiento mostraron diferencias en el porcentaje de ciclos irregulares (56 y 75%, para consumo de 2.09 y 0.54, respectivamente)(Rondina *et al.*, 2005).

Un bajo nivel de consumo de energía durante más de 60 días en cabras Mashona, provocó que un menor porcentaje de ellas exhibieran estro después de un esquema de sincronización con cloprostenol, comparado con aquellas alimentadas con niveles de energía medio y alto (Kusina *et al.*, 2001). Además, el porcentaje de cabras ciclando normalmente antes de la primera inyección de cloprostenol fue menor (40%) en cabras con bajo consumo de energía vs cabras con consumos medio y alto (100 y 93%, respectivamente). Otros resultados adversos similares en cabras restringidas sobre la presentación del estro y ovulación han sido reportados (Mani *et al.*, 1996).

Los resultados descritos muestran con claridad los efectos que una restricción prolongada puede tener sobre la presentación del estro y los ciclos estrales; sin embargo, no se observan efectos favorables con dietas por arriba de los requerimientos nutricionales, lo que también se ha sugerido en otros estudios (Kusina *et al.*, 2001).

### **2.3 Efectos de la condición energética sobre la reproducción de cabras**

La condición corporal de un animal indica su cantidad de reservas energéticas almacenadas. De manera similar, se ha empleado el índice de masa corporal (IMC) en la especie caprina como una medición del estado energético de estos animales (Estrada *et al.*, 2005a; Estrada *et al.*, 2005b; Tanaka *et al.*, 2002). Se ha descrito que una baja condición provoca una excesiva movilización de tejidos, afectando la concentración circulante de metabolitos que afectan el balance hormonal (Galvis y Correa, 2002), lo que provoca alteraciones en el desempeño reproductivo. Una baja condición corporal puede afectar la presentación del estro; el estro se presentó primero en cabras lactantes expuestas a machos, pero sólo en aquellas con una buena condición corporal (calificación 7, en escala de 1 a 9) vs con una condición pobre (calificación de 2), lo que pudo



deberse a un lento aumento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH, resultado de un menor almacenamiento de grasa corporal (Mellado *et al.*, 1994).

La cantidad de reservas energéticas también podría influenciar el desarrollo folicular. En cabras con un índice de masa corporal bajo, hubo una tendencia a disminuir el número de folículos antrales durante el periodo de transición al anestro, comparado con animales con un índice de masa corporal alto (8.2 vs 10.9 folículos, respectivamente), observándose además una disminución del tamaño del folículo mayor (Estrada *et al.*, 2005a).

En el caso de la especie caprina, la disminución en la secreción de LH por una restricción en el consumo a corto plazo parece depender de la disponibilidad de reservas energéticas y/o condición corporal del animal (Tanaka *et al.*, 2002). Estos autores, utilizando cabras Shiba OVX suplementadas con estradiol, reportaron que la frecuencia pulsátil de LH disminuía sólo en animales catalogados como ligeros (peso <24 kg), lo cual no ocurrió con las cabras pesadas (peso  $\geq$ 24 kg) durante el segundo y tercer día de un periodo de ayuno de 72 horas, comparado con el periodo de alimentación. De esta manera, al parecer las reservas energéticas en el tejido graso podrían ser insuficientes en animales ligeros, para mantener la actividad del generador de pulsos de GnRH. La hormona leptina, secretada por el tejido adiposo podría estar involucrada en la señalización de este estado energético al sistema regulador de la secreción de GnRH.

Se ha reportado que se requiere una cierta pérdida de peso para que exista una disminución en la secreción pulsátil de LH. En cabras con ayuno de 4 días, las cuales aumentaron el intervalo de descargas MUA, la pérdida de peso al final de este periodo fue de 12% (Matsuyama *et al.*, 2004). Sin embargo, pérdidas de peso de 12% no fueron suficientes para evitar completamente que cabras Mashona pudieran aparearse y llevar a término su gestación, por lo que usaron eficientemente reservas energéticas para ovular y concebir de manera exitosa (Kusina *et al.*, 2001). Es probable que la condición corporal inicial haya afectado los resultados; por otro lado, quizá algunos aspectos reproductivos o algunas razas de cabras sean más sensibles que otros a la pérdida de peso corporal.

En otro estudio con cabras bajo restricción nutricional (30% de los requerimientos), se observaron pérdidas de peso corporal de hasta 25% en un periodo de 40-42 días y disminuciones en la secreción pulsátil de LH, después de este periodo de tiempo (Tanaka *et al.*, 2004). Estos últimos autores han reportado que quizá un peso corporal menor a 24 kg y un índice de masa corporal de 7.5 serían niveles umbral que determinan si la privación aguda de la suplementación energética puede afectar la secreción pulsátil de LH. Sin embargo, esto tendrá que ser aún probado en animales de otras razas y bajo diferentes condiciones experimentales.

## **2.4 Hormonas y metabolitos asociados a la movilización de energía**

### **2.4.1 Leptina**

La leptina, del griego “leptos” (delgado), es un péptido formado por 167 aminoácidos y un puente disulfuro, que puede actuar directamente sobre algunos tipos celulares como las células beta del páncreas, las intestinales y las inmunológicas (Block *et al.*, 2003). Está involucrada en múltiples aspectos fisiológicos como el metabolismo energético, la reproducción, la angiogénesis, la hematopoyesis, la formación ósea, la respuesta inmune y la diabetes (Brann *et al.*, 2002; Zieba *et al.*, 2005); su síntesis es regulada por el gen *ob*, que al igual que la leptina misma, está altamente conservado entre especies (Sánchez, 2005). La presencia de este gen se ha reportado en el tejido adiposo, músculo esquelético, cartílago fetal, hipófisis y tejido mamario y se ha descrito la producción de la hormona principalmente en tejido adiposo blanco, ovario, estómago y trofoblasto (Brann *et al.*, 2002; Zieba *et al.*, 2005).

La leptina cuya vida media circulante es de 30 minutos, se secreta a la corriente sanguínea, después de segmentar el péptido señal de 21 aminoácidos y en la circulación se encuentra en forma libre o como complejo con proteínas de unión, lo que parece ser específico de especie (esto se ha sugerido para humano y ratón) y dependiente del estado fisiológico (García *et al.*, 2002; Houseknecht *et al.*, 1996). Por otro lado, el receptor de leptina (OB-R) es miembro de la familia de

receptores de citocina clase I, debido a su homología estructural con los receptores de interleucina IL-6 y a las vías de señalización. La forma larga del receptor (OB-Rb), responsable de la señalización celular, tiene un dominio citoplasmático de 302 aminoácidos que contiene sitios de acoplamiento para proteínas importantes en la transducción de señal. Otras diferentes isoformas del receptor se derivan de un empalme alternativo del RNAm y todas tienen dominios extracelulares de unión a ligandos similares, pero difieren en la porción carboxilo terminal del dominio intracelular. Las isoformas cortas contienen 30-40 aminoácidos y los dominios intracelulares no cuentan con los sitios del receptor largo por lo que muestran una débil capacidad de transducción de señal, aunque podrían participar en la endocitosis y el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica (Barb y Kraeling, 2004; Brann *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2008; Zieba *et al.*, 2005).

El receptor de leptina tiene un segmento transmembranal simple y se dimeriza cuando el ligando se une a sus dominios extracelulares. Ambos monómeros del receptor dimérico se fosforilan sobre el residuo de tirosina del dominio intracelular por una cinasa Janus (JAK). Los residuos de fosfotirosina se vuelven sitios de acoplamiento para tres proteínas que son los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs 3, 5 y 6, algunas ocasiones llamados STAT-grasos). Los STATs acoplados son entonces fosforilados sobre residuos de tirosina por la misma cinasa Janus. Después de la fosforilación por la JAK, los STATs se mueven al núcleo donde se unen a secuencias específicas de DNA y estimulan la expresión de algunos genes como el de propiomelanocortina (PMOC) y el de neuropéptido Y (NPY; Brann *et al.*, 2002; Zieba *et al.*, 2005).

Existen receptores de leptina en el plexo coroides, leptomeninges, médula oblonga, hipotálamo (núcleos arcuato, ventromedial, paraventricular en rata y humano, núcleo dorsomedial, área hipotalámica lateral y el núcleo premamilar ventral), adenohipófisis, células epiteliales de la glándula mamaria, ovario (células de la granulosa y la teca en bovino), útero, placenta, testículo y estómago. Se piensa que el receptor localizado en el plexo y las leptomeninges participa en el

transporte a través de la barrera hematoencefálica. En el hipotálamo la variante OB-Rb es la isoforma predominante (Brann *et al.*, 2002; Roberson *et al.*, 2008; Zieba *et al.*, 2005); existen dos poblaciones de neuronas que expresan OB-Rb, una de ellas sintetiza el péptido relacionado a Agouti (AgRP) y NPY, mientras que la otra sintetiza POMC. La leptina activa/despolariza las neuronas Ob-Rb/POMC y aumenta la síntesis de esta última lo que disminuye el apetito y aumenta el gasto energético al activar receptores de melanocortina en el Sistema Nervioso Central (SNC). Por otro lado, leptina inhibe las neuronas NPY/AgRP y suprime la expresión de estos neuropéptidos orexigénicos. Sin embargo, estos neuropéptidos probablemente no medien la mayoría de las señales anorexigénicas provocadas por leptina (Robertson *et al.*, 2008).

Para la regulación de la saciedad intervienen núcleos hipotalámicos: el núcleo arcuato y el ventromedial, cuya lesión promueve la hiperfagia. Leptina puede activar neuronas Ob-Rb que coexpresan el factor de transcripción SF-1, que participan en la saciedad mediada por leptina. También la médula oblonga (núcleo del tracto solitario) participa en la regulación de la saciedad; leptina podría actuar sinérgicamente con los péptidos intestinales GLP-1 y colecistocinina regulando neuronas del núcleo del tracto solitario, contribuyendo así a la regulación de la saciedad (Robertson *et al.*, 2008).

Los estrógenos pueden ser uno de los reguladores del receptor de leptina y de la hormona misma; se han observado receptores- $\alpha$  de estrógenos ( $E_2$ ) en neuronas que tienen receptores de leptina en el hipotálamo de la rata hembra. En la rata ovariectomizada, el  $\beta$ -estradiol disminuyó la expresión del gen OB-Rb en el núcleo arcuato y ventromedial (Brann *et al.*, 2002). El tejido adiposo de mujer produce más leptina *in vitro* que el del hombre y los andrógenos inhiben la liberación de insulina *in vitro*, mientras que el estradiol 17- $\beta$ , la estimula (Kulcsár *et al.*, 2005). Adicionalmente, la concentración de leptina es mayor en mujeres que en hombres independientemente del índice de masa corporal; cuando se normalizaron los datos y se analizaron como el porcentaje de variabilidad en relación a la concentración promedio en 24 horas, no existieron diferencia entre

géneros. Los datos mostraron una pulsatilidad similar para leptina en ambos sexos aunque la amplitud de pulsos en las mujeres es dos veces mayor que la observada en hombres. Es probable que la mujer sea más resistente a los efectos de leptina, secretando mayor cantidad de esta hormona durante los pulsos, lo que mantiene el peso corporal normal. Ya que las mujeres son más propensas a desórdenes relacionados a la alimentación, como anorexia nerviosa y bulimia nerviosa entre otros, su mayor susceptibilidad estaría relacionada a esta resistencia a leptina (Licinio *et al.*, 1998).

Ya que leptina se sintetiza principalmente en el tejido adiposo, su concentración circulante refleja la cantidad de triglicéridos almacenados por lo que puede servir como una señal circulante del estado nutricional o un “adipostato”, sugiriendo que puede funcionar como un eslabón importante entre el estado metabólico y el eje neuroendocrino (Barb y Kraeling, 2004; Brann *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2008). De esta manera, la leptina circulante puede suprimir el consumo de alimento y permitir el gasto energético. La concentración circulante de esta hormona se correlaciona en diversas especies con el índice de masa corporal (humanos; Wagner *et al.*, 2000); el peso corporal en roedores (Ahrén, 2000; Kalsbeek *et al.*, 2001) y ovejas; el espesor de grasa subcutánea (a la altura de la última costilla) en ovejas alimentadas y ayunadas ( $r= 0.73$  y  $0.89$ , respectivamente; Daniel *et al.*, 2002); la grasa corporal (lípidos como % del peso corporal) y con la condición corporal en la misma especie (Delavaud *et al.*, 2000). Finalmente, cabras criollas con una mayor condición corporal tienen mayor concentración de leptina que aquellas con una condición corporal pobre (Gámez *et al.*, 2008).

Un ayuno prolongado podría disminuir la concentración de leptina y afectar la reproducción. Esto puede ser un mecanismo de sobrevivencia que se observa más rápido en monogástricos que en rumiantes (Zieba *et al.*, 2005). El ayuno o la restricción de alimento disminuye la concentración de leptina en humanos (Havel *et al.*, 1996), perros (Ishioka *et al.*, 2005), ratones (Ahrén, 2000), ovejas (Daniel *et al.*, 2002) y conejos; en esta última especie la disminución en la concentración fue

mayor con un ayuno más prolongado, quizá debido a un aumento conjunto con corticosterona (Brecchia *et al.*, 2006). La concentración de leptina es mayor en ovejas alimentadas vs ayunadas por 48 h y mayor en animales gordos (espesor de grasa en la última costilla >1 cm) vs delgados (espesor de grasa <1 cm) (Daniel *et al.*, 2002). En humanos la caída en la concentración de leptina por un ayuno de 36 h es de 4.6 veces (15.3 vs 3.4 µg/l) (Bergendhal *et al.*, 2000).

La reducción en la concentración de leptina durante el ayuno, puede ser más severa en ratones hembras que en machos (Ahrén, 2000). También se ha reportado un descenso en la concentración de leptina de un 30% dentro de las primeras 16 h de un ayuno de 78 h, en borregos Suffolk castrados e implantados con estradiol, en comparación con la concentración observada antes de iniciar el ayuno (Nagatani *et al.*, 2000).

Durante el ayuno, también disminuyen las concentraciones de IGF-I e insulina en rumiantes y otras especies (Zieba *et al.*, 2005; Brecchia *et al.*, 2006). Sin embargo, aunque la leptina no parece tener efecto sobre IGF-I, las infusiones intracerebroventriculares (icv) y periféricas de esta hormona aumentan la insulina circulante en una manera dosis-dependiente. Esta regulación de la leptina sobre la insulina puede ser directa. En cabras al parecer un aumento en las concentraciones de leptina, y un balance energético positivo, actúan como señales que normalizan la secreción de insulina después de un ayuno (Zieba *et al.*, 2005).

Por otro lado, la respuesta en la concentración de leptina al ayuno podría ser influenciada por la cantidad de grasa corporal. Mientras que en humanos y roedores se observa un mayor descenso de leptina en individuos magros vs obesos, la respuesta en rumiantes es inconsistente. Daniel *et al.* (2002), observaron que la correlación entre la concentración de leptina y la cantidad de grasa corporal fue mayor en ovejas ayunadas que en las ovejas alimentadas *ad libitum*. Las ovejas magras tuvieron 69% menos leptina después de un ayuno de 48 horas que las ovejas magras con un consumo *ad libitum*, mientras que la diferencia entre ovejas obesas alimentadas y ayunadas fue de sólo 52%. Adicionalmente, corderos que fueron ayunados por 24 horas redujeron la

concentración de leptina (un 35% en promedio); sin embargo, la concentración por kg de grasa corporal después del ayuno fue menor en los corderos obesos vs magros. El descenso fue mayor en el grupo de corderos con mayor cantidad de grasa (>18.5% de grasa), que los grupos con media (16-18.5%) o baja (<16%) cantidad de grasa, lo que indica que los animales obesos alimentados son más afectados como resultado de su mayor cantidad de grasa. Por otro lado, existe una relación entre el tejido graso y leptina, el cual puede estar diferenciado en algunas especies con algunos depósitos en particular. La concentración se relacionó más estrechamente con la fracción de grasa visceral comparado con la subcutánea e intermuscular a pesar de ser sólo el 26% de la grasa corporal total, lo que sugiere una mayor expresión de leptina en la grasa visceral. Ya que la concentración de leptina no fue concomitante con el aumento en masa grasa, esto sugiere que la grasa no es el único factor que regula la concentración de leptina, por lo que algunos factores adicionales podrían estar involucrados (Altmann *et al.*, 2006). Sin embargo, en humanos, la fracción de grasa que más influye en la secreción de leptina podría ser diferente a lo visto en los corderos, ya que en mujeres, la grasa subcutánea mostró una alta correlación con la concentración de leptina ( $r= 0.85$ ), lo que no ocurrió con la grasa visceral (Langendonk *et al.*, 1998).

En cabras ayunadas por dos periodos de 4 días, iniciando al día 10 de dos ciclos estrales consecutivos, existió una disminución en la concentración de leptina, la cual fue evidente hasta el segundo ciclo, por lo que la intensidad del ayuno puede ser un factor a tener en cuenta cuando se trabaja con esta hormona (Al-Azraqi, 2007).

En ratas bajo cuatro diferentes tratamientos, a) control no operados, b) con lesión del NSQ, c) adrenalectomizados y proveídos de pellets sc con corticosterona y d) en un esquema normal de alimentación, mostraron sólo una débil correlación ( $r= 0.37$ ) entre la concentración de leptina y el peso corporal cuando se combinaron los valores de los 4 tratamientos. Sin embargo, no existió esta correlación cuando se analizaron los grupos por separado, lo cual puede

sugerir que no bajo todas las condiciones existe correlación entre estas dos variables (Kalsbeek *et al.*, 2001).

El ayuno modifica la expresión de receptores para leptina, provoca un aumento en los niveles de expresión de OB-Rb en el núcleo arcuato, aunque sin mostrar diferencia en el caso del hipotálamo ventromedial. Además, en las ovejas ayunadas, la expresión de genes en el núcleo arcuato fue mayor para el NPY y el AgRP, y existió una tendencia a disminuir en el transcrito regulado por cocaína-anfetamina (CART), mientras que para proopiomelanocortina (POMC) no existió diferencia, comparado con animales alimentados normalmente. Ya que la mayor parte de los cambios en la expresión de genes se da a nivel del núcleo arcuato (ARC), es probable que indique su papel clave en la mediación de las respuestas a una retroalimentación periférica. Muchas de las neuronas sensibles a leptina en el núcleo arcuato proyectan terminaciones aferentes al núcleo paraventricular (PVN), por lo que una función del ARC sería el llevar información nutricional al sitio integrador (PVN) para la retroalimentación de regulación del balance energético. Es probable que leptina sea una señal importante para las neuronas del ARC, que media las respuestas al ayuno y esto podría funcionar de manera similar en diferentes especies (Adam *et al.*, 2002).

#### 2.4.2 Insulina

La insulina es una hormona proteica producida en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas y es el principal regulador del metabolismo de la glucosa. Está formada por dos cadenas de péptidos, de 21 aminoácidos y 30 aminoácidos, respectivamente, unidas por dos puentes disulfuro. Existe además un puente intradisulfuro en la primera cadena (Lehninger *et al.*, 2000; Pessin y Saltiel, 2000; Reddy y Elliot, 1985).

La insulina se sintetiza como proinsulina, un precursor de cadena sencilla y con una “secuencia señal” amino terminal que dirige su paso por las vesícula secretoras. La eliminación proteolítica de la secuencia señal y la formación de tres puentes disulfuro produce la proinsulina (81 a 86 aminoácidos dependiendo de la especie) que es transportada al aparato de Golgi para ser



empaquetada en gránulos secretorios que siguen madurando mientras atraviesan el citoplasma hacia la membrana plasmática. Con el estímulo adecuado, los gránulos se fusionan con la membrana plasmática y descargan su contenido al líquido extracelular. La insulina no tiene proteína en plasma para su transporte, por lo que su vida en ese medio es de sólo 3 a 5 minutos. Su degradación ocurre principalmente en hígado y riñón por una proteasa específica y una transhidrogenasa, que reduce los enlaces disulfuro, separando las dos cadenas, que así sufren una rápida proteólisis (Lehninger *et al.*, 2000).

La glucosa se une a un receptor de las células  $\beta$  del páncreas y activa el proceso de liberación de insulina, o se degrada en la misma célula, esto aumenta el consumo de oxígeno y la utilización de ATP, lo que provoca la despolarización de la membrana celular inducida por  $K^+$ , facilitando la entrada de  $Ca^{++}$  al interior de la célula y liberándose la insulina. Los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos como la adrenalina y algunos fármacos como las sulfonilureas y la tolbutamina inhiben su liberación.

En las células musculares y adiposas, la disminución de la glucosa circulante depende de la traslocación estimulada por insulina de los transportadores de glucosa (GLUT4), que se encuentran en vesículas citoplásmicas a la superficie celular. Al unirse la insulina a sus receptores en la célula, provoca rápidamente la fusión de esas vesículas con la membrana plasmática y la inserción de los transportadores de glucosa, dándole a la célula la capacidad de absorber glucosa. Cuando disminuyen los niveles de glucosa, sus transportadores se reciclan nuevamente dentro del citoplasma. Sin embargo, aún no se entiende bien el mecanismo por el cual las vías de señalización convergen en las vesículas que contienen GLUT4 para su translocación. Algunas evidencias sugieren que la insulina estimula de manera específica la traslocación de GLUT4 a partir de compartimentos que contienen una proteína conocida como VAMP2. Por otro lado, en las células del páncreas la glucosa ingresa por medio de un proceso de difusión facilitada mediada por el transportador de glucosa GLUT2 (Larsen *et al.*, 2003; Pessin y Saltiel, 2000).

El receptor de insulina al parecer participa en varias actividades funcionales del SNC, que incluye la alimentación, el metabolismo energético, la reproducción y la percepción y se ha sugerido que insulina también podría sintetizarse en el cerebro (Boukhliq *et al.*, 1996; McEwen y Reagan, 2004). El receptor pertenece a la familia tirosina cinasa y su unión a la hormona provoca una rápida autofosforilación, seguido por fosforilación de tirosina de las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS), lo que posteriormente induce la activación contracorriente de vías como la cinasa 3-fosfatidilinositol (PI3K) y las cascadas de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Plum *et al.*, 2005). El receptor de insulina es un dímero que consiste de dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$  unidas por puentes disulfuro a un complejo heterotetramérico  $\alpha_2\beta_2$ . La insulina se une a las subunidades  $\alpha$  extracelulares, transmitiendo una señal a través de la membrana, lo que activa el dominio intracelular de la tirosina cinasa de la subunidad  $\beta$ . Posteriormente, el receptor sufre reacciones de transfosforilación en residuos específicos de tirosina de su pareja adyacente. Las evidencias sugieren que diferentes residuos de tirosina podrían contar para funciones diferentes. Además de la autofosforilación de tirosina, el receptor de insulina está sujeto a la fosforilación serina/treonina de la subunidad  $\beta$ . Una vez activado, el receptor de insulina fosforila varios sustratos importantes en residuos tirosina. La fosforilación y defosforilación de enzimas provoca múltiples efectos metabólicos, la activación e inhibición de varias enzimas y la alteración de la membrana celular, lo que facilita la entrada de glucosa en las células (Pessin y Saltiel, 2000).

El regulador más importante de la secreción de insulina es la concentración de glucosa en la sangre. La hiperglicemia estimula su liberación, la cual puede ser de dos tipos: a) inmediata, un minuto y sólo dura 5 minutos, y b) tardía, cinco minutos pero dura una hora. Otros factores que estimulan la liberación de insulina son hormonas digestivas como gastrina, secretina, colecistocinina y glucagón, algunos ácidos grasos, cuerpos cetónicos, algunos aminoácidos (arginina, lisina y leucina), el polipéptido inhibidor de la secreción gástrica (GIP), los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, la fosfatidil inositol y el AMPc. También puede ser liberada por

medio de una señal nerviosa, al recibir estímulos visuales u olfatorios de comida que llegan a nivel central y se establece la fase cefálica, se libera acetilcolina que por medio de reflejos vagales llevan el mensaje al páncreas para liberar la insulina (Hidalgo, 1999). A nivel cerebral, se ha descrito que insulina también podría ser influenciada por leptina, corticosteroides, galanina, NPY, glucagón y péptidos parecidos a glucagón (Kyriaki, 2003).

Cuando existe una hiperglicemia, además de estimular la secreción de insulina, se provoca una menor secreción de glucagón. La insulina favorece la absorción de glucosa en la mayor parte de los tejidos corporales, en especial en el tejido muscular, en donde será convertida a glucosa 6-fosfato (G-6P, la cual favorece la formación de glucógeno) y activa además la glucógeno sintetasa (en músculo e hígado) e inactiva la glucógeno fosforilasa. Esto disminuye la concentración de glucosa en sangre y en consecuencia, la de insulina. Esta estrecha relación de retroalimentación entre insulina y glucosa en sangre, mantiene una concentración constante de esta última, a pesar de las fluctuaciones en el consumo (Lehninger *et al.*, 2000).

La insulina también estimula la síntesis de triglicéridos, a partir de la conversión del exceso de glucosa, aumentando la actividad de enzimas clave de estas vías metabólicas. Activa la oxidación de G-6P a piruvato, que posteriormente puede oxidarse para producir energía o usarse para la síntesis de ácidos grasos en el hígado y que son transportados como triglicéridos de las lipoproteínas plasmáticas hacia el tejido adiposo. Además, insulina inhibe la lipólisis al inactivar a la lipasa sensible a hormona (Lehninger *et al.*, 2000; Hocquette y Abe, 2000; Tajima *et al.*, 2005).

Al parecer los rumiantes son menos sensibles a la acción de la insulina que otras especies de mamíferos. Se ha observado que la insulina aumenta más de 10 veces la absorción de glucosa en el músculo de ratas alimentadas y más de 17 veces en ayunadas (Berger *et al.*, 1975), pero menos de dos en ovejas (Coward y Buttery, 1982, citado por Hocquette y Abe, 2000) y la tasa de transporte de

glucosa en músculo y adipocitos *in vitro* es menor en terneros y ovejas, respectivamente, comparado con otras especies (Hocquette y Abe, 2000).

En el SNC, la insulina puede cruzar la barrera hematoencefálica a través de mecanismos de transporte mediado por receptores. La cantidad de receptores varía de acuerdo a la especie y se han observado en mayor concentración en el bulbo olfatorio, hipotálamo, corteza cerebral, cerebelo e hipocampo, en diferentes áreas asociadas a la alimentación, reproducción o memoria. La estructura molecular principal y la mayoría de las propiedades de los receptores cerebrales de insulina son idénticas a los receptores periféricos. La unión de insulina a las subunidades alfa extracelulares provoca la autofosforilación de las subunidades  $\beta$ . Esta autofosforilación estimula la actividad de los receptores tirosina cinasa e inicia las respuestas biológicas activando tres cascadas de transducción de señal celular que son mediadas por la fosfolipasa C, cinasa fosfoinositida-3 y la cinasa activada por mitógeno (MAPK). Las diferencias entre ambos receptores, los neuronales y los periféricos, es el menor peso molecular de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en los receptores neuronales y además estos no sufren regulación a la baja por una elevación en la concentración de insulina (Kyriaki, 2003; Plum *et al.*, 2005).

Aún no se establece si la insulina central tiene como función principal la glucoregulación, aunque si puede regular el metabolismo de la glucosa cerebral. En el cerebro, la insulina es uno de los diferentes neuromoduladores de la homeostasis energética. Los efectos anorexigénicos de la insulina en el SNC están relacionados a cambios en la expresión de neuropéptidos. La administración de insulina en el tercer ventrículo provoca una disminución en la expresión del NPY (el cual es orexigénico) en el núcleo arcuato. Esto provoca un aumento en la expresión de los péptidos anorexigénicos, hormona liberadora de corticotropina en el núcleo paraventricular y la hormona alfa estimulante de los melanocitos (Kyriaki, 2003; Plum *et al.*, 2005).

Los efectos de insulina podrían también converger a nivel molecular con la señalización de leptina en la activación de la PI3K, lo que provoca la regulación de canales de potasio dependientes de ATP (KATP) por estas dos hormonas. Esto

provoca la hiperpolarización e inactivación de sus respectivas neuronas hipotalámicas que responden a glucosa y con ello afectar la regulación fisiológica del consumo de alimento y peso corporal (Plum *et al.*, 2005).

Por otro lado, la insulina a nivel central puede aumentar la sensibilidad a esta hormona en tejidos periféricos, lo que provoca menor producción de glucosa en hígado, aunque sin aumento en la absorción de glucosa en tejido muscular y adiposo. Es probable que el mecanismo de acción involucre un aumento en KATP.

La regulación de insulina cerebral es multifactorial y puede ser regulada en la periferia y en el sistema nervioso central por varios metabolitos, hormonas circulantes, péptidos regulatorios y neurotransmisores (Kyriaki, 2003). Glucagón provocó un aumento en la concentración de insulina, lo cual puede atribuirse a la elevación conjunta observada en glucosa; sin embargo, también existió un aumento de insulina previo a la elevación de glucosa, lo que puede sugerir que glucagón tiene también un efecto directo sobre las células  $\beta$  del páncreas (Hippen *et al.*, 1999).

Al igual que leptina, el ayuno disminuye las concentraciones de insulina; su nivel bajó un 80.9% en corderos que fueron ayunados por 24 h, acoplado a una disminución en la concentración de leptina y un aumento en las concentraciones de la hormona de crecimiento (GH), sin embargo, sólo existió una tendencia a disminuir la concentración del factor de crecimiento parecido a insulina-I (IGF-I; Altmann *et al.*, 2006). El ayuno durante los días 7-12 del ciclo estral de ovejas disminuyó la concentración de insulina desde las 24 h de iniciado el ayuno vs animales alimentados (Kiyama *et al.*, 2004) y un ayuno por 32 h en borregas OVX provocó la misma respuesta sin importar la cantidad de reservas corporales de energía (Henry *et al.*, 2004). En carneros sometidos a un ayuno de 5 d se observó una disminución en la concentración de insulina. Sin embargo, una dieta alta en nutrientes (dos veces los requerimientos de mantenimiento) vs una baja no provocó diferencias entre los grupos, aunque si se observó una disminución transitoria durante las primeras dos semanas de iniciado el suministro de las diferentes dietas, lo que sugiere que después de ese periodo, se dio una

adaptación a las condiciones de alimentación (Celi *et al.*, 2006). Adicionalmente, una baja condición corporal causa una disminución en la concentración de insulina en ovejas y se ha sugerido que insulina, glucosa y los ácidos grasos no esterificados (AGNEs), son indicadores metabólicos confiables para evaluar el estado energético de un animal (Caldeira *et al.*, 2007).

El frío es un factor que puede modificar la secreción y/o respuesta a la insulina. Una temperatura ambiente de 0°C no alteró la concentración de insulina en machos Corriedale adultos, a pesar de haberse elevado las concentraciones de glucosa, lo que podría relacionarse con un aumento en la actividad de receptores alfa adrenérgicos en las células pancreáticas. La administración iv de butirato, disminuyó la secreción de insulina en condiciones de frío, comparado con el clima cálido (18-22 °C) y la respuesta de glucosa a una administración de insulina fue mayor en animales en clima frío, considerando el cambio con respecto al nivel basal. La fentolamina (antagonista alfa-adrenérgico) en infusión provocó un aumento en insulina en los animales en clima frío lo que sugiere un aumento en la actividad simpática; un descenso inicial en los niveles de insulina se observó con la infusión de propanolol (un antagonista  $\beta$ -adrenérgico; Sasaki *et al.*, 1982). En el trabajo de Sasaki y Takahashi (1980), una exposición al frío provocó una menor concentración de insulina en respuesta a la administración iv de glucosa en borregos. Se reportó además, la misma respuesta de insulina por la infusión de fentolamina.

Leptina puede alterar la concentración de insulina. Su infusión central durante 3 h disminuyó la concentración de insulina en un 64.7% en ratas, pero sin afectar la de glucosa. Es probable que la activación simpática inducida por leptina pueda inhibir la secreción de insulina en el páncreas (Tajima *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque un ayuno de 5 días provocó un descenso en la concentración de insulina en carneros, la infusión icv de leptina no provocó cambios en la concentración circulante de insulina en comparación con la infusión de líquido cefalorraquídeo (Celi *et al.*, 2006).

#### 2.4.3 Glucagón

Glucagón, la hormona gluconeogénica más potente es un polipéptido de 29 aminoácidos que junto con insulina, somatostatina, hormona polipeptídica pancreática, gastrina y  $\beta$ -endorfina es producida en el páncreas. Se genera específicamente en las células  $\alpha$  de los islotes de Langerhans, aunque también existe producción en el estómago y otras partes del tracto digestivo. Moviliza las fuentes de energía, al estimular la glucogenolisis y la lipólisis, además de ser cetogénica (Reddy y Elliott, 1985).

El glucagón se sintetiza como proglucagón, un polipéptido de 37 aminoácidos, que al perder 8 de ellos forma la hormona en su estado activo. Circula en la sangre de forma libre, sin utilizar proteínas transportadoras, por lo que su vida en plasma es de sólo 5 minutos. Llega al hígado, en donde es inactivado por una enzima que lo hidroliza al separar los dos primeros aminoácidos del extremo N-terminal entre **ser** y **gln** 3, por lo que la concentración de esta hormona en la vena porta es mayor que en la circulación periférica.

La secreción de glucagón ocurre cuando hay una hipoglicemia y se inhibe al aumentar la glucosa, es decir, es hiperglucemiante, lo opuesto a la insulina. Otras sustancias que afectan la secreción de glucagón son las hormonas digestivas, ácidos grasos, aminoácidos y neurotransmisores. Tiene como blanco principal al hígado, se une a receptores de membrana de los hepatocitos activando la adenilato ciclasa; el AMPc formado puede fosforilar enzimas reguladas, lo que estimula la glucógeno fosforilasa (glucogenolisis, aunque no en el músculo) e inhibe a la glucógeno sintetasa y en consecuencia la glucogenogénesis.

La glicogenolisis hepática provocada por glucagón es la responsable de una elevación inicial en glucosa, pero el glucógeno almacenado no podría cubrir grandes periodos de abastecimiento hepático de glucosa por lo que existe un aumento en la gluconeogénesis para solventarlo (Hippen *et al.*, 1999).

Hay evidencia de que glucagón estimula la lipólisis en algunas especies, pero su sitio principal de acción en rumiantes es el hígado (Hippen *et al.*, 1999). Además de estimular la gluconeogénesis, glucagón promueve la activación de la enzima carnitina palmitil transferasa (CPT I) lo que favorece la entrada de los

ácidos grasos no esterificados en la mitocondria para la síntesis de cuerpos cetónicos (Herdt, 2000). El modo de acción de glucagón en la inhibición de la glucólisis en el hígado es por disminución en la disponibilidad del nivel de fructosa 1,2-bifosfato, lo cual es un inhibidor alostérico de la fructosa 1,6-bifosfata y activador de la fosfofructocinasa-1 (Gallegos, s/a; Lehninger *et al.*, 2000). Para estimular la gluconeogénesis, se da una inhibición de la enzima piruvato cinasa, lo que evita la oxidación del piruvato en el ciclo de Krebs y la acumulación resultante del fosfoenolpiruvato favorecerá este ciclo metabólico. En el tejido adiposo existen receptores para glucagón y el aumento de AMPc activa a la triacilglicerol lipasa, que hidroliza los triglicéridos (grasas neutras) en glicerol y ácidos grasos libres que van al hígado y otros tejidos como combustible (Gallegos, s/a). Por otro lado, glucagón aumenta la entrada de glutamina, alanina y lactato al riñón, lo que no ocurre con propionato y glicerol. El paso de piruvato a través de la membrana mitocondrial es mediado además de epinefrina y cortisol, por el glucagón. Estas hormonas pueden alterar la velocidad de las reacciones de las enzimas de la gluconeogénesis; glucagón y epinefrina la aumentan, pero insulina las reduce (Galvis y Correa, 2002).

Una mayor condición corporal en ovinos provoca un aumento en la concentración de glucagón; sin embargo, la relación insulina/glucagón, muestra un aumento en las mismas condiciones, lo que indica una predominancia de la influencia de insulina bajo esas condiciones (Caldeira *et al.*, 2007). Por otro lado, el ayuno en bovinos por 8 días no modificó la concentración plasmática de glucagón, aunque la relación glucagón/insulina aumentó al día 2 y se mantuvo así, hasta el final del estudio (Rule *et al.*, 1985). La relación insulina:glucagón puede ser el principal mecanismo disparador de la lipólisis y/o producción de ácidos grasos no esterificados (Adewuyi *et al.*, 2005). Adicionalmente, esta relación podría ser un indicador más confiable del estado metabólico que la concentración de cada hormona por separado (Caldeira *et al.*, 2007) y su coordinación es importante también en el control de la lipólisis ya que insulina parece tener efectos



regulatorios más fuertes sobre el metabolismo periférico que glucagón (Hippen *et al.*, 1999).

Glucagón aumenta la concentración de nitrógeno ureico en plasma, lo que indica una movilización de proteína y en consecuencia hay una mayor absorción y desaminación de aminoácidos que sirven como sustratos gluconeogénicos hepáticos (Hippen *et al.*, 1999).

Condiciones de frío generalmente no provocan cambios en la concentración de glucagón; en ovejas macho no hubo cambios en esta hormona provocados por este factor, aunque la concentración de glucosa aumentó. Adicionalmente, el frío no modificó la concentración de glucagón al administrar una infusión iv de glucosa; sin embargo, la hipoglucemia inducida por insulina tendió a aumentar su concentración. La administración de arginina (en infusión) o butirato provocó un aumento en la concentración plasmática de glucagón, aunque fue menor en condiciones de frío para butirato. La infusión de fentolamina provocó que los niveles de glucagón disminuyeran bajo clima frío, mientras que propranolol no mostró algún efecto lo que sugiere que una posible estimulación adrenérgica de la liberación de glucagón (Sasaki *et al.*, 1982).

#### *2.4.4 Glucosa*

La glucosa es una aldohexosa que aporta la energía necesaria de la mayoría de los seres vivos, siendo el sistema nervioso central de los mamíferos completamente dependiente de este combustible, el cual contribuye además para la biosíntesis de numerosos neurotransmisores. El cerebro contiene neuronas (relacionadas quizá a la homeostasis energética, regulación de peso corporal a largo plazo y la conducta de alimentación), que aumentan su actividad cuando aumentan los niveles de glucosa. Aunque las especies ruminantes toleran largos periodos de hipoglucemia (hasta 18 mg/dl), sin comprometer su función cerebral, tienen mecanismos para mantener su glicemia en el cerebro de manera normal (40-60 mg/dl; Galvis y Correa, 2002; Kyriaki, 2003). La absorción de este combustible en el cerebro se mantuvo en ovejas ayunadas por 3 y 6 días, lo que indica una resistencia a periodos prolongados de hipoglicemia (Pell y Bergman,

1983). Por otro lado, la inyección de glucosa en animales hipoglicémicos provocó que la prioridad de partición fuera hacia reestablecer los niveles de glucosa en sangre y los de glucógeno hepático (Galvis y Correa, 2002). Sin embargo, se ha descrito que existe una disociación en la concentración de glucosa entre diferentes áreas cerebrales y entre el cerebro y la concentración sanguínea. Hormonas como insulina, glucagón y epinefrina mantienen los niveles de glucosa en sangre de manera constante actuando sobre procesos metabólicos en especial en el hígado, músculo y tejido adiposo (Hocquette y Abe, 2000; Larsen *et al.*, 2003).

La glucosa puede originarse del alimento, de la gluconeogénesis hepática o del glucógeno almacenado en el cuerpo. Las especies rumiantes son gluconeogénicas por excelencia, ya que su absorción de glucosa es muy baja debido a que la fermentación ruminal condiciona su disponibilidad (Galvis y Correa, 2002). El hígado es el principal órgano que contribuye a la producción de glucosa, mediante la glucogenolisis y la gluconeogénesis (hasta el 80% en la vaca lactante), aunque el riñón también puede producirla por gluconeogénesis (hasta el 10-20%, y en ayuno aumenta su participación) y utilizarla. A pesar de que la mayoría de los tejidos tienen las enzimas para sintetizar e hidrolizar el glucógeno, sólo el hígado y los riñones tienen a la enzima glucosa 6-fosfatasa, necesaria para liberar glucosa hacia la circulación (Galvis y Correa, 2002; Larsen *et al.*, 2003).

La glucosa puede ser convertida en glucógeno o triglicéridos para ser almacenada. En el músculo (principal consumidor de glucosa), hasta el 80% de la glucosa absorbida por la oveja se almacena como glucógeno o se metaboliza y el lactato (y piruvato) liberado, es transportado al hígado, en donde sirve como un precursor gluconeogénico (el ciclo glucosa-lactato o ciclo de Cori). Durante la lactancia, la glucosa participa en la formación de lactosa. Otros precursores gluconeogénicos que pueden ir del músculo al hígado son los aminoácidos, en especial alanina (obtenida principalmente del ciclo alanina-glucosa) y glutamina (del ciclo glucosa-glutamina) (Larsen *et al.*, 2003; Mueckler y Holman, 1995). La gluconeogénesis se controla por el suministro de precursores y por el paso de estos a través de transportadores mitocondriales; el suministro de aminoácidos y

propionato en rumiantes, aumenta la tasa de este ciclo metabólico y la disponibilidad de oxalacetato la limita. Además, el flujo de precursores para la gluconeogénesis está sujeto al control hormonal y la relación glucagón:insulina causa la movilización de estos precursores (Galvis y Correa, 2002).

En los rumiantes, los principales productos de la fermentación de los carbohidratos de la dieta son los ácidos grasos de cadena corta (principalmente acetato, propionato y butirato) y la mayor parte de la glucosa en la circulación se origina de la gluconeogénesis hepática a partir de propionato (hasta el 90% es removido de la sangre por el hígado), lactato, glicerol (5% en animales bien alimentados, aunque en ayuno prolongado puede aportar hasta el 20-30% de la glucosa) y aminoácidos (principalmente alanina y glutamina, aportando entre el 15-32% de los sustratos para gluconeogénesis). Debido a la baja absorción de glucosa en rumiantes, su concentración sanguínea es ligeramente menor comparada con la de los monogástricos (Galvis y Correa, 2002; Hocquette y Abe, 2000).

Uno de los mecanismos biológicos que controlan el destino de la glucosa es su absorción por los tejidos. Al igual que otros azúcares como galactosa y fructosa, debido a su tamaño, no puede cruzar la membrana celular por lo que existen proteínas transportadoras llamadas GLUT que la transportan hacia dentro y fuera de las células (son bidireccionales); la dirección de esos movimientos lo determina la concentración de glucosa dentro y fuera de la célula. Los transportadores de glucosa pueden ser sensibles (GLUT4) o insensibles a insulina (GLUT's 1, 2, 3 y 5) y pueden tener funciones fisiológicas especializadas. La mayoría de GLUT4 se encuentra dentro de la célula, de donde bajo ciertos estímulos (aumento en la insulina) se pueden traslocar rápidamente a la membrana plasmática.

La glucosa es esencial para el cerebro de los rumiantes (Pell y Bergman, 1983) aunque sólo pocas isoformas de GLUT se expresan en el SNC y favorecen el abastecimiento de glucosa, GLUT1 en la barrera hematoencefálica y GLUT3 en las neuronas. Los transportadores 2, 4 y 8 podrían participar en actividades

altamente especializadas del SNC. Sin embargo, GLUT's sensibles a insulina (4 y 8) también se expresan en el cerebro y existe RNAm para GLUT8 en cerebro y testículo, por lo que podrían estar involucrados en las acciones centrales de la insulina. En el hipotálamo y el cerebelo existe RNAm para GLUT4. Aún no se conoce la función y localización específica de los GLUT's 6 y 10 (McEwen y Reagan, 2004; Mueckler y Holman, 1995).

Existe GLUT1 en la placenta y cerebro de ovejas y en glándula mamaria y cerebro de bovinos. GLUT2 se detectó en hígado de oveja y páncreas donde participa en el transporte de glucosa que sirve como señal para la liberación de insulina y permite el abasto de glucosa en los enterocitos. Se piensa que GLUT5 podría participar en la absorción de glucosa del lumen del intestino delgado y en la reabsorción de glucosa en el riñón, aunque también se expresa en el músculo esquelético, grasa, testículo y espermatozoides. Sin embargo, al parecer tiene una mayor afinidad para el transporte de fructosa que de glucosa. El GLUT4 existe en todos los tejidos sensibles a insulina en bovinos y cabras (corazón, músculo esquelético, tejido adiposo), pero no en tejidos como hígado, intestino, cerebro y eritrocitos. La concentración de esta proteína es mayor en el tejido adiposo perirrenal y omental que en el subcutáneo en terneros, lo que podría asociarse a la menor actividad metabólica en el tejido subcutáneo (Hocquette y Abe, 2000; McEwen y Reagan, 2004; Mueckler y Holman, 1995).

La hiperinsulinemia eleva los niveles de proteína GLUT4 en los adipocitos de roedores de laboratorio, aunque los resultados en músculo son menos claros. Los clamps euglicémicos hiperinsulinémicos (administración de insulina manteniendo los niveles euglicémicos mediante la infusión de glucosa) en la rata y cabra no cambiaron las concentraciones de GLUT4 en tejido muscular y adiposo. La administración de GH reduce el crecimiento de tejido adiposo (animales en crecimiento) hasta en un 80%, lo cual podría deberse a un descenso en los transportadores de glucosa y lipogénesis en el tejido adiposo y puede disminuir los niveles de RNAm de GLUT4 hasta en 44% en el músculo esquelético en vacas

lactantes. Esto podría favorecer el abastecimiento de glucosa a la glándula mamaria (Hocquette y Abe, 2000).

Como se indicó anteriormente, la concentración de glucosa en sangre se mantiene en un nivel constante por medio de hormonas y proteínas celulares involucradas en su producción y utilización, con lo que se asegura su abasto constante a tejidos primordiales como el cerebro. Los reguladores más importantes son insulina, glucagón, epinefrina, hormona de crecimiento y cortisol. La insulina actúa como reguladora (disminuye la concentración de glucosa en sangre), glucagón, epinefrina, GH y cortisol son contraregulatorias, es decir, elevan la concentración (Larsen *et al.*, 2003; Mueckler y Holman, 1995).

La insulina inhibe la producción de glucosa y estimula su utilización en tejidos sensibles a su acción, formando glucógeno y triglicéridos, lo que disminuye la concentración de glucosa. Inhibe la glucogenolisis y gluconeogénesis, y junto con otros factores, hace del hígado un órgano de absorción y almacenamiento de glucosa. Otra acción de la insulina es suprimir la producción renal de glucosa (Larsen *et al.*, 2003).

Glucagón participa aumentando los niveles de glucosa de origen hepático de manera transitoria. En vacas, se observó un aumento en la concentración de glucosa (niveles pico a los 25-30 min) debido a la infusión de glucagón por 48 horas; su concentración se mantuvo elevada de manera evidente por un periodo de 4-6 horas, aunque su nivel siempre fue mayor que previo a la infusión (Hippen *et al.*, 1999). Activa la glucogenolisis, aunque el efecto no es persistente y activa algo de la gluconeogénesis (aunque su impacto es limitado ya que no moviliza precursores gluconeogénicos). Otra acción adicional de glucagón es favorecer la oxidación de las grasas, lo que disminuye el uso de glucosa (Larsen *et al.*, 2003; Lehninger *et al.*, 2000).

La epinefrina o adrenalina es otra hormona hiperglicemiante, aumentando de manera directa la glucogenolisis y la gluconeogénesis hepática. Se secreta en las células de la médula adrenal en respuesta a menores niveles de glucosa estimulando la producción de glucosa hepática y renal y limitando su utilización.

Los efectos de la epinefrina son mediados a través de receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos. La limitación adrenérgica ( $\alpha_2$ ) de la secreción de insulina es una acción hiperglicémica indirecta importante de la epinefrina. Sin embargo, el aumento en la secreción de insulina que ocurre conforme se eleva la glucosa limita la magnitud de la respuesta glicémica. También existe estimulación adrenérgica ( $\beta$ ) de la secreción de glucagón, pero al parecer contribuye poco al efecto hiperglicemiante de la epinefrina bajo condiciones fisiológicas (Larsen *et al.*, 2003). Las elevaciones a largo plazo de la GH y de cortisol, limitan la utilización de glucosa y estimulan su producción. Sin embargo, inicialmente la GH tiene un efecto de disminución de glucosa, provocando al igual que cortisol un aumento en la glucosa en plasma después de 2-3 horas. El efecto hiperglicémico de la combinación de glucagón, epinefrina y cortisol, es mayor que la suma de los efectos individuales de cada hormona (Larsen *et al.*, 2003).

La hormona leptina podría participar en la homeóstasis de la glucosa, ya que puede normalizar sus niveles, como se observa en ratones con valores anormales de leptina o del receptor de leptina. Las neuronas que expresan OB-Rb/POMC del núcleo arcuato pueden contribuir a la homeóstasis de la glucosa, aunque también el hipotálamo ventromedial tiene neuronas sensibles a glucosa (Robertson *et al.*, 2008).

De esta manera, al existir una disminución de glucosa en sangre, lo que ocurre inicialmente es una menor secreción de insulina; posteriormente, una segunda defensa será una mayor secreción de glucagón. La hipoglicemia progresa cuando glucosa y epinefrina son deficientes y la insulina está presente a pesar de las acciones de otros factores contrarregulatorios de las concentraciones de la glucosa. Ni GH, ni cortisol son críticos para la recuperación de una hipoglicemia prolongada (Larsen *et al.*, 2003).

El hipotálamo puede ser importante para controlar las respuestas que compensen una hipoglicemia. Esas respuestas involucran la liberación de glucagón del páncreas y la activación simpatoadrenal, favoreciendo la secreción

de adrenalina. El hipotálamo ventromedial parece ser el sitio del SNC responsable de la activación de los mecanismos contrarregulatorios (Plum *et al.*, 2005).

El ayuno en rumiantes puede afectar la concentración sanguínea de glucosa. Aunque en ovejas, el ayuno por 4 días no mostró efecto (Adam *et al.*, 2002), Nagatani *et al.* (2000) reportan una disminución en glucosa en borregos castrados e implantados con estradiol y que fueron ayunados durante 72 horas, alcanzando su nadir a las 32 horas de iniciado el ayuno, en paralelo a la concentración de insulina. Lo mismo ocurrió por un ayuno de 32 h en borregas OVX magras u obesas (Henry *et al.*, 2004). En bovinos, la concentración de glucosa disminuyó en los primeros 2 días de un ayuno de 8; sin embargo, su concentración se estabilizó en el resto del periodo de estudio. Es probable que después del día 2 de ayuno, exista un aumento en la concentración plasmática de glicerol y ácidos grasos libres, lo que genera una mayor disponibilidad de sustratos energéticos que normalizan la concentración de glucosa, al favorecer su ahorro (Rule *et al.*, 1985).

Aunque la concentración de glucosa en cabras OVX+E<sub>2</sub> durante un ayuno, permaneció sin cambio (aprox 60 mg/dl), los autores no indican algún estimador de las reservas corporales de energía, excepto que estos animales disminuyeron su peso en aproximadamente un 12% durante el ayuno (Matsuyama *et al.*, 2004). Esto es importante, ya que las reservas corporales de energía pueden servir para mantener estables los niveles de glucosa; ovejas con una baja condición corporal disminuyeron su concentración de glucosa, aumentando en paralelo al aumento en la condición corporal (Caldeira *et al.*, 2007). Esta ausencia de cambios en la concentración de glucosa, también se ha reportado en cabras restringidas con un 30% de los requerimientos de mantenimiento durante 42 días (Tanaka *et al.*, 2002). En otro estudio realizado en cabras criollas, la concentración de glucosa aumenta en animales con una mayor condición corporal vs aquellas con una condición corporal pobre (Gámez *et al.*, 2008).

La concentración de glucosa también puede aumentar a consecuencia del frío (0°C). Machos ovinos en condiciones de frío mostraron una mayor

concentración de glucosa comparado con una temperatura más cálida (18-22°C) y la respuesta a una inyección de insulina fue una hipoglicemia (cambio en la concentración de glucosa plasmática a partir de la línea basal) la cual fue mayor en temperatura fría (Sasaki *et al.*, 1982). De manera similar, ovejas mantenidas a temperatura de 2°C aumentaron la concentración y tasa de recambio de glucosa, en comparación a una temperatura de 20°C (Sano *et al.*, 1999).

#### 2.4.5 Ácidos grasos no esterificados

En mamíferos, en momentos de alta demanda de energía o de un consumo menor al requerido, la energía necesaria puede ser obtenida en parte de las reservas grasas a partir de los ácidos grasos, de los ácidos grasos libres y de los cuerpos cetónicos, los cuales asumen mayor importancia como fuente de energía. Durante el ayuno, con una hipoglucemia aguda, el hipotálamo estimula la producción de epinefrina aumentando la lipólisis; los ácidos grasos libres se liberarán por acción de la lipasa sensible a hormona en el tejido adiposo. Cuando la hipoglicemia es crónica, se secreta GH y ACTH, que estimula la secreción de glucocorticoides que favorecen la lipólisis y proteólisis en músculo. Mediante la lipólisis ocurre una liberación de ácidos grasos en la sangre, que se unen de manera reversible a la albúmina. Para distinguirlos de los triglicéridos en quilomicrones y lipoproteínas, se les llama ácidos grasos no esterificados (AGNE) y su oxidación proporciona el adenosin trifosfato (ATP) requerido en la gluconeogénesis (Adewuyi *et al.*, 2005; Armentano, 1992; Brecchia *et al.*, 2006; Dunshea *et al.*, 1989a; Galvis y Correa, 2002).

Los AGNE pueden servir como sustrato energético por muchos tejidos como el muscular; la  $\beta$ -oxidación peroxisomal y mitocondrial pueden ser vías para la oxidación de estos AGNE (Adewuyi *et al.*, 2005). Son indicadores de un balance energético negativo y reflejan fielmente la movilización de grasa que ocurre en diferentes especies en estados de alta demanda de energía, como la lactación en cabras (Dunshea *et al.*, 1989a) y vacas (Adewuyi *et al.*, 2005), aunque también son un buen indicador del balance energético en condiciones de no lactación en cabras (Dunshea *et al.*, 1989b) y en algunas otras especies no rumiantes



(Bertolucci *et al.*, 2008; Brecchia *et al.*, 2006). El hígado es el principal sitio de absorción y metabolismo de los ácidos grasos libres, por lo que es un modulador clave de la concentración de AGNE en la sangre y un regulador de la distribución de combustibles durante un balance energético negativo. En este órgano se metabolizan estos AGNE a cuerpos cetónicos, se oxidan o se reesterifican para la producción de triglicéridos (Armentano, 1992; Herdt, 2000).

Al parecer la concentración de AGNE en cabras sigue un ritmo diario generado por un oscilador interno y ajustado por el atardecer. Su concentración es baja por la noche y al aproximarse el inicio de luz del día, su nivel se eleva (Alila-Johansson *et al.*, 2006).

La concentración plasmática de AGNE se eleva en ovejas y cabras ayunadas por cuatro días (Adam *et al.*, 2002), ovejas con ayuno de 3 días (también existió aumento de lípidos totales y colesterol; Gaál *et al.*, 1993) y ovejas OVX magras o gordas y ayunadas por 32 h. La infusión de leptina durante el ayuno no modifica la concentración de estos ácidos grasos (Henry *et al.*, 2004). El aumento en AGNE también se ha observado en borregos Suffolk ayunados castrados e implantados con estradiol (Nagatani *et al.*, 2000). Otro reporte en cabras indica un aumento en su concentración plasmática debido a un ayuno de 4 días (0.6-0.9 mEq/l), vs la concentración previa al ayuno y la observada a los 4 días de realimentar los animales (0.2 mEq/l; Matsuyama *et al.*, 2004). En novillos con diferentes periodos de ayuno, las concentraciones de estos ácidos grasos mostraron un patrón similar a lo ya descrito (Blum *et al.*, 1981; Rule *et al.*, 1985) y fue también observable en terneros de una semana de edad sometidos a un día de ayuno (Kinsbergen *et al.*, 1994).

Ovejas restringidas a un 85% de los requerimientos de mantenimiento (Sano *et al.*, 1999) y cabras con restricción del 70% (Tanaka *et al.*, 2004), aumentaron su concentración de AGNE comparado con animales alimentados *ad libitum*.

Los AGNE también aumentan con una baja condición corporal y la relación AGNE/albúmina disminuye con una mayor condición corporal (Caldeira *et al.*,

2007). Por otro lado la concentración de estos ácidos grasos fue mayor en ovejas en condiciones de frío, comparado con aquellas en una zona termoneutral, quizá debido a un aumento en la secreción de catecolaminas (Sano *et al.*, 1999).

La aplicación de glucagón a dosis menores de 5 y 20 mg/d en vacas en diferentes momentos de la lactación y en vaquillas (dosis menores de 10 mg/d), no modificó la concentración de AGNE. Sin embargo, una dosis alta de glucagón (10 mg/d) aumentó la concentración de estos ácidos grasos y aunque existió un aumento también con la dosis de 20 mg/d, ese no fue significativo. Existió un aumento drástico en AGNE después de la infusión, probablemente por la remoción de la inhibición lipolítica debido al descenso en las concentraciones de insulina.

Con respecto al fotoperiodo, se ha reportado un aumento en las concentraciones de AGNE en días largos vs días cortos en borregos macho castrados e implantados con  $E_2$  y se redujo 8 veces en animales infundidos con glucosa en comparación a los infundidos con solución salina, sin importar el fotoperiodo (Archer *et al.*, 2005).

Como se indicó antes, se ha sugerido que la relación insulina:glucagón en sangre es el principal detonador de la lipólisis (Adewuyi *et al.*, 2005), aunque situaciones de estrés también pueden contribuir a elevar los niveles de AGNE (Armentano, 1992). Los efectos más pronunciados de las hormonas son sobre el abastecimiento de AGNE al hígado, más que sobre su disponibilidad intracelular. Aunque los AGNE pueden proveer de energía, su exceso los vuelve tóxicos ya que el hígado tiene una capacidad hepática limitada para metabolizarlos a triglicéridos (TAG). Se pueden oxidar o exportar como lipoproteínas de muy baja densidad. Cuando alcanzan un límite, los TAG se acumulan en el hígado y la acetil CoA (resultado de la oxidación de ácidos grasos) que no se utiliza en el ciclo de Krebs se transforma en cuerpos cetónicos. Cuando estos existen en alta cantidad y no se utilizan, se acumulan en el torrente sanguíneo y causan cetosis. La  $\beta$ -oxidación de los AGNE para ahorrar glucosa para la formación de oxalacetato en los principales tejidos periféricos, aumenta la cantidad de piruvato destinado a la formación de oxalacetato, lo que facilita la entrada de acetil CoA al ciclo de Krebs,

a través de la formación de citrato. Este ciclo de Krebs es la principal vía rendidora de energía. Sin embargo, si este ciclo se sobrecarga, la acetil CoA se desvía para producir cetonas con la finalidad de evitar su acumulación (Adewuyi *et al.*, 2005). La hormona de crecimiento también favorece la movilización de AGNE al reducir la lipogénesis y estarían actuando otros factores que favorecen la lipólisis.

La tasa de liberación de AGNE es regulada por las tasas relativas de lipogénesis y lipólisis. Un aumento en la liberación de estos ácidos grasos refleja un aumento en la lipólisis o un descenso en la lipogénesis (Herdt, 2000).

#### 2.4.6 Urea

Un producto resultante de la degradación de proteínas es la urea, de allí que la concentración de N ureico en la sangre, plasma, suero, orina o leche ha sido referida como una medición útil de cambios en el balance de proteína o la nutrición proteica en rumiantes. Los rumiantes como otros mamíferos sintetizan urea, lo que ayuda a prevenir que el exceso de N se vuelva tóxico al formar amoníaco. Esencialmente toda la urea se produce en el hígado y una vez liberada en la sangre, se excreta en la orina (25-60% de la producción endógena de urea en rumiantes) o reingresa al tracto digestivo por difusión en la saliva o directamente a través de la pared intestinal. El metabolismo de la urea dependerá de la composición de la dieta, consumo y prioridades productivas del animal. Con base en ello, del 19-96% de la producción endógena de urea puede reciclarse al intestino, y de esta del 15-94% puede ser transferida en la saliva y 25-90% de la degradada en el intestino puede degradarse en el tracto digestivo (Huntington y Archibeque, 1999).

En bovinos bajo un ayuno de 5 días, algunos indicadores de proteólisis mostraron un aumento en su concentración circulante. Entre ellos estuvieron urea y albúmina (Blum *et al.*, 1981); estos aumentos en la concentración circulante de urea se han observado también en terneros de una semana de edad sometidos a un ayuno de 24 horas, en los que sólo se suministró solución salina (Kinsbergen *et al.*, 1994). En novillos, bajo un ayuno de 8 días, la concentración plasmática de nitrógeno ureico aumentó del día 0 al 2, posteriormente, entre los días 3-5, la

concentración se estabilizó. Ya que en este estudio hubo una hipoinsulinemia al día 2, esto pudo provocar un descenso en la absorción periférica de aminoácidos y mayores tasas de catabolismo de reservas proteicas, dejando por lo tanto mayor disponibilidad de aminoácidos para catabolismo hepático y síntesis de urea. La posterior estabilización indicaría una adaptación del metabolismo de aminoácidos, lo que ayudó a conservar aminoácidos para procesos metabólicos más críticos que su oxidación para generación de energía (Rule *et al.*, 1985).

En la especie ovina, también existe un aumento en la concentración plasmática de urea debido a un ayuno de 3 días (Gaál *et al.*, 1993). Se ha reportado que estos aumentos ya existen desde el segundo día de ayuno en parte debido a un aumento en la reabsorción tubular de urea en las razas Merino y Steppe fat-tailed (Szanyiová *et al.*, 1985). En ovejas bajo diferentes niveles de condición corporal, la concentración de urea se elevó en animales con menor cantidad de reservas energéticas (valor de 1.25 en una escala de 1-4) y ocurrió lo mismo con los de condición corporal más alta (valor de 4). Aunque niveles altos de urea en animales sobrealimentados podrían deberse a un aumento en la producción de amoníaco en el rumen y un exceso de compuestos nitrogenados exógenos absorbidos en el intestino, que no pudieron ser almacenados, en un estado de desnutrición severa, la fuente de urea es resultado del catabolismo de compuestos nitrogenados endógenos movilizados para cubrir el déficit de energía. Urea y albúmina en este estudio mostraron ser los indicadores más confiables del balance proteico de los animales (Caldeira *et al.*, 2007).

#### 2.4.7 Cuerpos cetónicos

En momentos de un limitado abastecimiento de glucosa o de precursores de esta, también disminuye el flujo de derivados al ciclo de Krebs por lo que hay una baja o nula cantidad de citrato (primer intermediario del ciclo) que deja la mitocondria para la formación de malonil CoA. La baja concentración de esta última provoca la activación de la enzima carnitina palmitil transferasa I (CPTI, necesaria para el transporte de AGNE dentro de la mitocondria), lo que genera un transporte rápido de AGNE a la mitocondria en donde serán metabolizados,

produciendo glucosa y cuerpos cetónicos. La acetil CoA es un precursor de los cuerpos cetónicos y mucho de ella se metaboliza a acetoacetato (uno de los cuerpos cetónicos) en la mitocondria. El acetoacetato deja la mitocondria e ingresa al citosol en donde una porción se transforma en otro cuerpo cetónico, el  $\beta$ -hidroxibutirato, antes de dejar el hígado e ingresar al torrente sanguíneo. Ya en la circulación, los cuerpos cetónicos sirven como una fuente adicional de combustible para el músculo, ahorrando así glucosa como fuente de energía y promoviendo mayores concentraciones de glucosa en la sangre. Además, los cuerpos cetónicos sirven como un regulador de retroalimentación de la liberación de AGNE al suprimir la lipólisis (Herdt, 2000).

La concentración de  $\beta$ -hidroxibutirato, se elevó al día 2 de ayuno en novillos, aunque sin observar diferencias en los siguientes 6 días de ayuno (Rule *et al.*, 1985). Esta elevación puede deberse a una mayor secreción de glucagón; en vacas la administración de esta hormona por infusión, provocó un aumento en  $\beta$ -hidroxibutirato, quizá como resultado de una mayor concentración de ácidos grasos no esterificados.

#### 2.4.8 Hormona de crecimiento

Entre muchas otras funciones, la hormona de crecimiento es una hormona regulatoria de combustibles con una función importante para la adaptación a un balance energético negativo. Reduce la lipogénesis, lo que favorece la movilización de AGNE. La secreción de esta hormona se estimula por la hipoglucemia y su concentración generalmente está elevada en la lactación temprana de vacas, por lo que está involucrada en la movilización corporal de nutrientes (Herdt, 2000). Su concentración no se modifica por la infusión icv de leptina en borregos Merino con diferente condición corporal (Celi *et al.*, 2006).

En novillos bajo un ayuno de 8 días, la concentración de la GH disminuyó sólo durante los primeros 2 días, no existiendo cambios en los días posteriores, similar a lo que ocurrió con la relación GH:insulina (Rule *et al.*, 1985). Sin embargo, se ha aceptado que la desnutrición provoca un aumento en las concentraciones de GH; esto se observó en ovinos ayunados por sólo 24 horas

(Altmann *et al.*, 2006). Aunque un ayuno de 32 horas en ovinos no provocó cambios en la concentración de GH, un ayuno de una mayor duración (72 horas) provocó un aumento de esta, el cual fue revertido por la administración de leptina. Con ello, los aumentos que se observan en GH durante el ayuno podrían deberse a una reducción en la hormona leptina, aunque el mecanismo no se conoce (Henry *et al.*, 2004). En el caso de carneros, el nivel de reservas de energía o el ayuno por 5 días no afectó la concentración de la GH (Celi *et al.*, 2006).

#### 2.4.9 Catecolaminas

Las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) son quizá –después de insulina- las sustancias reguladoras más importantes en el control del metabolismo del tejido adiposo, estimulando fuertemente la lipólisis. Norepinefrina se secreta en las terminales nerviosas simpáticas en el tejido adiposo, lo que provoca una liberación de AGNE a la circulación. El control de la actividad nerviosa simpática es por centros cerebrales, lo que permite el control de la lipólisis por centros cerebrales sensibles al balance de energía. La epinefrina secretada por la médula adrenal también es un estimulador potente de la lipólisis, lo que indica que el estrés puede estimular la secreción de los AGNE (Herdt, 2000).

#### 2.4.10 Hormonas tiroideas

El hipotálamo produce la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que estimula a la hipófisis para liberar la hormona estimulante de la tiroides (TSH, una glicoproteína con dos subunidades). En la glándula tiroides, el aminoácido tirosina y el yodo absorbido de la circulación por transferencia activa dan origen a dos hormonas tiroideas, la 3'-5'-3'-5'-tetrayodotironina o tiroxina ( $T_4$ ) y la 3-3'-5-triyodotironina ( $T_3$ ), las cuales actúan en diferentes tejidos, estimulando la utilización de oxígeno y la producción de calor en cada célula corporal. La  $T_4$  es el principal producto de la tiroides (toda se produce en esta glándula) y se puede referir como una prohormona de la forma activa, la  $T_3$  (la cual es 5 veces más activa que  $T_4$  y producida escasamente en la tiroides), cuya conversión se puede realizar en la tiroides y fuera de ella (aproximadamente el 80% en humanos), por deiodinación de  $T_4$  principalmente en el hígado, riñón y músculo esquelético. Las

hormonas tiroideas son transportadas en la sangre unidas a diferentes proteínas y su vida media es de 10 d para  $T_4$  y de 1.5-3 d para  $T_3$  (Gallegos, s/a; Kelly, 2000; Hennemann *et al.*, 2001; Rudas *et al.*, 2005; Todini *et al.*, 2007).

Triyodotironina y tiroxina, además de  $T_3$  reversa ( $rT_3$ ) se encuentran en estructuras de la tiroides conocidas como folículos, que contienen una sustancia llamada coloide que sirve de reservorio para estas hormonas; el coloide contiene globulina, la molécula en que están unidas las hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas completas contienen 2 anillos de benceno y después de su formación, las proteasas lisosomales cortan cualquiera de ellas de una molécula de tiroglobulina y las hormonas se liberan a la circulación. Sus efectos metabólicos se dan con su unión a receptores específicos que provocan efectos en la expresión de genes. Se ha calculado que una célula necesita 5-7 veces más  $T_4$  que  $T_3$  unida a receptores nucleares para tener efectos fisiológicos comparables (Kelly, 2000).

Más del 99% de  $T_4$  y aproximadamente 90% de  $T_3$  se transportan unidas a otras moléculas y el resto en forma libre, lo que aumenta su vida media en la circulación. Por otro lado, más del 70% de la  $T_4$  es deiodinada en tejidos periféricos para formar  $T_3$  o  $rT_3$ . Cuando una molécula de diiodotirosina se une a otra similar forman  $T_4$ , mientras que si se une a una monoiodotirosina formarán  $T_3$ . Cuando una célula requiere estimulación de la hormona tiroides y una molécula de  $T_4$  se aproxima, una deiodinasa en la membrana celular la convierte en  $T_3$ , y si no se requiere el estímulo, la deiodinasa transforma la  $T_4$  en  $rT_3$ , lo que evita una estimulación innecesaria en la célula. La  $T_3$  por su naturaleza lipofílica puede atravesar libremente la membrana y citoplasma celular para llegar al núcleo donde su unión a un receptor provoca finalmente la producción de proteínas específicas que causan el efecto fisiológico; sin embargo, también se han detectado sitios de unión para estas hormonas en las membranas de hepatocitos, eritrocitos, riñón, testículo y placenta, aunque aún no es clara su función en esas células (Hennemann *et al.*, 2001; Kelly 2000).

Algunas de las funciones atribuidas a las hormonas tiroideas son: aumentar la tasa metabólica basal, aumentar la disponibilidad o la oxidación de la glucosa

para abastecer a las células musculares y adiposas (facilitando su absorción mediada por insulina), estimular la síntesis de proteína, aumentar el metabolismo de lípidos y estimular funciones cardíacas y neuronales; aumentan el consumo de oxígeno en la mitocondria lo que genera calor. Un aumento en la concentración circulante de hormonas tiroideas se presenta durante la glicogenolisis y disminuye durante la gluconeogénesis. Se ha reportado que la concentración circulante se relaciona de manera positiva a la condición corporal de ovinos, aunque animales obesos podrían tener valores bajos debido a un menor consumo por la mayor condición corporal de las ovejas y/o por la inhibición de la liberación de la TSH producida por las altas concentraciones de IGF-I (Caldeira *et al.*, 2007; Kelly, 2000).

El hígado y en menor grado el riñón participan en el metabolismo de las hormonas tiroideas, las cuales se vuelven inactivas al removerles yodo de su estructura por medio de deiodinasas, mismo que puede ser reciclado. Para deshacerse de la tironina, el hígado conjuga la molécula con una molécula glucurónida o de sulfato, lo que la hace más soluble en agua y así es posible excretarla vía renal. La transformación a isómeros  $T_2$  y  $T_1$  también se da casi exclusivamente en el tejido periférico. En animales, isómeros  $T_2$  inducen un aumento dosis-dependiente en la tasa metabólica en reposo, esto se acompaña por un aumento paralelo en la capacidad oxidativa de tejidos metabólicamente activos como el hígado, músculo esquelético, tejido adiposo café y corazón. Aunque  $T_3$  se considera como la hormona tiroide metabólicamente activa, comparado con  $T_2$  tiene sólo pequeños efectos oxidativos y metabólicos sobre el músculo esquelético y no hay efecto estimulante significativo en el corazón y el tejido adiposo café. Una segunda vía de metabolismo de las hormonas tiroideas es por la conjugación del grupo hidroxil fenólico del anillo fenólico externo con sulfato o ácido glucurónico, lo que ocurre en el hígado principalmente y en menor medida en el riñón.

El estrés puede afectar el metabolismo de las hormonas tiroideas. Cortisol puede disminuir la producción de TSH y la respuesta a TRH, y provocar un



descenso en T<sub>3</sub> y un aumento en rT<sub>3</sub>. Incluso variaciones fisiológicas de cortisol en un rango normal pueden afectar estas hormonas. Por otro lado, la restricción del consumo calórico y de carbohidratos puede afectar negativamente el metabolismo de las hormonas tiroideas. El ayuno también afecta este metabolismo (hay disminución de TSH y T<sub>3</sub> y aumento de rT<sub>3</sub>), lo cual podría deberse, al menos parcialmente, a aumentos en cortisol (Kelly, 2000). Por otro lado, el frío puede provocar un aumento en la liberación de TRH.

En ovejas se observó un aumento en triiodotironina y tiroxina con una mayor condición corporal, lo que indica una relación directa con el nivel nutricional y con ello un buen indicador del estado metabólico general de esta especie. Sin embargo, existió una concentración similar entre los grupos con la mayor condición corporal (CC= 4) y con una condición media (CC= 2) , lo que podría ser resultado de un menor consumo causado por la alta condición corporal o la inhibición de la liberación de la hormona estimulante de la tiroides provocada por las altas concentraciones de IGF-I (Caldeira *et al.*, 2007). Relaciones similares entre la triiodotironina y el estado de alimentación se han observado en otras especies (Brecchia *et al.*, 2006).

Es probable que leptina regule bajo ciertas condiciones metabólicas la expresión de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). El ayuno (y por consecuencia menos leptina) suprime la expresión de la hormona liberadora de tirotrópina y de hormonas tiroideas y las acciones mediadas por las hormonas tiroideas sobre la tasa metabólica (Robertson *et al.*, 2008). En el caso de carneros, el nivel de reservas de energía no provocó un cambio en la concentración de T<sub>3</sub> ó T<sub>4</sub> libre durante un periodo de 5 semanas. Sin embargo, un ayuno por cinco días provocó un aumento en la T<sub>4</sub> libre y un descenso en T<sub>3</sub>, lo que sugiere que estas hormonas son más sensibles a desafíos nutricionales de corto plazo. En ambos casos no se observó un efecto de la infusión de leptina sobre estas dos hormonas (Celi *et al.*, 2006).

Además de tener una fuerte influencia en el desarrollo del SNC, las hormonas tiroideas (que pueden atravesar la barrera hematoencefálica) participan

en su funcionamiento fisiológico. Estados de hipotiroidismo en algunos mamíferos logran mantener niveles apropiados de  $T_3$  en el cerebro por periodos de hasta dos semanas, por lo que es probable que la absorción de  $T_3$  se maximice, que aumente la conversión de  $T_4$  a  $T_3$  o que disminuya la tasa de pérdida de  $T_3$  por disminución en deiodinasas (Rudas *et al.*, 2005).

La concentración de  $T_4$  y la relación  $T_3:T_4$  es mayor en animales con una dieta alta en energía, comparado con animales control en la semana 17 y 21 de la gestación, lo que sugiere en parte una mayor actividad secretora de la tiroides. Los niveles altos, también observados en otras especies podrían explicarse por un aumento en proteínas de unión en sangre, secreción de factores tirotrópicos por la placenta, mayor respuesta de la TSH a la TRH o cambios en el metabolismo de la tiroides materna. Adicionalmente, estos niveles altos durante la gestación tardía, podrían estar asociados al balance energético negativo (BEN) que se presenta normalmente durante este periodo (Todini *et al.*, 2007).

La concentración de hormonas tiroideas puede ser afectada por el ayuno y la condición corporal (CC). Su concentración circulante disminuye por el ayuno en borregas, comparado con los animales control no ayunados (McFarland *et al.*, 2002). Igualmente, en condiciones de baja CC en ovejas se disminuye la concentración de  $T_3$  y  $T_4$ , y estas aumentan al ocurrir lo mismo con la CC, aunque al llegar a un límite alto de esta condición podría disminuir su secreción por inhibición de la TSH, debido a un aumento en el IGF-I (Caldeira *et al.*, 2007).

En condiciones de ayuno en el humano se puede dar una disminución en la absorción de  $T_4$  en hígado (sin daño en la conversión de  $T_4$  a  $T_3$ ), lo que provoca una reducción en la producción de  $T_3$ . Esto quizá se deba a un agotamiento de ATP, lo que provoca una disminución en la entrada de tiroxina a los tejidos productores de  $T_3$  y por mayores concentraciones circulantes de inhibidores de su absorción celular, como 3-carboxi-4-metil-5 propil-2-ácido furanpropanoico, indoxil sulfato, NEFA's y bilirrubina (Hennemann *et al.*, 2001).

## **2.5 Mecanismos que regulan los efectos de la nutrición sobre la secreción de GnRH-LH**

Diversas señales podrían relacionar el crecimiento, la adiposidad y/o el estado metabólico con la regulación y/o actividad reproductiva. Entre ellas podrían estar la concentración circulante de combustibles metabólicos como glucosa, el nivel de hormonas como insulina y leptina y algunos aminoácidos específicos.

### *2.5.1 Glucosa*

La disponibilidad de glucosa es considerada una de las señales metabólicas involucradas en la regulación del generador de pulsos de GnRH y tiene una función esencial en el control nutricional de la reproducción en los rumiantes (Bucholtz *et al.*, 1996; Ohkura *et al.*, 2004; Schneider y Zhou, 1999). Se ha propuesto que existe un mecanismo sensor de glucosa en la médula oblonga, de donde sería transportada la información sobre la disponibilidad de este combustible hacia el generador de pulsos de GnRH hipotalámico (Ohkura *et al.*, 2000; Ohkura *et al.*, 2004). Sin embargo, los efectos de la nutrición sobre la concentración de glucosa en plasma son diversos. Esta concentración no se afectó por un ayuno de 4 días en cabras, lo cual probablemente se deba a que en los rumiantes, el abastecimiento de glucosa depende en gran parte de la gluconeogénesis (Matsuyama *et al.*, 2004). Así, el nivel plasmático de glucosa se mantendría constante durante el ayuno en cabras y podría mantenerse sin cambio bajo una restricción crónica; la concentración de glucosa en plasma fue similar en cabras consumiendo 30% ó 100% de sus requerimientos para mantenimiento durante aproximadamente 45 días (Tanaka *et al.*, 2004). Sin embargo, es probable que a nivel cerebral los cambios en el nivel de glucosa lleguen a ser percibidos con mucha mayor sensibilidad, provocando un aumento en el intervalo entre las descargas MUA (Matsuyama *et al.*, 2004). Aunque una ración alta en nutrientes vs una baja no provocó cambios en la concentración de glucosa entre ambos grupos de carneros, si hubo una disminución paulatina (5 semanas) en los de la ración baja. Lo anterior podría indicar que los carneros con menor consumo tienen una

adaptación a este, por lo tanto no disminuyen en forma aguda su concentración plasmática de glucosa (Celi *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha sugerido que tal vez las condiciones nutricionales sean reconocidas como el total de energía disponible y que la glucosa sólo esté contribuyendo parcialmente a la regulación de la generación de pulsos de GnRH. Esto indicaría que cuando otros metabolitos no estén disponibles, una disminución ligera en la disponibilidad de glucosa es suficiente para suprimir la actividad del generador de pulsos de GnRH (Ohkura *et al.*, 2004). Por ello, nuevamente es importante considerar el estado energético de los individuos; aunque existió una disminución en la frecuencia pulsátil de LH en cabras ayunadas durante 72 horas en comparación al periodo previo, esto sólo ocurrió en cabras ligeras, existiendo un descenso simultáneo en la concentración plasmática de glucosa (Tanaka *et al.*, 2002).

La importancia de la disponibilidad de glucosa para favorecer la generación de pulsos de GnRH ha sido reportada en estudios en los que la infusión intravenosa de 2-deoxi-D-glucosa (2DG), un inhibidor de la utilización de glucosa, aumentó el intervalo entre las descargas MUA en la región del núcleo arcuato/eminencia media en cabras Shiba OVX e implantadas con E<sub>2</sub>. Estos intervalos de las descargas regresaron a la normalidad cuando se co-infundió glucosa e insulina, lo que no se observó en animales que fueron tratados con un inhibidor de la utilización de lípidos (mercaptoacetato sódico). Esto sugiere que es la disponibilidad de glucosa y no la de ácidos grasos la que regula la actividad del generador de pulsos de GnRH. Ya que los intervalos de las descargas MUA se prolongaron al mismo tiempo que se volvía más profunda la hipoglucemia, esto podría indicar que cambios graduales en la disponibilidad de glucosa se reflejan en la actividad del generador de pulsos de GnRH (Ohkura *et al.*, 2004).

En estudios realizados con corderos, también se ha reportado que la 2DG a dosis de 240 y 480 mg/kg iv, reduce transitoriamente la frecuencia pulsátil de LH, aunque no su amplitud. Dosis menores de 2DG no mostraron algún efecto sobre esta hormona. Estos resultados son debido a un efecto a nivel central, ya que la

administración de GnRH durante el periodo de efecto del 2DG mantuvo la frecuencia pulsátil de LH de manera similar a lo que existió antes de suministrar el fármaco, al igual que ocurrió cuando se suministró N-metil-aspartato (un secretagogo de GnRH). Después de la administración de la 2DG, la concentración plasmática de glucosa aumentó 4 veces, alcanzando su pico a las 2 h y regresando a sus valores normales posteriormente, lo que a decir de los autores puede ser resultado de una reacción cruzada con el ensayo de glucosa (método oxidasa) o a que se produjo una real hiperglicemia, por menor secreción de insulina que se provoca por una reducida glucólisis en las células  $\beta$  pancreáticas. El mismo efecto observado de la 2DG administrado iv sobre LH, se observó cuando el 2DG se administró en dosis menores (1 centésima parte de la dosis iv) a nivel central (ventrículo lateral), aunque no se observó un efecto sobre la concentración plasmática de glucosa (Bucholtz *et al.*, 1996).

Algunos autores han considerado que los resultados de los estudios que muestran una disminución en la frecuencia pulsátil de LH por la administración de insulina, se atribuyen a una hipoglucemia resultante del uso de esta hormona (Clarke *et al.*, 1990)

Al parecer, durante un descenso agudo en la disponibilidad de glucosa, el animal no puede compensar la falta de sustratos metabólicos, lo que provoca una disminución en LH. Por otro lado, cuando se les proporciona glucosa a animales bien alimentados es probable que la absorción de este combustible en las neuronas de GnRH no cambie de manera significativa. De esta manera, la glucosa podría representar sólo una parte del circuito que percibe las señales originadas por el balance energético y que son identificadas a nivel central, al menos en rumiantes (Celi *et al.*, 2006).

### 2.5.2 Insulina

Una de las hormonas que podría funcionar como señalizador para regular la secreción de GnRH es insulina. Se ha reportado que existe expresión de receptores en neuronas productoras de GnRH y las que median la síntesis o secreción de esta hormona (Brunning *et al.*, 2000, citado por Kyriaki, 2003). La

concentración de insulina disminuye durante el ayuno en cabras de manera simultánea al descenso en la secreción pulsátil de LH (Tanaka *et al.*, 2002), de la misma manera en que ha sido reportada en otras especies ruminantes (Chelikani *et al.*, 2004). También existió un descenso en la concentración plasmática de insulina, en cabras con restricción alimenticia (30% de los requerimientos) durante más de 40 días, comparado con aquellos animales que cubrieron sus requerimientos de mantenimiento, sin afectar la concentración circulante de glucosa (Tanaka *et al.*, 2004), lo cual es un indicio de la eficiencia de esta especie para mantener sin cambio en plasma este importante combustible.

Aunque se han reportado efectos adversos a la administración de insulina sobre la secreción de LH, es probable que los estudios que los reportan muestren en realidad la respuesta a la hipoglucemia (y neuroglucopenia) resultante y no los de la insulina misma. La administración iv de 100 UI de insulina en ovejas OVX provocó una hipoglucemia y disminución conjunta en la concentración de LH plasmática (menor frecuencia y amplitud de pulsos), lo cual fue revertido por la infusión de glucosa (sólo con dosis de 30 ml/h en infusión de glucosa al 50%). La dosis de insulina administrada (100 UI) provocó un descenso en glucosa que regresó a su nivel, al igual que LH, 2-3 h después. Adicionalmente, la infusión de naloxona desde antes de inyectar insulina, bloqueó el efecto sobre la secreción de LH, aunque no evitó la hipoglucemia provocada por la insulina, por lo que los efectos de esta hormona (o de la glucosa) podrían involucrar un mecanismo opioidérgico (Clarke *et al.*, 1990).

De la misma manera, los intervalos de las descargas MUA se prolongaron por una hipoglucemia inducida por la infusión de altas dosis de insulina durante 5 horas (Matsuyama *et al.*, 2004). Existió una correlación negativa entre los intervalos de las descargas MUA y las concentraciones circulantes de glucosa durante la infusión de insulina. La hipoglucemia inducida por insulina provocó un aumento en el intervalo de las descargas MUA, las cuales fueron restauradas por la glucosa, aún cuando las concentraciones de insulina permanecieron altas. Ya que el 2DG suprimió las descargas sin cambios en las concentraciones

plasmáticas de insulina, esto indicaría que es una hipoglucemia y no una acción directa de la insulina, lo que provoca una supresión de la actividad del generador de pulsos de GnRH en cabras (Ohkura *et al.*, 2004). Sin embargo, los trabajos no indican la condición corporal de los animales, lo cual ya se ha mencionado que puede afectar las respuestas de LH al efecto de la glucemia. Aún faltan estudios que puedan confirmar y precisar mejor lo anterior.

En carneros sometidos durante cinco semanas a una dieta alta o baja en energía (200 ó 50% de su requerimiento de energía para mantenimiento), no hubo diferencias en la secreción de LH, a pesar de observarse una disminución en la concentración circulante de insulina (Celi *et al.*, 2006).

Por otro lado, no se puede descartar la acción combinada de insulina y glucagón. Se ha descrito que la relación entre estas dos hormonas, más que la insulina por si sola pueden tener efectos sobre el metabolismo intermediario y la reproducción. Glucosa puede estar mediando lo anterior también en función de la presencia de otros combustibles metabólicos. Picos de producción de insulina se producen 10-30 minutos después de la ingesta. Los picos de glucagón podrían contrarrestar los picos de insulina (Galvis y Correa, 2002).

### 2.5.3 Leptina

Desde hace varios años ya se sugería que la grasa corporal podría regular la actividad reproductiva (Schillo, 1992). Leptina puede estar funcionando como señal metabólica, secretándose en menor grado durante el ayuno en cabras con menores reservas energéticas, lo que en consecuencia podría disminuir la frecuencia de secreción pulsátil de LH (Tanaka *et al.*, 2002). Adicionalmente, existen receptores de leptina en el hipotálamo de varias especies y se colocan los sitios de producción de varios neuropéptidos importantes en el control del consumo de alimento y la reproducción, los que son susceptibles de ser regulados por leptina (Hileman *et al.*, 2000).

Algunas de las observaciones que vinculan a la leptina con la reproducción son la presentación de la infertilidad en ratones ob/ob (carentes de leptina); el aumento (dosis dependiente) que ocasiona la leptina en la liberación de LH, FSH y

prolactina en cultivos de hipófisis; aumento en el peso de los testículos en ratones ob/ob a los que se les administró leptina. Además, en ratones hembra en ayuno, la administración de leptina evita la reducción en la secreción pulsátil de LH y aumenta sus niveles séricos, lo cual también ha sido reportado en monos (Brann *et al.*, 2002). La administración de leptina durante 14 días en ratones hembra ob/ob, aumentó los niveles de LH al final de este periodo, el peso de órganos reproductivos (ovario y útero) y el número de folículos primordiales, primarios, primarios tempranos, secundarios y folículos de Graaf, comparado con las hembras control. Aunque también mostraron un aumento en la concentración de FSH, este sólo fue significativo para los machos, que también tuvieron aumento en el peso de los testículos y de las vesículas seminales, sin mostrar diferencia con los machos control en los niveles de LH. Lo anterior sugiere que los efectos de leptina podrían darse en el cerebro, hipófisis y gónadas (Barash *et al.*, 1996). A pesar de lo anterior, es importante mencionar que el metabolismo de ratas, monos y otros monogástricos no necesariamente se relaciona igual con el eje hipotálamo-hipófisis que en rumiantes.

Al parecer, el efecto estimulante de la leptina sobre la secreción de LH en rumiantes está confinado principalmente a periodos de estrés nutricional, como lo es el ayuno. La administración de esta hormona no afecta la secreción de LH en ovejas y vacas ovariectomizadas con una buena nutrición, pero evita una reducción en la frecuencia de pulsos de LH en ovinos castrados tratados con E<sub>2</sub> y ayunados, y en vaquillas intactas prepúberes en ayuno. De la misma manera, los estudios sugieren que sólo las ovejas ayunadas, alimentadas previamente con una dieta normal responderán agudamente a la leptina, mientras que las restringidas en forma crónica que fueron ayunadas, no aumentan su secreción de LH (Zieba *et al.*, 2005).

En vacas, un ayuno de corto plazo (2-3 d) no disminuye la frecuencia de pulsos de LH, aun en animales moderadamente delgados, pero la leptina estimuló un aumento fuerte en la línea basal y las concentraciones de LH. Algunas revisiones realizadas indican que los aumentos en la secreción de LH han sido



atribuidos a dos sitios de acción, el hipotálamo y la adenohipófisis; sin embargo, aún no se explica la incapacidad de la leptina para estimular un aumento en las concentraciones de LH en animales bien alimentados. Al parecer, la duración y/o la cantidad de exposición a la hormona parece determinar el nivel de resistencia, ya que los efectos de la leptina sobre el eje hipotálamo-hipofisiario parecen ser dosis-dependientes (Zieba *et al.*, 2005). Spicer (2001) sugiere que al alcanzar un nivel umbral, la leptina podría actuar como un detonador para iniciar la secreción de gonadotropinas, aunque niveles muy altos no tendrían efecto. Así, leptina puede estar señalizando la disponibilidad de combustibles metabólicos derivados del tejido adiposo en condiciones marginales de disponibilidad de estos combustibles; más allá de ese umbral mínimo no necesariamente hay una respuesta adicional de LH a esas señales.

En estudios con carneros con un estado de acumulación energética alta o baja, la infusión icv de leptina no causó efectos sobre la secreción de LH a pesar de una disminución circulante de leptina, lo que sugiere que esta hormona juega sólo un papel permisivo sobre el control nutricional del eje reproductivo. Sin embargo la falta de efectos de leptina sobre LH podrían deberse a una disminución en estrógenos causada por la desnutrición, ya que se ha reportado que los estrógenos aumentan la sensibilidad del cerebro a la leptina y estimulan la expresión del gen de esta hormona (Celi *et al.*, 2006).

En el desarrollo de la pubertad, la leptina puede ser una señal importante, actuando también como facilitadora o permisiva (se requieren niveles basales). Es probable que al aumentar la concentración circulante de leptina durante el desarrollo de la pubertad, se alcance un umbral que permite la activación del eje reproductivo. Sin embargo, para alcanzar la pubertad, (además de una concentración circulante de leptina), se debe lograr un peso corporal crítico, una masa corporal crítica y/o niveles críticos de metabolitos (Barb y Kraeling, 2004; Brann *et al.*, 2002; Hileman *et al.*, 2000).

Se ha sugerido que la placenta puede ser capaz de producir niveles equivalentes o mayores de leptina de los que produce el tejido adiposo y podría

actuar de manera autocrina o paracrina en estos tejidos (Brann *et al.*, 2002); sin embargo, en cabras no se observaron diferencias entre animales gestantes y no gestantes, lo que podría indicar que la placenta no contribuye a elevar los niveles de leptina en esta especie (Bonnet *et al.*, 2005). Además, se ha observado que la leptina se une a sus receptores en órganos fetales, por lo que se piensa que puede influir en el desarrollo y crecimiento del feto (Brann *et al.*, 2002).

Se ha reportado que la concentración de leptina puede ser alterada por la etapa del ciclo estral, aunque la relevancia de esto no ha sido resuelto; la concentración disminuye durante la fase lútea tardía y la fase folicular temprana de vaquillas maduras y vacas (Barb y Kraeling, 2004).

La leptina administrada en el tercer ventrículo favorece la liberación de LH, por lo que podría actuar de manera directa en el hipotálamo, sobre las neuronas de GnRH; sin embargo, en estas últimas no se han observado receptores para la hormona, por lo que podría afectar su secreción de manera indirecta a través de interneuronas. Su acción puede ser mediada, al menos en parte, por el transcripto regulado por cocaína-anfetamina, que es un facilitador de la expresión del gen de GnRH y que está altamente expresado en la eminencia media. Otros candidatos son el NPY, POMC y ácido gama-aminobutírico (GABA). Tanto las neuronas productoras de NPY, POMC y CART poseen receptores para leptina y la inyección intracerebroventricular de NPY inhibe la actividad del generador de pulsos de GnRH, en una manera dosis dependiente (Ichimaru *et al.*, 2001). Dentro del núcleo arcuato se pueden citar a otros neurotransmisores producidos por hormonas que también poseen receptores de leptina como la orexina, nuevamente al CART, la hormona concentradora de melanina (MCH), galanina y el AgRP, el cual es un antagonista endógeno del receptor de la melanocortina 3 (MC3-R) y la MC4-R. Uno de los mecanismos de acción descritos es que la leptina actúe a nivel de la sinapsis restaurando la conducción aferente GABAérgica a las neuronas de GnRH en animales en ayuno. Adicionalmente, leptina regula la expresión de kisspeptina (kiss 1) y el péptido parecido a galanina (GALP), que pueden regular la secreción de GnRH, aunque no se sabe si las neuronas que los producen

coexpresan el receptor de leptina o son moduladas indirectamente por neuronas OB-Rb (Adam *et al.*, 2002; Barb y Kraeling, 2004; Brann *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2008; Sánchez, 2005; Williams *et al.*, 2002; Zieba *et al.*, 2005).

Aunque se ha sugerido que la activación del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal por el ayuno, podría ser uno de los mecanismos en que la leptina regule la actividad neuronal de GnRH, el estudio de Nagatani *et al.* (2000) no mostró cambios evidentes en la concentración plasmática de cortisol, en borregos ayunados por 72 horas, a los cuales se les administró leptina sc cada 8 horas en este periodo vs animales control. A pesar de un aumento de cortisol a las 64-72 horas de ayuno, la disminución en la secreción de LH ocurrió desde las 32 horas, por lo que cortisol directamente podría no estar involucrado.

Existe evidencia de que los efectos de leptina requieren de la disponibilidad de combustibles metabólicos, en especial de glucosa; esto indica que debe existir un consenso entre los estados energéticos estático (reservas corporales) y dinámico (consumo), que se ve reflejado por cambios en la secreción de GnRH-LH. En roedores, la leptina puede ser capaz de prevenir los efectos adversos del ayuno sobre la presentación de ciclos estrales, pero estos efectos se pierden si se inhibe la utilización de glucosa con 2DG (Schneider y Zhou, 1999). Desafortunadamente, existe poca información de la concentración de esta hormona y su relación con estados de restricción nutricional en la especie caprina, aunque en bovinos, se ha observado una disminución poco tiempo después de iniciado un ayuno, regresando a sus niveles normales poco después de regresar a su alimentación normal (Chelikani *et al.*, 2004). Se ha sugerido que otras hormonas (en particular insulina) u otras vías podrían actuar de manera coordinada con leptina, estimulando el eje reproductivo (Celi *et al.*, 2006). Es evidente que aún queda mucho por clarificar acerca del papel de leptina en condiciones de restricción alimenticia en la especie caprina, la función que la condición corporal podría estar jugando sobre su secreción y la forma en que se relaciona con otros elementos claves como la glucosa e insulina y su regulación sobre GnRH-LH.

#### 2.5.4 Otros señalizadores

Algunos otros señalizadores involucrados en la regulación de la reproducción son los cuerpos cetónicos y AGNES, cuyas concentraciones aumentan durante el ayuno en diferentes especies incluyendo la caprina (Matsuyama *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004), sin embargo, no existen datos claros de la función que juegan sobre la secreción de LH.

Por todo lo anterior, parecería que más que una hormona o metabolito participan e interactúan para regular el funcionamiento del circuito que controla la secreción de GnRH. La dependencia de la secreción de LH y en consecuencia de la reproducción de una sola hormona o metabolito podría ser riesgoso para cualquier especie, por lo que es lógico pensar que diferentes vías deben estar involucradas entre el estatus nutricional, el metabolismo y el eje reproductivo.

#### 2.6 Leptina y su ritmo circadiano de secreción

Un ritmo es la repetición del valor de un parámetro cada cierto intervalo de tiempo, mientras que un reloj biológico es un sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades del organismo. En los organismos existen diferentes ritmos biológicos que pueden ser clasificados por la longitud de cada ciclo, nombrándose circadianos aquellos con una frecuencia de aproximadamente 24 horas ( $24 \pm 4$  h), los cuales han evolucionado en relación a la duración de la rotación de la Tierra alrededor de su eje. Ya que estos ritmos sólo se aproximan al del ciclo ambiental al cual están sincronizados, se usa el prefijo circa (cerca). Esto ha permitido mejorar la adaptación de un organismo a su entorno y coordinar actividades que sustentan la vida como la alimentación y el dormir, así como la coordinación de mecanismos fisiológicos y bioquímicos complejos (Escandón, 1994; Jud *et al.*, 2005).

Existen ritmos biológicos de duración variable para diversas hormonas como insulina (concentración pico en bovinos a las 17:40 horas; Lefcourt *et al.*, 1999), melatonina (su concentración se eleva durante la noche; Malpoux *et al.*, 2001), leptina (Licinio *et al.*, 1998) y metabolitos como la urea (concentración pico

a las 10:30 horas; Lefcourt *et al.*, 1999). Los ritmos que continúan aun en ausencia de señales externas, se les puede llamar endógenos ya que aparentemente surgen del interior del organismo (Escandón, 1994). El soporte de las oscilaciones lo dan los relojes moleculares endógenos. Aunque un reloj circadiano endógeno funciona en ausencia de las señales externas, periódicamente mide algunas de ellas para sincronizar el tiempo interno y externo bajo condiciones naturales para los ritmos diurnos. Este mecanismo de sincronización se conoce como “entrainment” y la señal ambiental que ajusta los relojes circadianos se conoce como “Zeitgeber”. El Zeitgeber más reconocido es el ciclo diario de luz-oscuridad, con un periodo oscuro o escotofase y uno de luz o fotofase. Los organismos sólo pueden ajustarse a sincronizadores con un periodo cercano a las 24 h; si este es menor o mayor el organismo ya no sigue al Zeitgeber y entrará en lo que se conoce como curso libre, que se presenta cuando los organismos se protegen de claves de tiempo externas (Jud *et al.*, 2005).

La diferencia en tiempo entre el ajuste externo y el ritmo interno mostrado (el inicio de actividad o la concentración pico de una hormona) se conoce como diferencia del ángulo de fase. Aunque la diferencia en el ángulo de fase entre dos ritmos sincronizados generalmente es estable, puede ser afectado por la fuerza del estímulo Zeitgeber aplicado (como la intensidad de luz) (Jud *et al.*, 2005).

Algunos sistemas generadores de los ciclos son la pineal en aves y reptiles, el ganglio cerebral en la polilla, los ojos de la aplisia y el núcleo supraquiasmático (NSQ) en mamíferos (Escandón, 1994).

Leptina como ya se indicó, es una hormona correlacionada de manera significativa con la cantidad de reservas corporales de energía. Su secreción en humanos además de presentar ritmos ultradianos, con pulsos cada 46.7 min (Licinio *et al.*, 1998), sigue un ritmo circadiano con una acrofase (momento de mayor secreción de leptina) poco después de la medianoche (00:00-04:00 hrs). Estos ritmos tuvieron un curso similar en mujeres obesas y aquellas con un peso normal aunque la amplitud y la concentración aumentaron en mujeres obesas

(Langendonk *et al.*, 1998). En mujeres en fase lútea media, la presencia de ritmos circadianos se presentó con acrofases a las 21:30 hrs (Bergendhal *et al.*, 2000).

En otras especies también se han observado ritmos en la secreción de leptina. En perros se observó un ritmo asociado al consumo de alimento, aumentando 5-8 h después de este; los niveles alcanzaron su nivel máximo (10.5 ng/ml) a las 18:00 h y regresaron a sus niveles basales al amanecer del siguiente día (05:00-09:00 h) (Ishioka *et al.*, 2005). En el caso de ratones macho o hembra con alimentación *ad libitum*, estos muestran un ritmo de leptina con un nadir a las 08:00-10:00 hrs y un pico a las 22:00-04:00 hrs (Ahrén, 2000). En ratas, el pico de secreción de leptina se presentó en la transición de luz-oscuridad (Kalsbeek *et al.*, 2001). Como se observa, existe cierta similitud en los ritmos de leptina en humanos y ratones, alcanzando su pico hacia la medianoche; sin embargo, los hábitos son diferentes, ya que los ratones aumentan su actividad en conjunto con sus hábitos alimenticios, durante la noche, por lo que quizá la regulación de esta hormona sea diferente. Es probable también, que exista una estimulación más pronta en la expresión de leptina por insulina en roedores que en humanos (Ahrén, 2000).

Aunque no está claro lo que determina el patrón rítmico de secreción de leptina, se ha sugerido que el consumo de alimento, la insulina y/o los glucocorticoides podrían ser determinantes independientes (Kalsbeek *et al.*, 2001).

El consumo de alimento podría favorecer la presencia de ritmos circadianos. El ayuno puede provocar la pérdida de ritmicidad o alterar algunas características de los ritmos de leptina en diferentes especies: perros (Ishioka *et al.*, 2005), roedores (Ahrén, 2000) y humanos (Wagner *et al.*, 2000). Aunque mujeres en fase lútea media no mostraron una pérdida de ritmicidad de leptina por el ayuno, si tuvieron una caída en la amplitud (mitad de la diferencia entre el valor más alto y el más bajo durante el periodo) y la acrofase (Bergendhal *et al.*, 2000). En mujeres obesas, el aumento en la frecuencia de comidas durante el día, cambió el patrón diurno de secreción de leptina y el perfil de insulina en las 24 horas. Con 8 comidas (una cada 3 horas) vs esquema de 3 (desayuno, comida y cena) se observó que la amplitud en la secreción de leptina disminuyó (6.3 vs 3.0 ug/l) y se

retrasó la acrofase por 168 minutos (01:00 vs 03:48 hrs), aunque no se observaron cambios en el mesor (concentración promedio de leptina). El número de picos posprandiales de insulina fue de 8 vs 3 para esquemas de 8 y 3 comidas respectivamente, mientras que el ritmo en 24 horas para cortisol no fue diferente entre tratamientos (Fogtelloo *et al.*, 2004). Algunos autores han indicado que la elevación nocturna en la secreción de leptina, podría estar relacionada con la supresión del apetito durante el sueño (Sinha *et al.*, 1996). La eliminación de la señal nocturna de consumo en ratas, dando una alimentación de seis raciones en el día, no modificó los ritmos de secreción de leptina, aunque su concentración aumentó (Kalsbeek *et al.*, 2001).

Se ha sugerido también que el consumo de alimento, indirectamente a través de glucosa y/o insulina, cuyas concentraciones se encuentran abatidas en ayuno (Ahrén, 2000; Boden *et al.*, 1996; Marie *et al.*, 2001), podría alterar la presentación de los ritmos circadianos de leptina. Perros ayunados e inyectados sc con insulina (0.1 UI/kg) elevaron los niveles de leptina, aunque en menor medida al nivel observado después de consumir alimento. La administración de glucosa en forma repetida (cada 30 min), que provocó hiperinsulinemia e hiperglicemia no pudo simular la respuesta de leptina al consumo de alimento, por lo que otros factores adicionales podrían contribuir a las variaciones de esta hormona (Ishioka *et al.*, 2005). En roedores que presentaron ritmos circadianos de secreción de leptina, también se ha reportado la asociación entre los niveles de esta hormona y los de insulina ( $r= 0.46-0.63$ ); insulina también mostró un aumento diurno, más temprano que el de leptina (2-8 horas antes), mientras que en glucosa no hubo variación (Ahrén, 2000).

En humanos, se ha reportado una elevación en leptina seis horas después de presentarse una elevación de insulina, existiendo un nadir al mediodía. Ya que leptina no se almacena en los adipocitos, la insulina podría favorecer su síntesis de novo en estas células (Wagner *et al.*, 2000).

Estos ritmos circadianos de secreción de leptina no se han podido demostrar completamente en rumiantes; en carneros Soay, la concentración circulante

durante 48 h no mostró una secreción circadiana, aunque se observaron picos posprandiales de baja amplitud (15-36%) 2-8 h después del consumo (Marie *et al.*, 2001). Daniel *et al.* (2002) tampoco observaron una variación rítmica en la secreción de leptina durante un periodo de 24 horas en ovejas alimentadas, ayunadas y con mayor o menor espesor de grasa subcutánea a la altura de la última costilla.

El primer reporte de la presencia de ritmos circadianos de leptina en rumiantes, se describió para la especie ovina. El pico de secreción de esta hormona se presentó durante las horas de oscuridad y también se observaron ritmos diferenciados durante la gestación y la lactancia. Sin embargo, a diferencia de lo descrito anteriormente, el ayuno durante 50 h en estos animales, no abolió estos ritmos, aunque cambió el pico de secreción al inicio de la fase de luz y disminuyó la producción de esta hormona (Bertolucci *et al.*, 2005).

La escasa evidencia de ritmos circadianos de leptina en la mayoría de los estudios en rumiantes (Daniel *et al.*, 2002; Marie *et al.*, 2001) podría relacionarse a la fisiología digestiva de estas especies, en las cuales el rumen provee de paso constante de alimento para su digestión y/o absorción, lo que no ocurre en especies monogástricas. Esto podría evitar cambios drásticos en las concentraciones de glucosa e insulina, que podrían estimular y favorecer la presentación de estos ritmos diurnos (Daniel *et al.*, 2002). Adicionalmente, como ya se describió, esquemas de consumo *ad libitum* podría estar evitando cambios evidentes en secreción de insulina y en consecuencia de leptina.

Finalmente, es probable que la glándula pineal regule la secreción cíclica de leptina (tal vez por medio de una vía eferente, mediada por el sistema nervioso autónomo que comunique el sistema nervioso central y el tejido adiposo). La ablación termal del núcleo supraquiasmático en ratas, provoca la eliminación de los ritmos de leptina (Kalsbeek *et al.*, 2001).



### **III. HIPÓTESIS**

“La leptina, como indicador biológico de las reservas corporales de energía, actúa como un modulador para determinar el significado funcional de las señales asociadas con la disponibilidad de combustibles metabólicos, determinando el establecimiento de estrategias como lo es el control de la secreción de LH”.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la relación existente entre señales del metabolismo energético dinámico y estático, sobre la secreción de la hormona luteinizante en cabras, como indicador de su actividad reproductiva y su modulación de acuerdo a la etapa del ciclo reproductivo anual.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Caracterizar el patrón de la concentración circulante de leptina, en cabras con diferente condición corporal en diferente época del año.

Analizar las respuestas de señales asociadas al metabolismo energético dinámico y su modulación por el estado energético estático y/o etapa del ciclo reproductivo anual, sobre la regulación de la secreción de hormona luteinizante, como indicador de la función reproductiva de la especie caprina.

Analizar la función de insulina sobre la regulación de la secreción de LH y su modulación por el estado energético estático y/o etapa del ciclo reproductivo anual.

Analizar la función de glucosa sobre la regulación de la secreción de LH y su modulación por el estado energético estático y/o etapa del ciclo reproductivo anual.

SHORT NOTE [NOTA CORTA]

LEPTIN CIRCADIAN RHYTHM EXPRESSION IN GOATS  
WITH DIFFERENT BODY MASS INDEX AND DURING DIFFERENT  
SEASONS

[EXPRESIÓN DEL RÍTMO LEPTINO CIRCADIANO EN CABRAS CON  
DIFERENTE ÍNDICE DE MASA CORPORAL Y DURANTE DIFERENTES  
ÉPOCAS]

M. A. Espinosa-Martínez<sup>1</sup>, H. R. Vera-Avila<sup>2,3\*</sup>, E. González-Padilla<sup>1</sup>, A. Villa-Godoy<sup>1</sup>, E. Villagómez-Amezcu<sup>2,4</sup>, H. Jiménez-Severiano<sup>2,3</sup>, C. A. Mejía-Guadarrama<sup>2,3</sup>, M. Miranda-Anaya<sup>5</sup>, L. Cintra-McGlone<sup>6</sup>

E-mail [vera.hector@inifap.gob.mx](mailto:vera.hector@inifap.gob.mx)

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM. Ciudad Universitaria, Universidad 3000, Circuito Exterior S/N; México, D. F. 04510; MÉXICO.

<sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM. Campo 1-Edificio de Estudios de Posgrado, Av. 1° de mayo S/N; Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. 54700; MEXICO.

<sup>3</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal-INIFAP. Km. 1 Carretera a Colón; Ajuchitlán, Colón, Qro. 76280; MEXICO.

<sup>4</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología-INIFAP. Km. 15.5 Carretera México-Toluca; Cuajimalpa, México, D. F. 0510; MÉXICO.

<sup>5</sup>Facultad de Ciencias-UNAM. Ciudad Universitaria, Universidad 3000, Circuito Exterior S/N; México, D. F. 04510; MÉXICO.

<sup>6</sup>Instituto de Neurobiología-UNAM. Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001; Juriquilla, Querétaro, 76230; MÉXICO.

\*Corresponding Author

SUMMARY

The objective was to determine if serum leptin expresses a circadian rhythm in goats, and the effect of body mass index (BMI) and season of the year on such expression. Eight mature, ovariectomized, female goats with s.c. silyastic implants containing 17 $\beta$ -estradiol were maintained in a high (HBMI, n=4) or low (LBMI, n=4) BMI during the breeding (BS-december, n=8) and transition into anestrus (TS-february, n=8) seasons. Blood samples were obtained every hour throughout a 48 h period and serum leptin determined (Linco Res. Inc.). Results were analyzed by COSINOR program (fit of data to a cosine curve) obtaining the MESOR (mean leptin concentration), AMPLITUDE (half difference between highest and lowest leptin concentration) and ACROPHASE (time of highest leptin concentration). Frequency of occurrence of a circadian rhythm was analyzed by Fisher's exact test. A leptin circadian rhythm was evident (P<0.10) in 5/8 goats. BMI tended to influence the expression of leptin circadian rhythms (P=0.13); 50% (4/8) vs. 12.5% (1/8) of goats w/leptin circadian rhythm in HBMI vs. LBMI. Season did not affect (P=0.36) the expression of leptin circadian rhythm; 37.5% (3/8) and 25% (2/8) goats w/leptin circadian rhythm in BS and TS. Goats w/leptin circadian rhythm showed a diurnal ACROPHASE between 11:30 to

15:30 h. Frequency of leptin circadian rhythm in TS was low and similar in BMI groups (1/4 for HBMI and LBMI). There was a differential response between BMI groups during the BS with HBMI goats showing the highest frequency of leptin circadian rhythm (3/4 and 0/4 for HBMI and LBMI, P<0.001). The LBMI group had higher MESOR (P<0.05) and basal leptin concentrations (1.9 vs. 1.4 and 1.2 vs. 0.5 ng/ml in LBMI vs. HBMI). There were no differences (P>0.05) in AMPLITUDE for any effect or their interaction. Evidence of a serum leptin circadian rhythm in female goats, with a diurnal increase in serum leptin was found and reported for the first time. Moreover, an effect of interaction between BMI and season in the expression of such rhythm was observed. Studies involving serum leptin in goats should take into account its circadian variation; otherwise under- or over-estimations might occur.

**Key words:** Goats, leptin, circadian rhythm.

INTRODUCTION

Leptin is a hormone secreted mainly by adipocytes and has a role on energy metabolism and mammalian reproduction (Brann *et al.*, 2002). Circulating level of leptin may be a useful adiposity index of an individual; however, this advantage can be lost because of its variation throughout the day. Leptin circadian rhythms

or diurnal variations had been described in nonruminant species (Ahrén, 2000, mice; Downs y Urbanski, 2006, monkeys; Ishioka *et al.*, 2005, dogs); however, in ruminants published data are contradictory (Bertolucci *et al.*, 2005; Marie *et al.*, 2001; Daniel *et al.*, 2002), and there is not available information for goats. In addition, leptin circulating level can be different upon the seasons of the year (Marie *et al.*, 2001), but the association between both, season of the year and body energy status has not been reported. Thus, the objective of this paper was to determine whether serum leptin concentrations show a circadian rhythm in female goats and evaluate the effect of the body mass index and season of the year on the expression of such rhythm.

## MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in the State of Queretaro México (20° 42' N, 100° 01' W). Eight mature, ovariectomized creole goats, with subcutaneous silastic implants containing 17 $\beta$ -estradiol were used. Goats were individually fed to maintain a body mass index (BMI), either high (HBMI  $\geq 10$ ; n=4) or low (LBMI  $\leq 9.5$ ; n=4). A food ration containing 14.1% of crude protein and 2.5 Mcal of metabolizable energy/kg of dry matter was offered daily at 08:00 h. Water was always available throughout the study.

During the breeding season (BS, December, n=8) and transition into the anestrus season (TS, February, n=8), blood samples were obtained in both BMI groups at 1 h intervals for a 48 h-period, to determine serum leptin concentration. Blood samples were maintained at 4°C until centrifugation (3000 rpm x 15 min). Serum samples obtained were maintained at -20°C until they were assayed for leptin concentrations by radioimmunoassay, using a multispecies kit (Linco Research, St. Charles MO, USA). The assay sensitivity was 0.34 ng/ml and the intra- and interassay

coefficients of variation were 6.3 and 7.4%, respectively. Data were analyzed to determine the presence of serum leptin circadian rhythms, using the COSINOR program, which test the fit of data to a cosine curve, obtaining the MESOR (mean leptin concentration), AMPLITUDE (half difference between highest and lowest leptin concentration) and ACROPHASE (time of highest leptin concentration). Basal leptin concentrations were also obtained.

The incidence of serum leptin circadian rhythms between groups was analyzed by Fisher's exact test. Mean leptin, amplitude and basal level were analyzed by ANOVA, using a split-plot design, including in the model the BMI as the whole-plot and season and the interaction of BMI by season as the subplot.

## RESULTS

The COSINOR analysis showed evidence of the expression of a circadian rhythm ( $P < 0.10$ ) in serum leptin levels in five of the animals. The BMI tended ( $P = 0.13$ ) to affect the expression of circadian rhythms; incidence was higher in animals in the HBMI group vs LBMI (Table 1). Goats expressing a leptin circadian rhythm showed a diurnal acrophase between 11:30 and 15:30 h. There was a different response ( $P < 0.001$ ) between the groups of BMI during the reproductive season (Table 2); the goats in the HBMI group had a higher frequency of circadian rhythms (75%, 3 out of 4 goats) vs LBMI group (0%, 0 out of 4 goats); however, during the transition into anestrus season, the frequency was similar for both BMI groups (25%, 1 out of 4 goats). The LBMI group had a higher mean (MESOR) and basal concentration of leptin as compared with the HBMI group, with no differences due to season or the interaction of BMI x season (Table 3). There were no effects of any factor or their interaction ( $P > 0.05$ ) on leptin COSINOR amplitude.

Table 1. Leptin circadian rhythms in female goats with different body mass index, during different seasons of the year.

	Body mass index <sup>a</sup>		Season of the year <sup>b</sup>	
	Low	High	Reproductive	Transition into anestrus
% goats w/circadian rhythm	12.5 (1/8)	50 (4/8)	37.5 (3/8)	25 (2/8)

<sup>a</sup>P= 0.13 HBMI vs LBMI <sup>b</sup>P= 0.36 Reproductive vs Transition

Table 2. Leptin circadian rhythms in goats with different body mass index, during different seasons of the year ( $P < 0.001$ ).

	HBMI-BS	LBM-BS	HBMI-TS	LBMI-TS
% goats w/circadian rhythm	75 (3/4)	0 (0/4)	25 (1/4)	25 (1/4)

HBMI= High body mass index; BS= Breeding season

LBMI= Low body mass index; TS= Transition into anestrus season

Table 3. Leptin Mesor, Amplitude and serum basal concentrations in goats with different body mass index, during different seasons of the year.

	BODY MASS INDEX		SEASON OF THE YEAR		BMI X SEASON
	Low	High	Reproductive	Transition	P
Leptin, Mesor (ng/ml)	1.94±0.16*	1.43±0.16*	1.78±0.16	1.59±0.16	0.31
Leptin, Amplitude (ng/ml)	0.20±0.08	0.32±0.08	0.21±0.08	0.30±0.08	0.26
Leptin, Basal (ng/ml)	1.24±0.21**	0.52±0.22**	1.15±0.22	0.61±0.22	0.25

\*P&lt;0.05 Low vs High \*\*P&lt;0.01 Low vs High

## DISCUSSION

Some goats in this study showed serum leptin circadian rhythms, as has been described for other species (Bertolucci *et al.*, 2005, ewes; Downs y Urbanski, 2006, monkeys). In ruminants, the contradictory results observed can be related to the feeding regime and hence the postprandial insulin secretion; *ad libitum* or frequent feeding (Daniel *et al.*, 2002) could be factors which cause failures in detecting leptin circadian rhythms as has been reported in human beings (decrease in amplitude and a delay in the acrophase; Fogteloo *et al.*, 2004). The higher amount of food provided only once a day to animals in HBMI group as compared to LBMI group, could also cause a higher insulin and leptin postprandial increases with enhanced leptin amplitude and expression of circadian rhythm. In the present study, leptin amplitude in the HBMI group was higher than the LBMI group; however, the difference was not significant. The higher frequency of goats expressing leptin circadian rhythms in the HBMI-BS group, may suggest a relationship between leptin levels and the reproductive status associated with different seasons (Marie *et al.*, 2001). In goats which showed a leptin circadian rhythm, the leptin acrophase occurred after the feeding time in a similar way as reported in other species (Marie *et al.*, 2001; Ishioka *et al.*, 2005), suggesting a similar stimulation pathway to raise circulating leptin in these species. The greater mean and basal concentrations of leptin in the LBMI group, as compared with the HBMI group, could reflect a higher metabolic load induced by more food intake, and hence a greater clearance rate in the HBMI group, as has been suggested for other hormones (Vasconcelos *et al.*, 2003). Although goats in the LBMI group were in a poor body condition and hence had scarce subcutaneous fat, serum leptin concentrations did not reflect their extent of body fat, but instead maybe reflected their metabolic status associated with the low food intake, as has been suggested for fasting conditions in lambs (Altmann *et al.*, 2006).

## CONCLUSION

This study indicates for the first time, that goats as other species, can express a serum leptin circadian

rhythm but with a diurnal increase, and that this rhythm might be associated to food intake. Energy reserves (BMI) interacting with season can influence the expression of such rhythm. Studies involving serum leptin in goats, should take into account its circadian variation in order to avoid misleading results and conclusions.

## REFERENCES

- Ahrén, B., 2000. Diurnal variation in circulating leptin is dependent on gender, food intake and circulating insulin in mice. *Acta Physiol. Scand.* (169), 325-331.
- Altmann, M., H. Sauerwein, E von Borell., 2006. The relationship between leptin concentrations and body fat reserves in lambs are reduced by short-term fasting. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* (90), 407-413.
- Bertolucci, C., G. Caola, A. Foà, G. Piccione. 2005. Daily rhythms of serum leptin in ewes: effects of feeding, pregnancy and lactation. *Chronobiol Int.* (22), 817-827.
- Brann, D. W., Wade, M. F., Dhandapani, K. M., Mahesh V. D., Buchanan, C. D., 2002. Leptin and Reproduction. *Steroids.* (67), 95-104.
- Daniel, J. A., Whitlock, B. K., Baker, J. A., Steele, B., Morrison, C. D., Keisler, D.H., Sartin, J. L. 2002. Effect of body fat mass and nutritional status on 24-hour leptin profiles in ewes. *J. Anim. Sci.* (80), 1083-1089.
- Downs J. L., Urbanski, H. F. 2006. Aging-related sex-dependent loss of the circulating leptin 24-h rhythm in the rhesus monkey. *J. Endocrinol.* (190), 117-127.
- Ishioka, K., Hatai, H., Komabayashi, K., Soliman, M. M., Shibata, H., Honjoh, T., Kimura, K., Saito, M. 2005. Diurnal variations of serum leptin in dogs: effects of fasting and refeeding. *The Vet. J.* (169), 85-90.

- Fogtelo, A. J., Roelfsema, P. H., Frölich, M., Meinders, A. M. 2004. Impact of meal timing and frequency on the twenty-four-hour leptin rhythm. *Horm. Res.* (62), 71-78.
- Marie, M., Findlay, P. A., Thomas, L., Adam, C. L., 2001. Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. *J. Endocrin.* (170), 277-286.
- Vasconcelos, J. L., Sangsritavong, S., Tsai, S.J., Wiltbank, M.C. 2003. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology.* (60), 795-807.

*Submitted July 15, 2008 – Accepted January 14, 2009*

## **VI.CONSUMO DE ALIMENTO COMO REGULADOR DE LAS CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE METABOLITOS, DE LA HORMONA LUTEINIZANTE Y HORMONAS METABÓLICAS**

### **6.1 INTRODUCCIÓN**

En diversas especies, incluyendo los rumiantes domésticos, la nutrición tiene diversos efectos sobre su reproducción (Perry *et al.*, 1991; Schillo, 1992). Se acepta que la vía principal es a través de la regulación de la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas hipotalámica (GnRH)-Hormona Luteinizante hipofisaria (LH). Sin embargo, el estado energético de un animal puede modular la respuesta en esta actividad reproductiva. Condiciones de ayuno o de restricción alimenticia en especies rumiantes como la ovina, bovina y caprina provoca una disminución en la frecuencia pulsátil de LH (Matsuyama *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2002), aunque el mecanismo fisiológico por el que se comunica el estado energético (dinámico o estático) de un individuo para regular esta secreción de GnRH-LH no se conoce completamente.

Se ha sugerido que diversas hormonas como leptina, insulina, glucosa y metabolitos como glucosa y algunos aminoácidos podrían actuar como mediadores de la nutrición sobre la reproducción en rumiantes (Bucholtz *et al.*, 1996; Ohkura *et al.*, 2004; Schneider y Zhou, 1999; Tanaka *et al.*, 2002;). En el caso de la especie caprina, la cual presenta una reproducción de tipo estacional, su función reproductiva puede presentar menor sensibilidad a señales nutricionales en plena época reproductiva, mientras que en periodos de transición ocurre lo contrario (Estrada *et al.*, 2005; Mani *et al.*, 1996;). De esta manera, las cabras podrían servir como un modelo para comparar etapas de actividad reproductiva (plena época reproductiva vs épocas de transición) y estudiar su relación con las señales metabólicas.

Por lo anterior, este estudio tuvo como propósito analizar respuestas de señales derivadas de un estado posprandial y su modulación por un estado energético estático (IMC) y/o diferente etapa del ciclo reproductivo, sobre la regulación de la hormona luteinizante en cabras.

## **6.2 HIPÓTESIS**

“Señales asociadas a un estado posprandial cambian en función del estado energético estático y/o la etapa de la estación reproductiva anual, afectando de manera diferente la secreción de LH”

## **6.3 OBJETIVOS**

Analizar las respuestas de señales asociadas al metabolismo energético dinámico (alimentación) y su modulación por el estado energético estático (IMC) y/o etapa del ciclo reproductivo anual, sobre la regulación de la secreción de hormona luteinizante, como indicador de la función reproductiva de la especie caprina

## **6.4 MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio fue realizado en instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias ubicadas en el km 3 de la carretera Ajuchitlán-Colón, municipio de Colón en Querétaro. Las coordenadas geográficas del sitio son 20° 47' de latitud norte, 100° 03' de longitud oeste. El clima de la región es semiseco, con lluvias en verano; existe una temperatura promedio anual de 15°C y una precipitación pluvial anual de 500-600 mm (INEGI, 2000).

Se utilizaron 12 cabras criollas adultas ovariectomizadas a las que previamente se les había insertado implantes de 12 mm de longitud (tubo sylastic 0.132 cm d.i. y 0.183 d.e., Dow Corning Corp., Midland, MI) conteniendo 17β-estradiol (Sigma, St. Louis, MO). A través de los implantes se buscó obtener concentraciones circulantes de estrógenos similares a las observadas durante la fase lútea del ciclo estral en cabras. Previo a su colocación, los implantes se incubaron a 37°C en solución salina fisiológica para evitar un pico inicial en la liberación del esteroide.

Las cabras fueron alimentadas de manera individual para obtener dos grupos de índice de masa corporal (IMC): alto (IMCA  $\geq$ 10.0; n=6) o bajo (IMCB

$\leq 9.5$ ;  $n=6$ ). Para el cálculo del IMC se utilizó la fórmula:  $\text{IMC} = \frac{\text{Peso vivo (kg)}}{(\text{altura a la cruz en cm}/2 \times \text{largo del cuerpo en cm} \times \text{ancho de la cadera en cm})} \times 10000$ . Una vez obtenido el IMC deseado, las cabras se mantuvieron en esa condición, ajustando semanalmente la ración de alimento en base al peso corporal. Las raciones de alimento se ofrecieron a los animales de manera individual una sola vez al día (08:00 h). El agua se ofreció a libre acceso durante todo el estudio.

En los animales de ambos grupos de IMC y en la época reproductiva (diciembre) y de transición al anestro (febrero-marzo), se obtuvieron muestras sanguíneas cada 15 min, durante 6 horas iniciando inmediatamente antes del ofrecimiento del alimento (estado posprandial) y en el mismo horario después de someter a las cabras a un ayuno de 72 h. Doce horas antes de iniciar el muestreo se insertaron catéteres en la yugular (18g y long. de 30.5 cm, Luer Lock), que fueron mantenidos con heparina diluida en solución de cloruro de sodio al 0.9% (50 UI de heparina/ml). Previo a los muestreos se adosaron tubos de tygon a los catéteres para permitir el muestreo a distancia y evitar al máximo la manipulación y el estrés de las cabras.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales durante todo el periodo de muestreo. Se transfirieron alícuotas de las muestras obtenidas a tubos vacutainer que se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento para obtención del suero, el cual fue almacenado a -20 °C hasta su análisis en laboratorio (leptina, insulina, ácidos grasos no esterificados y urea). Una de las alícuotas se transfirió a tubos vacutainer que contenían oxalato y fluoruro de sodio (cuyo plasma se analizó para glucosa) y una más se depositó en tubos con EDTA (plasma para análisis de glucagón).

En las muestras obtenidas cada 15 minutos se determinó la concentración sérica de LH. En las muestras obtenidas a los -10, 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 y 360 minutos, se determinaron las concentraciones de leptina, insulina, glucagón, glucosa, urea y ácidos grasos no esterificados (AGNE). Los resultados



de las muestras de los tiempos -10 y 0 fueron promediados para obtener la concentración basal de cada una de las hormonas y metabolitos considerados.

Para el análisis de leptina y glucagón, se emplearon kits comerciales (Linco Research Inc.). Para leptina, el límite de detección fue de 0.49 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 6.2% y 8.1%, respectivamente. Para glucagón el límite de detección fue de 24.8 pg/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 1.72% y 6.74%, respectivamente.

La determinación de la concentración de insulina, se hizo mediante RIA de fase líquida empleando un antisuero policlonal antiinsulina humana producido en cobayo. La cantidad de muestra requerida fue de 100  $\mu$ l y el análisis fue elaborado en réplica. La sensibilidad del ensayo fue de 0.016 ng/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 5.8 y 12.5%, respectivamente.

Las concentraciones de glucosa, urea y ácidos grasos no esterificados se determinaron cuantitativamente mediante análisis enzimáticos. Para ello se utilizaron estuches comerciales (Glucose HK assay kit; Sigma<sup>®</sup>, St Louis MO; Urea Randox Lab. LTD Antrim UK; Free Fatty Acids, Half-micro test, Roche, Penzberg Germany) y las determinación fotométricas se realizaron en un fotómetro de microplacas (Multiscan<sup>®</sup> RC, Labsystems).

Para la determinación de hormona luteinizante, se utilizó un RIA heterólogo en fase líquida mediante la técnica de doble anticuerpo. La hormona utilizada como referencia en la curva patrón fue la USDA-bLH-B5 (AFP-5500) y para la marcación con I<sup>125</sup>, fue la USD-bLH-I-1 (AFP-6000). Como primer anticuerpo se utilizó un suero de conejo anti-LH ovina (CSU-204, producido por GD Niswender). El límite de detección fue de 0.019 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fue de 12.02 y 12.37%, respectivamente.

A partir de las concentraciones plasmáticas de LH se caracterizó el patrón pulsátil de esta hormona mediante el programa PULSAR. Para esta hormona las variables analizadas fueron: la concentración promedio, concentración basal, frecuencia pulsátil y amplitud de los pulsos.

Para el análisis estadístico de la frecuencia de pulsos de LH, concentración basal y amplitud de pulsos de LH y empleando los promedios para las diferentes hormonas (LH, leptina, insulina, glucagón) y metabolitos (glucosa, urea, ácidos grasos no esterificados y relación insulina:glucagón), se utilizó un diseño de parcelas divididas, incluyendo al índice de masa corporal (bajo o alto) como parcela grande y como efecto de sub-parcela al estado de alimentación (posprandial o ayuno) y la etapa de la época reproductiva (reproductiva o transición al anestro), además de sus diferentes interacciones. Los datos de la frecuencia de pulsos de LH fueron transformados (raíz cuadrada de  $y + 0.5$ ) para su análisis estadístico. El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y = \mu + M_i + \text{anim}(M) + A_j + (M^*A)_{ij} + E_k + (M^*E)_{ik} + (A^*E)_{jk} + E_{ijk}$$

Donde:

Y= Variable de respuesta

$\mu$ = Media general

$M_i$ = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento de índice de masa corporal (parcela grande, donde  $i$ = Alto o Bajo)

$\text{Anim}(M)$ = Error asociado a la parcela grande

$A_j$ = Efecto asociado al  $j$ -ésimo tratamiento de estado de alimentación (donde  $j$ = alimentación o ayuno)

$(M^*A)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el índice de masa corporal y el estado de alimentación

$E_k$ = Efecto del  $k$ -ésimo tratamiento de época del año (donde  $j$ = época reproductiva o transición al anestro)

$(M^*E)_{ik}$ = Efecto de la interacción entre el índice de masa corporal y la época del año

$(A^*E)_{jk}$ = Efecto de la interacción entre el estado de alimentación y la época del año

$E_{ijkl}$ = Error experimental

Posteriormente los promedios de las variables hormonales (excepto hormona luteinizante) y metabolitos, se analizaron en dos periodos diferentes (ayuno y posprandio), considerando al factor tiempo en el modelo:

$$Y = \mu + M_i + \text{anim}(M) + E_j + (M^*E)_{ij} + T_k + (M^*T)_{ik} + (E^*T)_{jk} + E_{ijk}$$

Donde:

Y= Variable de respuesta

$\mu$ = Media general

$M_i$ = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento de índice de masa corporal (parcela grande, donde  $i$ = Alto o Bajo)

$\text{Anim}(M)$ = Error asociado a la parcela grande

$E_j$ = Efecto del  $j$ -ésimo tratamiento de época del año (donde  $j$ = época reproductiva o transición al anestro)

$(M^*E)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el índice de masa corporal y la época del año

$T_k$ = Efecto del  $k$ -ésimo tiempo de muestreo (donde  $k$ = 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 ó 360 min)

$(M^*T)_{ik}$ = Efecto de la interacción entre el índice de masa corporal y el tiempo de muestreo

$(E^*T)_{jk}$ = Efecto de la interacción entre la época del año y el tiempo de muestreo

$E_{ijk}$ = Error experimental

## 6.5 RESULTADOS

Inicialmente, se describen los efectos de los tres diferentes factores estudiados (Índice de Masa Corporal, Alimentación y Época), además de incluir solamente sus interacciones dobles sobre las diferentes variables analizadas (Cuadro 1).

Un indicador altamente confiable de la actividad reproductiva en las especies rumiantes es la secreción de hormona luteinizante. En términos generales, el estado de alimentación por si solo o en interacción con la época provocó diferencias en algunas de las variables asociadas a esta hormona. Esta interacción muestra una mayor amplitud de pulsos sólo durante la época de transición en animales en estado posprandial vs en estado de ayuno (Gráfica 1).

**Cuadro 1. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, alimentación, época y sus interacciones dobles sobre hormonas y metabolitos**

	IMC	Alimentación	Época	IMCxALI	IMCxEPO	ALIxEPO
LH Pulsos	<b>0.021</b>	<b>0.046</b>	0.7337	0.649	0.258	0.663
LH Amplitud	0.551	<b>0.028</b>	<b>0.036</b>	0.232	0.645	<b>0.047</b>
LH Promedio	0.112	0.162	<b>0.005</b>	0.949	0.205	0.276
LH Basal	0.111	0.356	<b>0.006</b>	0.976	0.161	0.538
Leptina	<b>0.095</b>	<b>0.026</b>	0.215	0.417	0.529	<b>&lt;0.001</b>
Insulina	0.397	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.210	0.210	<b>&lt;0.001</b>
Glucosa	<b>0.014</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.703	<b>0.095</b>	0.111	<b>0.004</b>
Glucagón	<b>0.031</b>	<b>0.035</b>	<b>0.009</b>	0.321	0.568	0.472
Insulina:Glucagón	0.130	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.095</b>	<b>0.097</b>	<b>&lt;0.001</b>
Urea	0.136	<b>0.002</b>	0.568	0.442	0.865	0.535
AGNE	<b>0.095</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.083</b>	<b>0.094</b>	0.374	0.715
IMC	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.14	1.00	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>

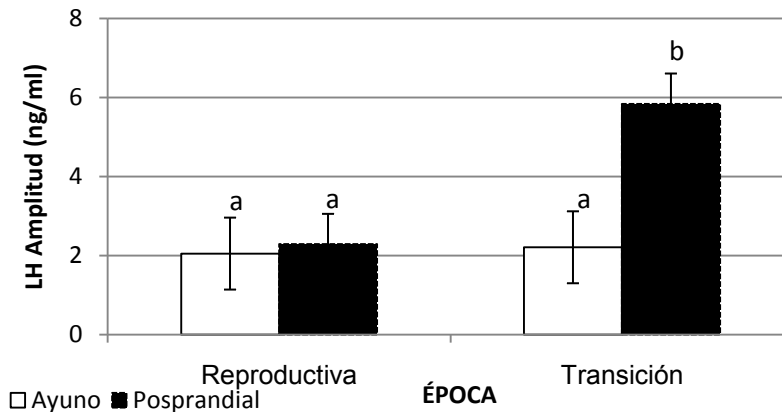
IMC= índice de masa corporal; ALI= Alimentación; EPO= Época

Directamente, la alimentación provocó que aquellos animales en estado posprandial mostraran una mayor frecuencia de pulsos y una mayor amplitud en comparación a las cabras en estado de ayuno. La época también causó cambios en amplitud de pulsos y concentración promedio y basal de LH, presentando mayores valores las cabras durante la transición al anestro vs la época reproductiva. El IMC corporal afectó la frecuencia de pulsos, siendo mayor esta frecuencia en animales con un IMCA vs IMCB. Este factor no modificó ninguna otra variable ya sea solo o en interacción con alguno adicional (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Valores promedio de las diferentes hormonas y metabolitos de acuerdo al índice de masa corporal, alimentación y época (medias mínimo cuadráticas)**

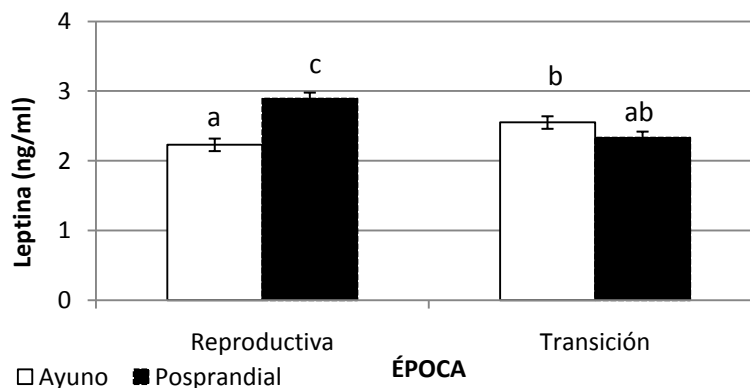
	Índice de masa corporal		Alimentación		Época	
	IMCA	IMCB	Ayuno	Alimentación	Reproductiva	Transición
LH Pulsos/6h	3.92±0.56 <sup>a</sup>	1.62±0.56 <sup>b</sup>	2.33±0.33 <sup>a</sup>	3.21±0.33 <sup>b</sup>	2.79±0.33	2.75±0.33
LH Amplitud (ng/ml)	3.40±0.54	2.80±0.80	2.13±0.67 <sup>a</sup>	4.07±0.54 <sup>b</sup>	2.17±0.57 <sup>a</sup>	4.02±0.65 <sup>b</sup>
LH Promedio (ng/ml)	3.20±0.69	1.51±0.69	2.08±0.28	2.64±0.28	1.77±0.28 <sup>a</sup>	2.94±0.28 <sup>b</sup>
LH Basal (ng/ml)	2.67±0.61	1.15±0.61	1.76±0.23	2.06±0.23	1.44±0.23 <sup>a</sup>	2.39±0.23 <sup>b</sup>
Leptina (ng/ml)	2.30±0.15 <sup>a</sup>	2.70±0.15 <sup>b</sup>	2.39±0.07 <sup>a</sup>	2.61±0.07 <sup>b</sup>	2.56±0.07	2.44±0.07
Insulina (ng/ml)	0.54±0.09	0.65±0.09	0.10±0.10 <sup>a</sup>	1.09±0.10 <sup>b</sup>	0.13±0.10 <sup>a</sup>	1.05±0.10 <sup>b</sup>
Glucosa (mg/dl)	63.55±1.21 <sup>a</sup>	58.85±1.12 <sup>b</sup>	56.36±1.19 <sup>a</sup>	66.03±1.19 <sup>b</sup>	61.52±1.19	60.87±1.19
Glucagón (pg/ml)	70.58±5.78 <sup>a</sup>	50.06±5.78 <sup>b</sup>	64.76±2.86 <sup>a</sup>	55.88±2.86 <sup>b</sup>	65.94±2.86 <sup>a</sup>	54.70±2.86 <sup>b</sup>
Insulina:Glucagón	9.69±2.78	16.18±2.78	2.00±2.94 <sup>a</sup>	23.87±2.94 <sup>b</sup>	2.35±2.94 <sup>a</sup>	23.51±2.94 <sup>b</sup>
Urea (mg/dl)	62.59±3.93	53.58±3.93	64.50±2.75 <sup>a</sup>	51.67±2.75 <sup>b</sup>	59.21±2.75	56.97±2.75
AGNE (mM)	0.63±0.05 <sup>a</sup>	0.50±0.05 <sup>b</sup>	0.98±0.03 <sup>a</sup>	0.16±0.03 <sup>b</sup>	0.61±0.03 <sup>a</sup>	0.53±0.03 <sup>b</sup>

Diferente literal entre grupos de un mismo factor indica diferencia estadística significativa (Ver cuadro 1).  
IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo.

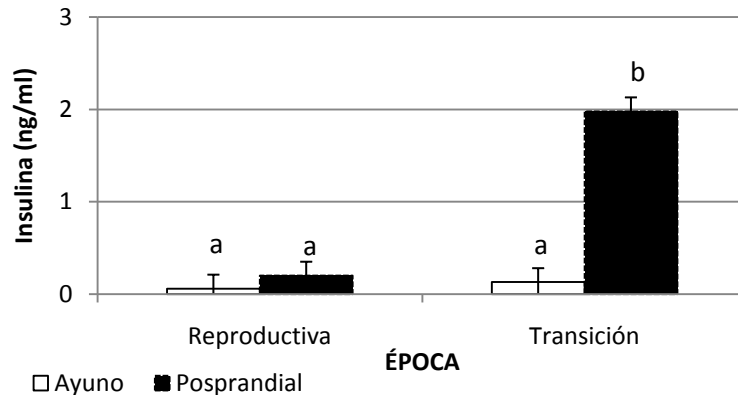


**Gráfica 1. Amplitud de pulsos de LH en cabras en ayuno y posprandio durante la época reproductiva y en transición al anestro (P=0.047)**

La importancia del estado de alimentación y la influencia que puede tener la época sobre estas respuestas también se refleja en hormonas metabólicas que fueron estudiadas como leptina, insulina y la relación insulina:glucagón (Cuadro 1). Para el caso de las dos primeras variables, los resultados muestran un comportamiento diferente; mientras que leptina sólo fue modificada durante la época reproductiva entre animales en ayuno o en estado posprandial, insulina sólo lo hace durante la época de transición para estos mismos grupos (Gráfica 2 y 3). Leptina también fue modificada por el IMC, siendo mayor su concentración plasmática en el grupo con un IMCB vs IMCA (Cuadro 2).

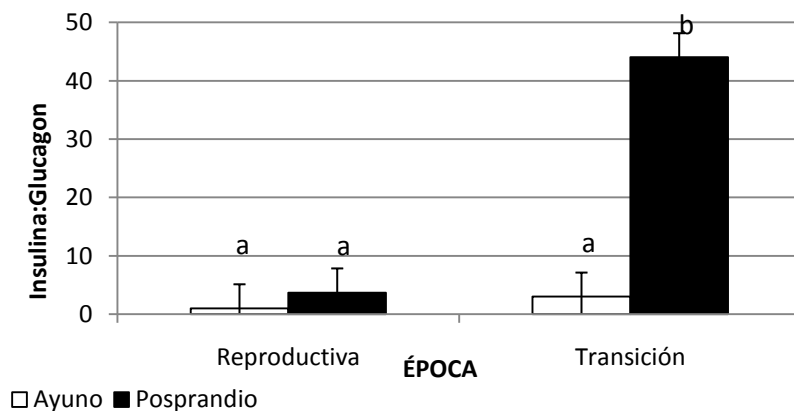


**Gráfica 2. Concentración sérica de leptina en cabras en ayuno y posprandio durante la época reproductiva y en transición al anestro (P<0.001)**

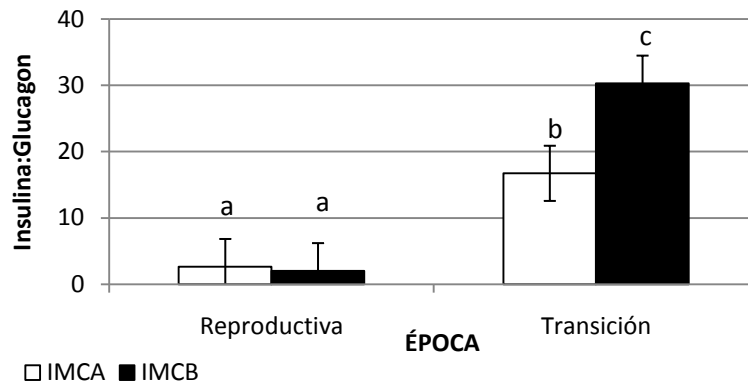


**Gráfica 3. Concentración sérica de insulina en cabras en ayuno y posprandio, durante la época reproductiva y en transición al anestro (P<0.001)**

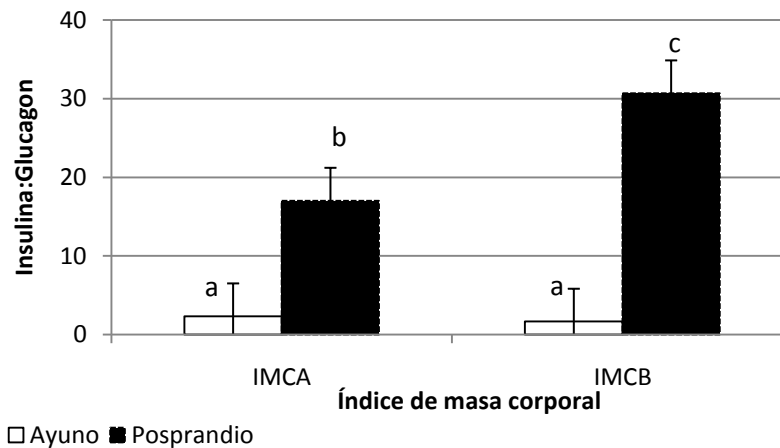
La relación entre insulina y glucagón también fue modificada por la interacción entre el estado de alimentación y la época. Mientras que en la época reproductiva no se observaron cambios en esta relación, en la época de transición la relación fue mayor en animales en estado posprandial (Gráfica 4). Esta relación entre estas dos hormonas fue afectada en menor grado por las dos interacciones restantes. Sólo la época de transición mostró diferencias entre ambos grupos de IMC; la mayor concentración se observó en el grupo con un IMCB vs IMCA (Gráfica 5). Por otro lado, la relación fue mayor en los grupos en estado posprandial vs ayuno sin importar el IMC; sin embargo, la diferencia entre ambos estados de alimentación fue mayor para los animales con un IMCB (Gráfica 6).



**Gráfica 4. Relación Insulina:Glucagón en cabras durante el ayuno y posprandio en diferente época (P<0.001)**



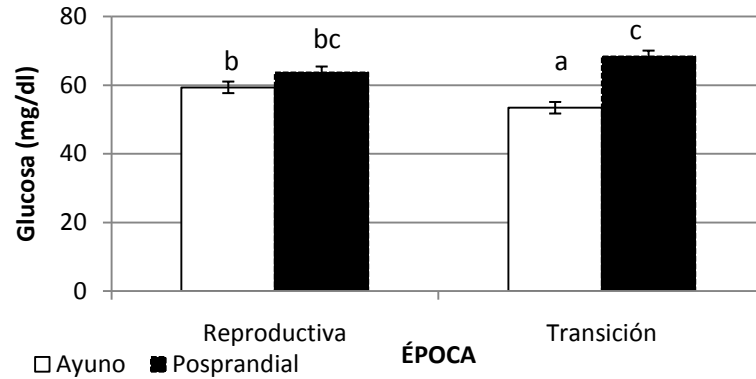
**Gráfica 5. Relación Insulina:Glucagón en cabras con diferente índice de masa corporal, durante la época reproductiva y de transición al anestro (P=0.097). IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo**



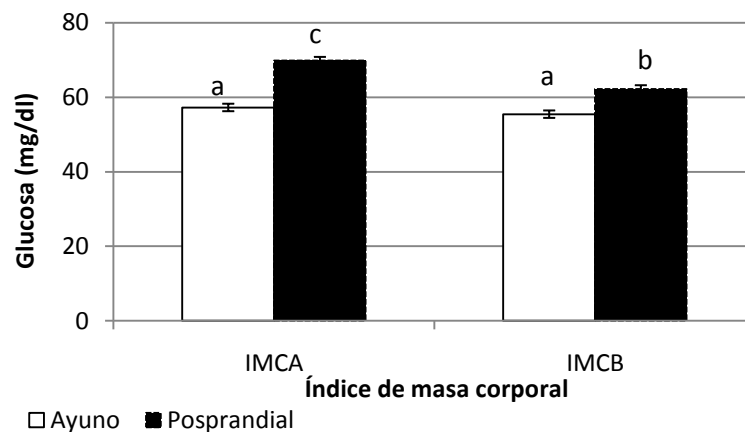
**Gráfica 6. Relación Insulina:Glucagón en cabras con diferente índice de masa corporal, durante el ayuno y posprandio (P=0.095) IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo**

Los diferentes metabolitos estudiados fueron afectados también por el estado de alimentación. Además, la interacción entre el estado de alimentación y la época afectaron las concentraciones de glucosa. La interacción entre el estado de alimentación y el IMC afectó la concentración de glucosa y los ácidos grasos no esterificados (Cuadro 1). Sólo durante la época de transición existió una diferencia en la concentración plasmática de glucosa entre animales en estado posprandial vs ayuno, siendo mayor en el grupo alimentado (Gráfica 7). Por otro lado, en el caso de la interacción entre el IMC y la Alimentación, aunque existieron mayores

concentraciones de glucosa durante el estado posprandial vs ayuno, la diferencia entre ambos grupos fue mayor para cabras con un IMCA vs IMCB (Gráfica 8).



**Gráfica 7. Concentración sérica de glucosa en cabras en ayuno y posprandio, durante la época reproductiva y en transición al anestro (P=0.004)**

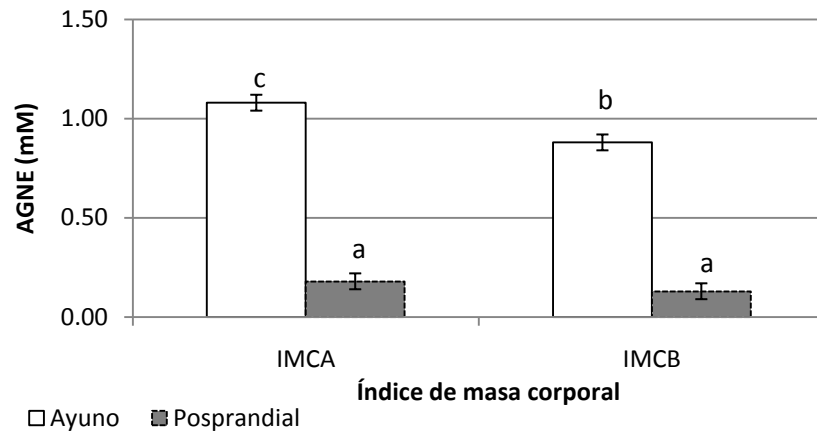


**Gráfica 8. Concentración sérica de glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal, en ayuno y posprandio (P=0.095)**  
**IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo**

Al igual que la relación insulina:glucagón y glucosa, la interacción entre el IMC y el estado de alimentación provocó cambios en la magnitud de la diferencia en la concentración sérica de AGNE entre animales en estado de ayuno y estado posprandial. Esta diferencia entre grupos fue mayor en animales con un IMCA vs IMCB (Gráfica 9). La época también modificó las concentraciones séricas de este



metabolito, siendo mayor la concentración en época reproductiva vs época de transición al anestro (Cuadro 2).

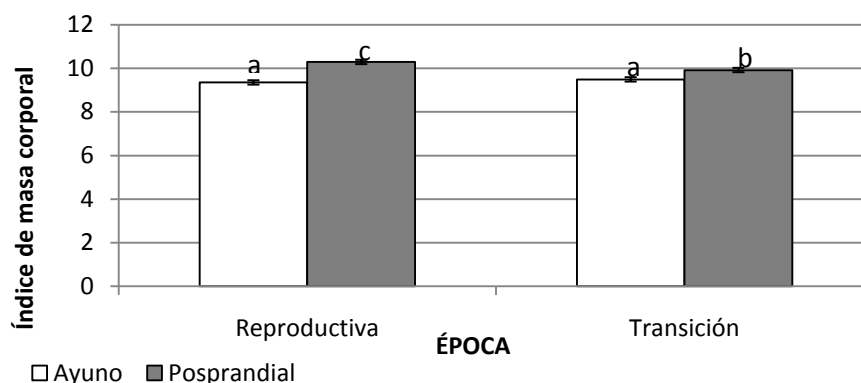


**Gráfica 9. Concentración sérica de ácidos grasos no esterificados en cabras con diferente índice de masa corporal, en ayuno y posprandial (P=0.094)**  
**IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo**

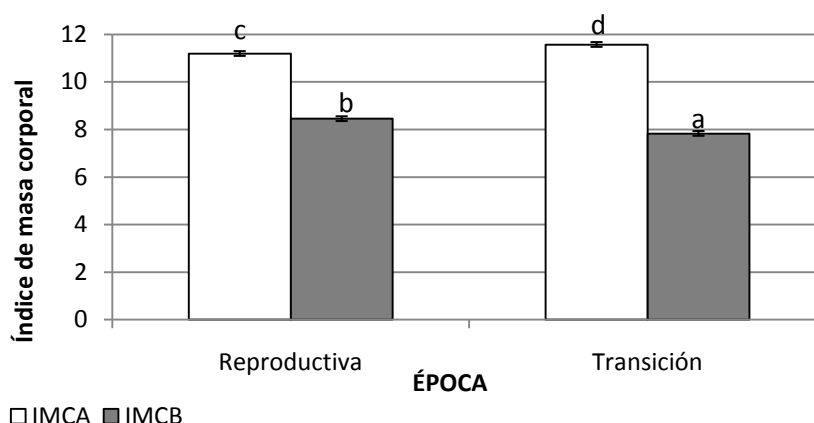
Urea, un producto de la degradación de proteína muscular, sólo fue modificada por el factor Alimentación; la mayor concentración sérica se presentó en animales en estado de ayuno vs estado de transición (Cuadro 2).

Un estimador objetivo de la cantidad de reservas corporales de energía de un individuo es la obtención de su índice de masa corporal. Esta variable se empleó en este estudio con el mismo propósito y fue afectada de manera significativa ( $P < 0.01$ ) por las interacciones Alimentación x Época e IMC x Época (Cuadro 1). Se presentaron mayores valores en animales en estado posprandial vs ayuno en ambas épocas; sin embargo, la magnitud de la diferencia entre estos estados de alimentación (posprandial vs ayuno) fue ligeramente mayor en la época reproductiva vs transición (Gráfica 10).

Por otro lado, existió un menor valor de IMC en ambas épocas en los animales trabajados para mantenerlos con una menor reserva corporal de energía, existiendo sólo una diferencia en la magnitud de la diferencia entre ambos grupos, siendo mayor en transición al anestro vs época reproductiva (Gráfica 11).



**Gráfica 10. índice de masa corporal en cabras en estado de ayuno o posprandial durante la época reproductiva y de transición (P=0.002)**



**Gráfica 11. Estimación del índice de masa corporal en cabras con baja (IMCB) y alta (IMCA) cantidad de reservas corporales de energía durante la época reproductiva y de transición (P<0.001). IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo**

De las diferentes variables analizadas sólo insulina, la relación insulina:glucagón, y glucosa se asociaron con LH. De ellas, sólo glucosa se asoció con la frecuencia de pulsos de LH, pero además lo hizo con la amplitud de los pulsos y con la concentración promedio de esta hormona. Insulina y su relación con glucagón sólo lo hicieron para la amplitud de pulsos. El índice de masa corporal mostró una correlación positiva con tres de las variables asociadas a LH, la frecuencia de pulsos y su concentración promedio y basal. Adicionalmente, las hormonas y los metabolitos que se secretan en mayor grado durante un periodo

catabólico (glucagón, urea y ácidos grasos no esterificados) se relacionaron positivamente entre ellos (Cuadro 3).

En análisis posteriores se revisó por separado el comportamiento de hormonas y metabolitos a través del tiempo durante el periodo de ayuno o posprandial. Durante el ayuno, el factor tiempo sólo modificó la concentración de glucosa y en interacción con el factor Época afectó la concentración sérica de glucagón. El tiempo en interacción con el factor IMC modificó la concentración sérica de ácidos grasos no esterificados (Cuadro 4). Glucosa mostró una disminución conforme el ayuno se hizo más prolongado (Gráfica 12).

**Cuadro 3. Coeficiente de correlación y valor de probabilidad para las diferentes variables asociadas a LH, hormonas metabólicas y metabolitos en cabras**

	Leptina	Insulina	Glucagón	Ins:Glucosa	Urea	Glucosa	AGNE	LH pulsos	LH prom	LH Basal	LH Amplitud	IMC
<b>Leptina</b>	1.00	-0.089	0.023	-0.120	<b>-0.335</b>	-0.087	-0.196	-0.081	-0.175	-0.171	-0.208	<b>-0.361</b>
<b>Insulina</b>	-0.089	1.00	-0.174	<b>0.922</b>	<b>-0.270</b>	<b>0.331</b>	<b>-0.531</b>	-0.033	0.198	0.141	<b>0.545</b>	-0.060
<b>Glucagón</b>	0.023	-0.17	1.00	<b>-0.307</b>	<b>0.342</b>	0.111	<b>0.370</b>	0.225	0.123	0.149	-0.136	<b>0.339</b>
<b>Ins:Glucosa</b>	0.41	<b>0.921</b>	<b>-0.307</b>	1.00	<b>-0.276</b>	0.216	<b>-0.474</b>	-0.094	0.167	0.116	<b>0.547</b>	-0.106
<b>Urea</b>	<b>-0.334</b>	<b>-0.270</b>	<b>0.342</b>	<b>-0.276</b>	1.00	-0.116	<b>0.433</b>	<b>0.325</b>	0.183	0.208	-0.061	0.243
<b>Glucosa</b>	-0.087	<b>0.331</b>	0.111	0.216	-0.116	1.00	<b>-0.476</b>	<b>0.323</b>	<b>0.252</b>	0.222	<b>0.276</b>	<b>0.314</b>
<b>AGNE</b>	-0.196	<b>-0.531</b>	<b>0.370</b>	<b>-0.474</b>	<b>0.433</b>	<b>-0.476</b>	1.00	-0.126	-0.055	-0.005	-0.232	0.001
<b>LH pulsos</b>	0.58	<b>0.0001</b>	<b>0.009</b>	<b>0.007</b>	<b>0.002</b>	<b>0.0006</b>	0.39	1.00	0.71	0.97	0.16	0.99
<b>LH prom</b>	-0.081	-0.033	0.225	-0.094	<b>0.325</b>	<b>0.323</b>	-0.126	0.570	<b>0.537</b>	<b>0.537</b>	<b>0.370</b>	<b>0.508</b>
<b>LH Basal</b>	0.23	0.18	0.41	0.26	0.21	<b>0.08</b>	0.71	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.006</b>
<b>LH Amplitud</b>	-0.171	0.141	0.149	0.116	0.208	0.222	-0.005	<b>0.537</b>	<b>0.988</b>	1.00	<b>0.571</b>	<b>0.413</b>
<b>IMC</b>	-0.361	-0.060	<b>0.339</b>	-0.106	0.243	<b>0.314</b>	0.001	<b>0.508</b>	<b>0.390</b>	<b>0.413</b>	-0.01	1.00
	<b>0.01</b>	0.68	<b>0.02</b>	0.47	0.10	<b>0.03</b>	0.99	<b>0.0002</b>	<b>0.006</b>	<b>0.003</b>	0.95	

**Cuadro 4. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, época, tiempo y sus interacciones dobles sobre hormonas y metabolitos, durante el ayuno de cabras**

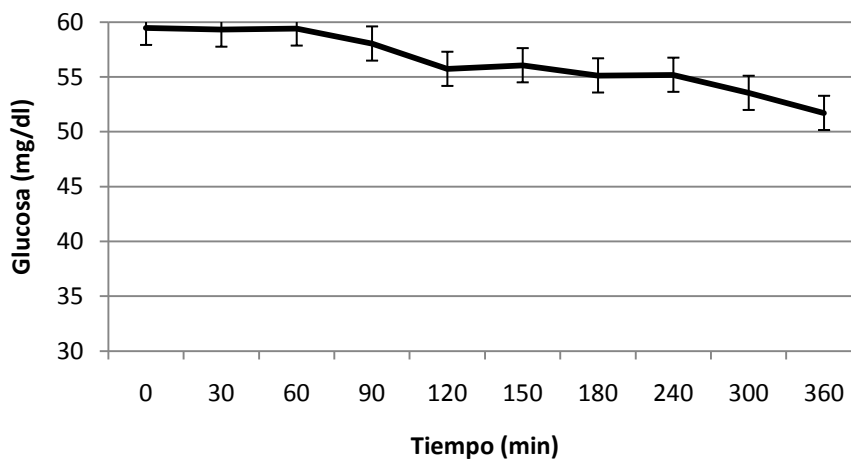
	IMC	Época	Tiempo	IMCxEPO	IMCXTiempo	ÉPOCAxTiempo
<b>Leptina</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001s</b>	0.779	0.228	0.824	0.863
<b>Insulina</b>	<b>0.036</b>	<b>0.073</b>	0.111	0.359	0.368	0.679
<b>Glucosa</b>	0.153	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.015</b>	<b>0.001</b>	0.920	0.616
<b>Glucagón</b>	<b>0.004</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.560	0.267	0.999	<b>0.004</b>
<b>Insulina:Glucagón</b>	0.347	<b>0.030</b>	0.192	0.561	0.494	0.480
<b>Urea</b>	<b>0.016</b>	<b>0.018</b>	0.981	<b>0.072</b>	0.999	0.993
<b>AGNE</b>	<b>0.001</b>	<b>0.103</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.135	<b>0.080</b>	0.301

IMC= Índice de masa corporal; EPO= Época

**Cuadro 5. Valores promedio de las diferentes hormonas y metabolitos de acuerdo al índice de masa corporal y época, durante el ayuno de cabras (medias mínimo cuadráticas)**

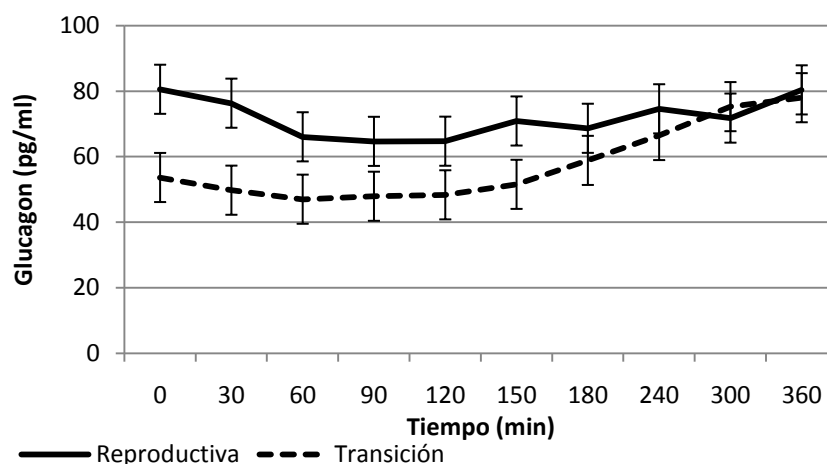
	Índice de masa corporal		Época	
	IMCA	IMCB	Reproductiva	Transición
<b>Leptina (ng/ml)</b>	2.15±0.07 <sup>a</sup>	2.63±0.07 <sup>b</sup>	2.24±0.06 <sup>a</sup>	2.55±0.06 <sup>b</sup>
<b>Insulina (ng/ml)</b>	0.14±0.02 <sup>a</sup>	0.06±0.02 <sup>b</sup>	0.06±0.02 <sup>a</sup>	0.13±0.02 <sup>b</sup>
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	57.22±0.79	55.50±0.79	59.33±0.66 <sup>a</sup>	53.39±0.66 <sup>b</sup>
<b>Glucagón (pg/ml)</b>	77.19±4.71 <sup>a</sup>	52.33±4.71 <sup>b</sup>	71.86±3.45 <sup>a</sup>	57.67±3.45 <sup>b</sup>
<b>Insulina:Glucagón</b>	2.25±0.49	1.56±0.49	0.97±0.51 <sup>a</sup>	2.84±0.51 <sup>b</sup>
<b>Urea (mg/dl)</b>	70.49±2.95 <sup>a</sup>	58.52±2.95 <sup>b</sup>	66.84±2.25 <sup>a</sup>	62.17±2.25 <sup>b</sup>
<b>AGNE (mM)</b>	1.08±0.03 <sup>a</sup>	0.88±0.03 <sup>b</sup>	1.01±0.03 <sup>a</sup>	0.95±0.03 <sup>b</sup>

Diferente literal entre grupos de un mismo factor indica diferencia estadística significativa (Ver cuadro 4). IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo



**Gráfica 12. Concentración plasmática de glucosa durante el ayuno de cabras (P=0.015)**

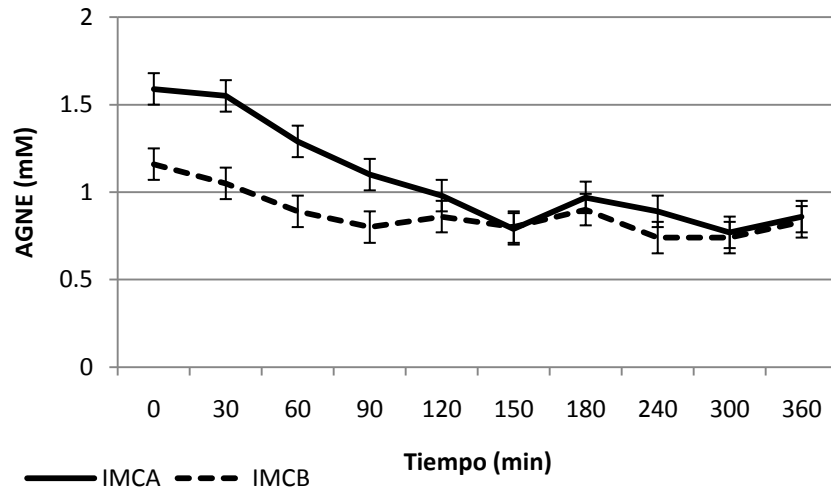
Para glucagón, la concentración fue mayor en animales con un IMCA en comparación al grupo IMCB. Por otro lado, su concentración durante la época reproductiva fue mayor en comparación a la época de transición; la diferencia entre ambas épocas fue mayor al inicio del periodo de muestreo hasta perderse esta diferencia 3 horas después de iniciado el muestreo (Gráfica 13).



**Gráfica 13. Concentración sérica de glucagón en cabras durante el ayuno en la época reproductiva y en transición al anestro (P=0.004)**

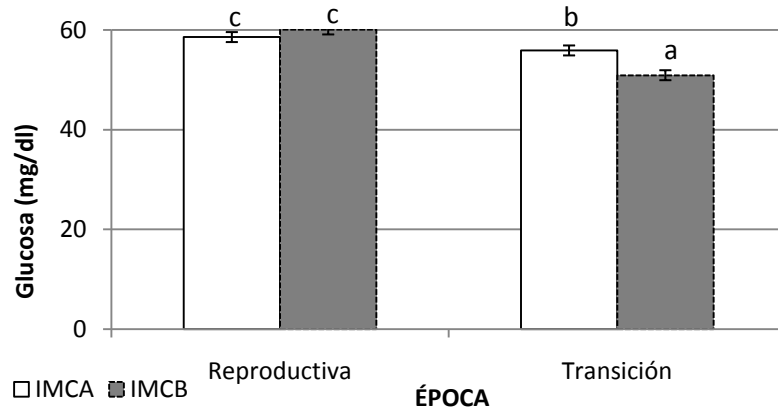
La concentración sérica de ácidos grasos no esterificados durante el inicio del ayuno fue mayor en animales con un IMCA vs IMCB y a partir de las dos horas de iniciado el muestreo y hasta su término, la concentración fue similar entre ambos grupos (Gráfica 14).

Adicionalmente, durante el ayuno se observa que la época modificó los resultados para todas las variables analizadas. Leptina, insulina y la relación insulina:glucagón mostraron mayores valores durante la época de transición vs época reproductiva. Para el resto de las variables, se observó un efecto contrario (Cuadro 5). Adicionalmente, mientras que para glucosa durante la época reproductiva no se observaron diferencias entre ambos grupos de IMC, durante la época de transición la concentración fue mayor en animales con un IMCA vs IMCB (Gráfica 15). Para el caso de urea se observó lo contrario, durante la época de transición no se observaron diferencias entre ambos grupos de IMC, mientras que durante la época reproductiva la concentración fue mayor en el grupo IMCA vs IMCB (Gráfica 16).



**Gráfica 14. Concentración sérica de ácidos grasos no esterificados durante el ayuno de cabras con diferente índice de masa corporal (P=0.080).**

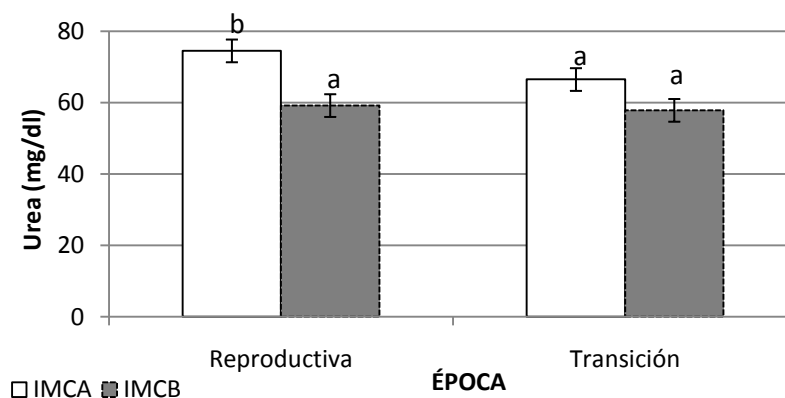
IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo



**Gráfica 15. Concentración plasmática de glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal durante la época reproductiva y en transición al anestro (estado de ayuno; P=0.001).** IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

Durante el periodo posprandial el factor tiempo afectó la concentración de glucosa, glucagón, urea y ácidos grasos no esterificados (Cuadro 6). Tanto en urea como en los ácidos grasos no esterificados se observó una tendencia a disminuir sus concentraciones a medida que transcurría el periodo posprandial, mientras que la concentración de glucosa muestra un comportamiento contrario, elevándose hasta alcanzar su máximo valor al final del muestreo (Gráficas 17 y

18). Para glucagón la concentración aumentó en el periodo inicial y posteriormente hubo una disminución (Gráfica 17).



**Gráfica 16. Concentración sérica de urea en cabras con diferente índice de masa corporal durante la época reproductiva y de transición al anestro (estado de ayuno; P=0.072).** IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

**Cuadro 6. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, época, tiempo y sus interacciones dobles sobre hormonas y metabolitos, durante el posprandio de cabras**

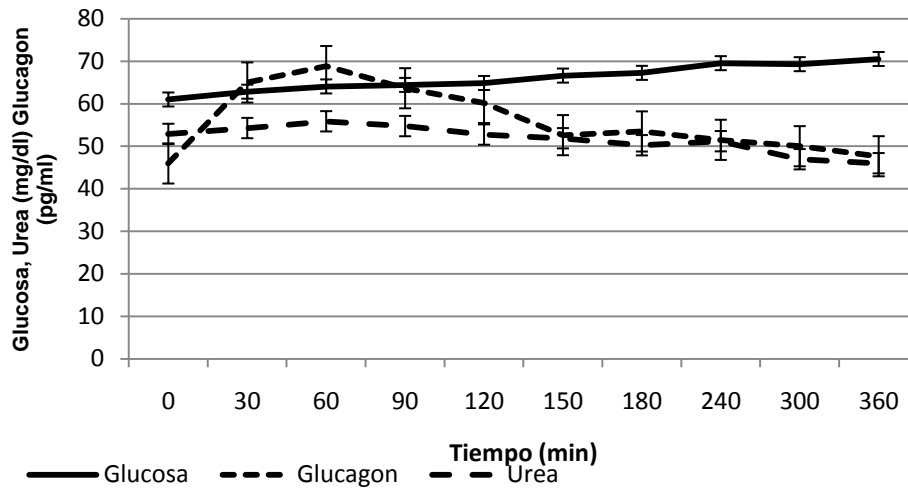
	IMC	Época	Tiempo	IMCxEPO	IMCXTiempo	ÉPOCAXTiempo
Leptina	0.014	<0.001	0.311	0.504	0.749	0.888
Insulina	0.063	<0.001	0.981	0.030	0.017	0.945
Glucosa	<0.001	<0.001	0.002	0.015	0.765	0.694
Glucagón	<0.001	0.021	0.005	0.383	0.731	0.882
Insulina:Glucagón	0.005	<0.001	0.716	0.008	0.060	0.910
Urea	0.003	0.897	0.079	0.211	0.997	0.259
AGNE	0.082	<0.001	<0.001	0.193	0.678	0.939

IMC= Índice de masa corporal; EPO= Época

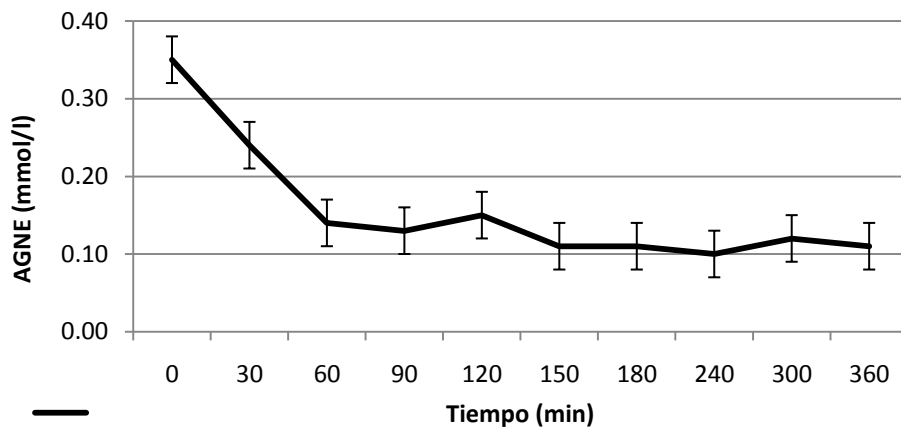
**Cuadro 7. Valores promedio de las diferentes hormonas y metabolitos de acuerdo al índice de masa corporal y época, en estado posprandial (medias mínimo cuadráticas)**

	Índice de masa corporal		Época	
	IMCA	IMCB	Reproductiva	Transición
Leptina (ng/ml)	2.46±0.07 <sup>a</sup>	2.77±0.07 <sup>b</sup>	2.89±0.06 <sup>a</sup>	2.33±0.06 <sup>b</sup>
Insulina (ng/ml)	0.94±0.10 <sup>a</sup>	1.24±0.10 <sup>b</sup>	0.20±0.11 <sup>a</sup>	1.98±0.11 <sup>b</sup>
Glucosa (mg/dl)	69.85±0.81 <sup>a</sup>	62.22±0.81 <sup>b</sup>	63.72±0.70 <sup>a</sup>	68.35±0.70 <sup>b</sup>
Glucagón (pg/ml)	64.10±2.10 <sup>a</sup>	47.66±2.10 <sup>b</sup>	60.03±2.12 <sup>a</sup>	51.73±2.12 <sup>b</sup>
Insulina:Glucagón	9.63±1.53 <sup>a</sup>	17.43±1.53 <sup>b</sup>	2.54±1.67 <sup>a</sup>	24.52±1.67 <sup>b</sup>
Urea (mg/dl)	54.67±1.07 <sup>a</sup>	48.68±1.07 <sup>b</sup>	51.57±1.06	51.77±1.06
AGNE (mM)	0.18±0.02 <sup>a</sup>	0.13±0.02 <sup>b</sup>	0.20±0.01 <sup>a</sup>	0.11±0.01 <sup>b</sup>

Diferente literal entre grupos de un mismo factor indica diferencia estadística significativa (Ver cuadro 6). IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo



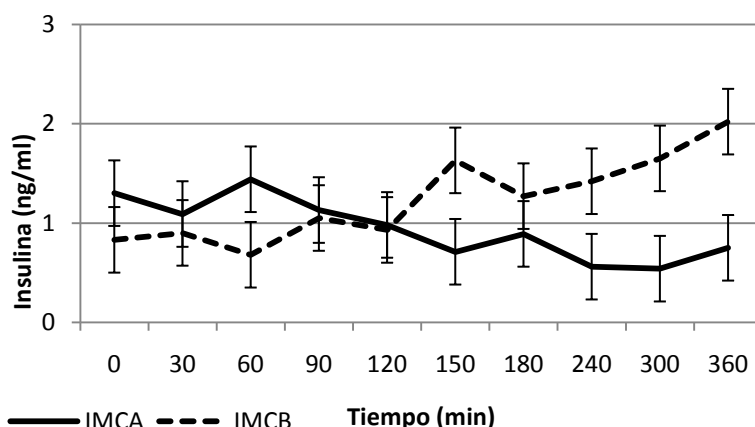
**Gráfica 17. Concentración circulante de glucosa ( $P=0.002$ ), urea ( $P=0.079$ ) y glucagón ( $P=0.005$ ), durante el estado posprandial de cabras**



**Gráfica 18. Concentración sérica de ácidos grasos no esterificados durante el estado posprandial de cabras ( $P<0.001$ )**

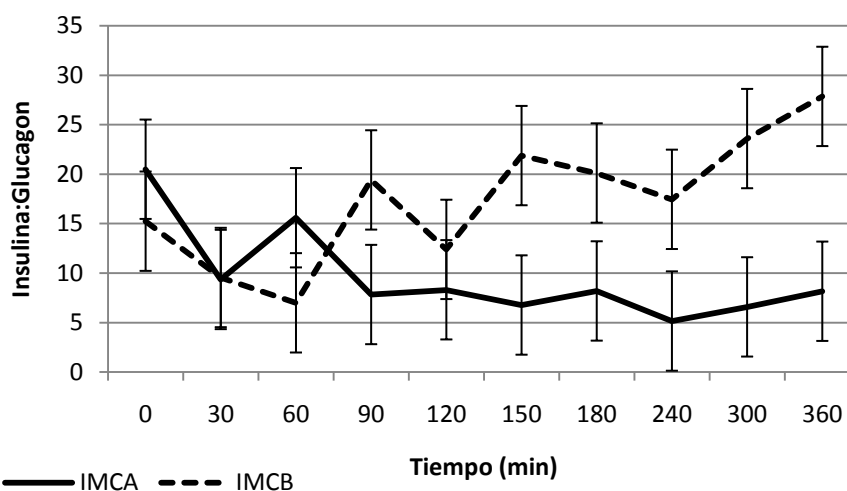
Por otro lado, tanto insulina, como la relación insulina:glucagón mostraron un comportamiento similar, con valores más altos al inicio del periodo posprandial para animales con un IMCA, sin embargo esto se invirtió conforme transcurría el periodo hasta presentar mayores valores en los animales con un IMCB vs IMCA (Gráficas 19 y 20).





**Gráfica 19. Concentración sérica de insulina en cabras con diferente índice de masa corporal durante el posprandio (P=0.017)**

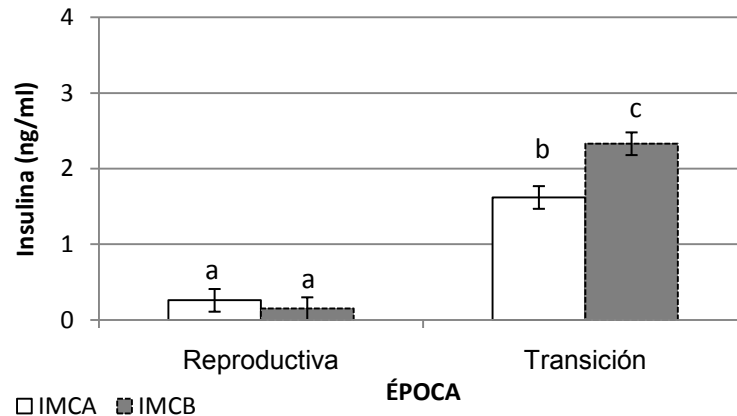
IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo



**Gráfica 20. Relación Insulina:Glucagón en cabras con diferente índice de masa corporal durante el posprandio (P=0.060)**

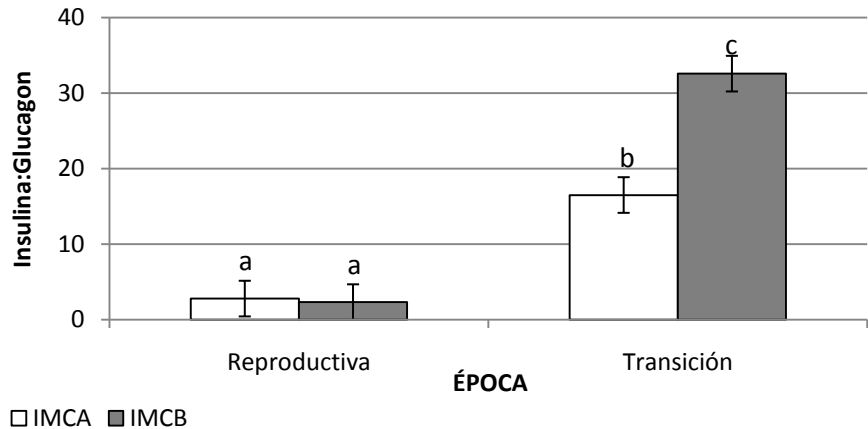
La época nuevamente afectó las diferentes variables excepto urea (Cuadro 6). Leptina y ácidos grasos no esterificados, mostraron durante el posprandio un comportamiento diferente a lo observado durante el ayuno, con mayores concentraciones circulantes durante la época reproductiva vs transición (Cuadro 7). Adicionalmente, la interacción entre la época y el índice de masa corporal afectó las variables insulina, glucosa y glucagón. La concentración sérica de

insulina así como su relación con glucagón mostraron diferencias entre grupos con diferente IMC, sólo durante la época de transición (Gráficas 21 y 22).



**Gráfica 21. Concentración sérica de insulina en cabras con diferente índice de masa corporal durante la época reproductiva y de transición al anestro (P=0.030).**

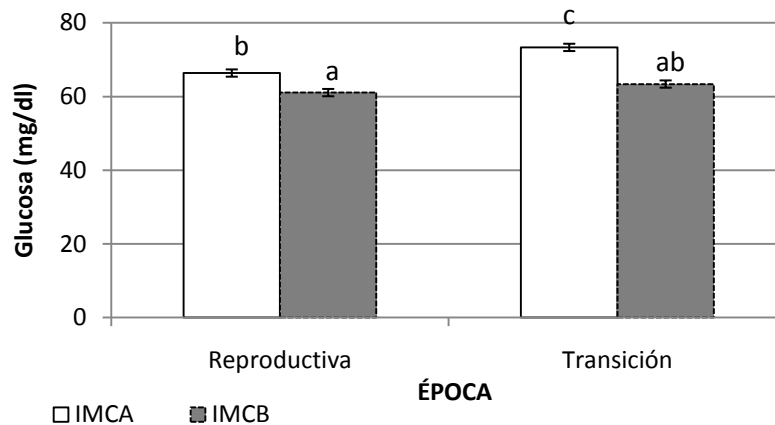
IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo



**Gráfica 22. Relación Insulina:Glucagón en cabras con diferente índice de masa corporal durante la época reproductiva y en transición al anestro (P=0.008)**

IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

Por otro lado, la concentración sérica de glucosa fue mayor en animales con IMCA vs IMCB en ambas épocas analizadas, aunque la magnitud de la diferencia entre ambos grupos fue mayor en transición vs época reproductiva (Gráfica 23).



**Gráfica 23. Concentración sérica de glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal durante la época reproductiva y en transición al anestro (P=0.015)**

IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

## 6.6 DISCUSIÓN

En las diferentes especies rumiantes, la secreción de GnRH-LH es un indicador confiable de su actividad reproductiva. En general, las diferentes variables asociadas a esta hormona fueron afectadas por los diferentes factores. El indicador principal, que es la frecuencia de pulsos de LH fue afectada tanto por dos factores que participan en la determinación del estado energético de un individuo, el IMC (estado energético estático) como un indicador de la cantidad de reservas corporales de energía y el estado de alimentación (estado energético dinámico). De esta manera se confirma que un ayuno con la duración que se aplicó en este estudio (72 horas) es suficiente para disminuir la frecuencia de pulsos de LH, como se ha reportado en otros estudios (Tanaka *et al.*, 2002). Esto es diferente de lo que ocurre en otras especies monogástricas en la que un solo día de ayuno es capaz de reducir la secreción pulsátil de esta hormona (Brechhia *et al.*, 2006). En el caso de los rumiantes, el rumen podría abastecer de nutrientes al animal por un tiempo después del ayuno, por lo que su actividad reproductiva no se ve afectada de manera inmediata.

Adicionalmente, estados de restricción crónica (consumo de sólo 30% de los requerimientos durante 4 semanas) puede disminuir la frecuencia de pulsos de

LH y se correlaciona con su índice de masa corporal (Tanaka *et al.*, 2002). En este estudio los animales con un menor IMC fueron mantenidos de manera crónica con raciones de alimento que estuvieron por debajo de sus requerimientos nutricionales, para mantenerlos en esa condición de bajas reservas corporales de energía, por lo que esto también provocó disminuciones en esta variable asociada a LH. En bovinos se ha indicado que una baja condición corporal produce una movilización excesiva de tejidos, afectando la concentración circulante de metabolitos y el balance hormonal y provocando alteraciones en el desempeño reproductivo de rumiantes (Galvis y Correa, 2002).

En el resto de las variables de secreción de LH, la época tuvo una influencia marcada sobre ellas. En especial, la amplitud de pulsos en animales alimentados o en ayuno es dependiente de la etapa de la estación reproductiva en que se encuentren. Esta amplitud aumentó pero sólo en animales en el periodo posprandial durante la época de transición, lo que puede sugerir una diferente respuesta o sensibilidad a señales nutricionales que modulen la regulación de la secreción de LH. Al parecer, en la especie caprina su actividad reproductiva se presenta de manera independiente de la cantidad de reservas corporales o del estado de nutrición (Estrada *et al.*, 2005; Mani *et al.*, 1996), lo que puede sugerir que en este momento, el fotoperiodo es el factor clave que determina esta actividad en esta especie. Sin embargo, en época de transición, estos factores pueden generar cambios en la secreción de LH. Esto puede indicar y sustentar la idea de una secreción diferente de LH debido a cuestiones nutricionales, las cuales son moduladas por la etapa del ciclo reproductivo anual. Dado que la frecuencia de pulsos no cambió debido a la época, la mayor concentración promedio y basal de LH en la época de transición al anestro podría ser resultado de una mayor amplitud durante esta época.

De las diferentes interacciones, las que afectaron en mayor medida las diferentes variables hormonales y metabólicas fueron en orden de importancia, la Alimentación x Época, IMC x Alimentación e IMC x Época. De las tres diferentes hormonas involucradas en el metabolismo energético (leptina, insulina y

glucagón), nuevamente la época determinó cambios en la respuesta de las primeras dos a la alimentación. Leptina es una hormona involucrada entre otras cosas en el metabolismo energético y se ha sugerido su participación en la regulación de la actividad reproductiva (Brann *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2002). Ya que no se presentan cambios en la concentración de leptina durante la época de transición en animales alimentados o ayunados, esto sugiere que no está involucrada con los cambios reproductivos que se presentan durante este periodo en la especie caprina, aunque no se descarta una sensibilidad diferente en la respuesta a esta hormona en esta etapa del ciclo reproductivo anual.

Al igual que ocurrió con leptina, la época determinó cambios en la concentración sérica de insulina en animales con diferente estado de alimentación. Esta hormona es la principal reguladora del metabolismo de la glucosa (la cual también fue afectada por esta interacción) y podría funcionar como eslabón entre el estado energético de un animal y la actividad reproductiva (Matsuyama *et al.*, 2004). El aumento en la concentración sérica de insulina en la época reproductiva sólo en animales ayunados, podría sugerir que existe una mayor concentración de glucosa en este momento, por lo cual esta hormona debe secretarse en mayor medida. Aunque se observó una mayor concentración plasmática de glucosa en el mismo grupo de mayor concentración de insulina, la diferencia con el resto de los grupos no fue tan evidente como lo fue para insulina. Es probable que exista cierta resistencia a la acción de insulina en animales alimentados durante la época de transición. En venados se ha observado una mayor tasa de eliminación de glucosa en verano y disminuye hasta ser menor esta tasa en el invierno; sin embargo, estos cambios estacionales no han sido estudiados en especies rumiantes domésticas (McMahon *et al.*, 1997). Por otro lado, podría presentarse una sensibilidad elevada de insulina, como respuesta a mayores concentraciones de glucosa en animales alimentados, sólo durante la época de transición.

Alternativamente, algún otro mecanismo que propicia la liberación de insulina, como la temperatura, podría estar disminuido durante la época reproductiva; en estudios previos en ovinos, se observó que en condiciones de

frío, se afecta la respuesta de insulina; su concentración no se modificó a pesar de haber aumentado la concentración de glucosa (Sasaki *et al.*, 1982) y por otro lado, existió una menor concentración de insulina en borregos expuestos al frío a los que se les administró glucosa (Sasaki y Takahashi, 1980). Sin embargo, esto no explica el porqué durante la época de transición la concentración de insulina se mantiene abatida en animales en ayuno. Es probable que esta mayor elevación en insulina durante la época de transición, que ocurre en animales alimentados, sea una clave que determine o le permita a especies estacionales como la cabra el retrasar el término de su actividad reproductiva. Aunque el fotoperiodo es el principal regulador de la duración de la actividad reproductiva de cabras, otros factores como la disponibilidad de alimento pueden afectar esta duración; cabras que consumen 1.5 veces sus requerimientos de mantenimiento retrasan 25 días el término de su actividad reproductiva y adelantan su reinicio 12 días, en comparación a cabras a las que se les suministró el 100% de sus requerimientos (Zarazaga *et al.*, 2005). Adicionalmente, cabras que fueron restringidas alternadamente en un 40% de sus requerimientos de mantenimiento, finalizaron su actividad ovulatoria de manera más temprana que aquellas que no fueron restringidas (Estrada, 2007). Así, la época determina cambios en las señales metabólicas producidas en respuesta al consumo de alimento durante la época de transición y esto podría estar relacionado con el hecho de que las cabras continúen ciclando o entren en fase de anestro estacional.

En el caso de leptina, el IMC también provocó cambios en su concentración sérica; sin embargo, en este estudio se observaron mayores concentraciones en animales con una menor cantidad de reservas corporales de energía, lo cual es diferente a lo reportado de manera amplia para esta y otras especies (Ahrén, 2000; Daniel *et al.*, 2002; Delavaud *et al.*, 2000; Gámez *et al.*, 2008; Kalsbeek *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2000). Esto no permite relacionar los efectos asociados al IMC con la concentración de leptina, por lo que el IMC y sus efectos sobre las variables analizadas son independientes de esta hormona. Una posible explicación a la relación inversa entre el IMC y la concentración de leptina podría

ser el resultado de una mayor carga metabólica en animales con un IMCA debido a la mayor cantidad de alimento consumido, lo que indica un mayor metabolismo y tasa de eliminación circulante de leptina, como se ha sugerido para otras hormonas en especies rumiantes (Wiltbank *et al.* 2000; Vasconcelos *et al.*, 2003).

La hormona gluconeogénica más potente es glucagón y entre sus funciones se encuentra el movilizar fuentes de energía estimulando la glucogenolisis y la lipólisis, además de ser cetogénica (Hippen *et al.*, 1999; Herdt, 2000). La baja concentración de glucagón en animales con un IMCB podría ser el resultado de una disminución en su metabolismo. Aquellas cabras con esta menor cantidad de reservas corporales de energía podrían haber alcanzado una adaptación metabólica a estados de restricción alimenticia, lo que podría evitarles movilizar en mayor medida, sustratos para producción de energía que pudieran disminuir aún más su IMC. Se ha reportado que las cabras pueden reducir su metabolismo ante una escasez de alimento, como una estrategia de conservación de energía (Chosniak *et al.*, 1995). Por otro lado, esta hormona podría actuar también a corto plazo como en condiciones de ayuno. La mayor concentración de glucagón en esta condición tendrá la finalidad de proporcionar los sustratos energéticos necesarios para el animal cuando no existe un aporte externo de estos, como lo demuestra la menor concentración circulante de glucosa en estados de ayuno. La concentración elevada de glucagón en época reproductiva vs transición podría deberse a una mayor movilización de reservas corporales de energía en condiciones ambientales con menor temperatura. En el municipio de Colón, las temperaturas más frías del año se presentan durante el mes de diciembre (CEA, 2009). Sin embargo, aunque se ha reportado que en ovinos en condiciones de frío aumentan la tasa metabólica (Ekpe y Christopherson, 2000), glucagón no se modifica bajo estas condiciones de temperatura (Sasaki *et al.*, 1982). No obstante, esto no ha sido estudiado en cabras. Una menor concentración de glucosa podría estimular la secreción de glucagón (Hippen *et al.*, 1999); sin embargo, esta situación no se presentó en este estudio por efecto de la época.

Algunos autores han mencionado que la relación entre las hormonas insulina y glucagón podría dar mayor información del estado metabólico de un animal que el análisis de cada hormona por separado (Caldeira *et al.*, 2007). En términos generales, esta relación siguió la tendencia observada con las concentraciones de insulina en la interacción Alimentación x Época. Como se observó con insulina, durante la época de transición predomina un estado anabólico, indicando una mayor sensibilidad durante esta época al consumo de alimento, lo cual no ocurre durante la época reproductiva. Al igual que se mencionó anteriormente, la época podría estar modulando la respuesta a esta condición de alimentación y esto podría ser determinante como señal para que esta especie estacional continúe o detenga su actividad reproductiva. Por otro lado, es evidente que durante estados posprandiales, tiende a predominar la actividad de insulina en comparación a los estados de ayuno, en los que glucagón tiene la función predominante. Sin embargo, animales con menor cantidad de reservas corporales de energía durante el posprandio, muestran una mayor relación insulina:glucagón, lo que podría indicar una mayor sensibilidad al consumo de alimento o que se requiere de mayor cantidad de insulina para poder establecer su acción.

Adicionalmente, durante la época de transición, nuevamente los animales con un IMCB presentan una mayor relación insulina:glucagón en comparación al IMCA y la relación fue mucho mayor a lo observado en época reproductiva. Así, la época nuevamente puede determinar respuestas en estas hormonas y como se indicó con anterioridad tener relación con la actividad reproductiva de la especie caprina..

Glucosa fue otra de las variables afectada por la época en animales con diferente estado de alimentación y en animales que presentan diferente IMC y en ayuno o alimentados. En general, los resultados sustentan diferencias ya reportadas entre animales en ayuno y alimentados (Nagatani *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2004) y en aquellos con diferente cantidad de reservas corporales de energía (Caldeira *et al.*, 2007; Gamez *et al.*, 2008).



La mayor influencia de la época como determinante de la respuesta en animales alimentados o ayunados sobre las hormonas analizadas, no se observa para el caso de los metabolitos indicadores de movilización de sustratos energéticos, lo que sugiere un menor involucramiento en la actividad reproductiva de la especie caprina. Para urea, un producto de la degradación de proteína muscular (Huntington y Archibeque, 1999; Caldeira *et al.*, 2007), sólo existió un aumento debido a las condiciones de ayuno vs alimentación, similar a lo ya reportado en otras especies (Gaál *et al.*, 1993; Kinsbergen *et al.*, 1994) y que podría también aplicar para la especie caprina. Se ha descrito que una restricción o una situación de ayuno provoca una elevación en la concentración de urea; sin embargo esto sólo se presenta por un corto tiempo, estabilizándose su concentración, para conservar proteínas-aminoácidos para procesos metabólicos más críticos, en lugar de oxidarlos (Rule *et al.*, 1985). De esta manera, en cabras la proteína muscular también podría representar una fuente de energía en condiciones de ayuno con una duración similar a la de este estudio.

Por otro lado, durante un periodo de estrés nutricional o de una alta demanda de energía, el organismo puede derivar energía del tejido graso. Los triglicéridos almacenados son liberados, produciendo ácidos grasos que pueden ser utilizados en el tejido muscular y ser usados como combustible energético por el organismo (Adewuyi *et al.*, 2005). Ya que la concentración plasmática de glucosa no se modificó debido a la época, es probable que en la época reproductiva, los animales movilicen mayor cantidad de reservas de energía bajo la temperatura predominante durante esta época del año. Se ha reportado que la concentración de AGNE aumenta en ovejas expuestas a temperaturas bajas (Sano *et al.*, 1999). Alternativamente, la relación insulina:glucagón es menor durante la época reproductiva vs transición lo que pudo favorecer la mayor movilización de tejido graso y en consecuencia de AGNE.

En este estudio se presentó un aumento drástico en la concentración de ácidos grasos no esterificados en animales ayunados, mismo que fue mayor en animales con un IMCA en comparación a los de un IMCB. En especies rumiantes,

se ha reportado que condiciones de ayuno elevan la concentración de ácidos grasos no esterificados (Adam *et al.*, 2002; Matsuyama *et al.*, 2004; Nagatani *et al.*, 2000) y esto se debe en gran medida a una disminución en la relación insulina:glucagón en estos animales (Adewuyi *et al.*, 2005; Hippen *et al.*, 1999). Sin embargo, una vez más parece ser que aquellos animales con mayor cantidad de reservas energéticas y que normalmente están cubriendo sus requerimientos nutricionales son más afectados al estar bajo estrés nutricional, que aquellos que han estado restringidos nutricionalmente de manera previa. Adicionalmente, es probable que esto sea resultado de un mayor requerimiento energético o de una mayor cantidad de reservas de energía en forma de grasa que existen en animales con un IMCA, las cuales deben ser movilizadas para aportar energía, como ocurre en otras especies con otras hormonas. En corderos ayunados se ha observado que los animales obesos disminuyen en mayor medida su concentración de leptina al ser sometidos a un ayuno, como resultado de su mayor cantidad de grasa (Altmann *et al.*, 2006).

De los resultados discutidos anteriormente, se puede sugerir que cambios en la secreción circulante de insulina y/o glucosa podrían estar involucrados en la actividad reproductiva de la especie caprina y estos cambios podrían ser modulados por la etapa del ciclo reproductivo anual. Ya que leptina presentó una diferente concentración circulante de leptina en animales con diferente estado de alimentación sólo durante la época reproductiva y no en transición, descarta su involucramiento en este momento en que se ha sugerido que existe una mayor sensibilidad a estas señales metabólicas que pueden afectar la reproducción de esta especie (Estrada *et al.*, 2005; Mani *et al.*, 1996). Esto también se fundamenta con lo observado en los análisis de correlación, en los que se observa que glucosa principalmente se correlacionó de manera positiva a la frecuencia de pulsos, amplitud de pulsos y concentración promedio de LH. Insulina sólo lo hizo con la amplitud de los pulsos, mientras que leptina no mostró ninguna relación con alguna de las variables asociadas a LH.

Posteriormente, al considerar el comportamiento a través del tiempo durante dos periodos separados, ayuno y posprandio podemos visualizar algunas cosas con mayor detalle. Sólo se discutirán aquellos resultados que sean diferentes de lo ya descrito. Algunas de las cosas más importantes que resultan de estos análisis durante el ayuno es que la época nuevamente muestra un efecto importante sobre todas las variables analizadas y sólo en una de ellas (glucagón) su interacción con el tiempo mostró un efecto significativo. El tiempo sólo afectó de manera significativa la concentración plasmática de glucosa y su interacción con el IMC lo hizo sobre los AGNE.

El IMC mostró efectos similares a los observados en el análisis previo para las variables leptina, insulina y glucagón. Sólo en el caso de urea, en esta ocasión se observó un efecto significativo; como se indicó previamente, urea es un indicador de la movilización de proteína muscular y durante este periodo de ayuno, el efecto sobre los animales con un IMCA es mayor en comparación al IMCB. Nuevamente, las condiciones de adaptación a restricciones de consumo de aquellos animales con un IMCB puede evitar la movilización de este metabolito en mayor medida, aunque la razón de mostrar una diferencia entre grupos sólo durante la época reproductiva no es clara.

La época mostró resultados similares al análisis previo para la concentración sérica de insulina, glucosa, AGNE y la relación insulina:glucagón. Leptina en este caso, además de urea, mostraron efectos significantes debido a la época, que no se observaron previamente.

El descenso sostenido en la concentración circulante de glucosa a través del periodo de muestreo podría ser resultado del periodo transcurrido posterior al ayuno, disminuyendo la concentración plasmática conforme este se hace más prolongado, lo que sugiere un efecto sostenido a largo plazo del ayuno sobre este combustible metabólico. Para ácidos grasos no esterificados, la mayor concentración al inicio del periodo de muestreo podría ser el reflejo de un ritmo existente en la concentración de este metabolito. En cabras se ha reportado un ritmo circadiano que muestra su menor secreción por la noche y aumenta al inicio

de la luz del día (Alila-Johansson *et al.*, 2006) y es probable que el ayuno no logre romper este ritmo.

Bajo condiciones posprandiales, las diferentes variables analizadas son más susceptibles a ser afectadas por los factores incluidos en este estudio. El efecto del IMC sobre leptina, glucosa, glucagón y AGNE fue similar a lo ya descrito con anterioridad. Aunque urea no fue afectada por este factor en los primeros análisis estadísticos, en estos últimos la diferencia entre los grupos de IMC fue suficiente para mostrar significancia y al igual que lo descrito para AGNE, los animales con IMCA podrían ser más sensibles o requieren de una mayor disponibilidad de sustratos energéticos producidos de manera endógena.

Insulina, glucagón, la relación insulina:glucagón y AGNE tienen un comportamiento similar a lo descrito previamente debido al factor época. Nuevamente leptina mostró un aumento durante la época reproductiva como se observó durante el ayuno. Aunque en los primeros análisis no se observó una diferencia significativa, estuvo cerca de hacerlo. La mayor concentración de insulina y de su relación con glucagón en animales con un IMCB sólo en época de transición podría favorecer el uso de glucosa en esta especie ya que se observaron menores concentraciones de este combustible en el grupo con un IMCB vs IMCA en época de transición.

Tanto insulina como la relación insulina:glucagón mostraron un comportamiento similar en el periodo de muestreo en su interacción con el IMC. Mientras que los animales con un IMCA tienden a disminuir estas variables conforme transcurre el periodo de muestreo, en animales con un IMCB ocurre lo contrario. Esto podría ser el resultado de una respuesta más rápida en animales con un IMCB al consumo de alimento

## **6.7 CONCLUSIONES**

La época puede determinar la respuesta de algunas señales metabólicas y de secreción de hormona luteinizante en cabras con diferente estado de alimentación.

El estado de alimentación tiene una mayor influencia que el estado energético estático, sobre las respuestas de señales metabólicas y de secreción de hormona luteinizante.

Las diferencias observadas en la concentración circulante de señales metabólicas debido a la época y su interacción con el estado de alimentación en primer plano y el IMC en segundo término, podrían estar asociadas a las respuestas en la actividad reproductiva (actividad ovulatoria) de la especie caprina.

Glucosa e insulina muestran una mayor sensibilidad a los factores estudiados, por lo que podrían tener mayor importancia que leptina en la regulación de la actividad reproductiva de caprinos.

Cabras con mayor cantidad de reservas corporales de energía, son más susceptibles a periodos de restricción alimenticia, movilizandando en mayor grado sus reservas para solventar estos desafíos.

A diferencia de otros estudios, leptina no se correlacionó de manera positiva al IMC, por lo que los efectos asociados a este factor son independientes de esta hormona.

## **6.8 LITERATURA CITADA**

**Adam** CL, Archer ZA, Findlay PA, Thomas L, Marie M. Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine-and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. *Neuroendoc* 2002; 75: 250-256.

**Adewuyi** AA, Gruys E, Eerdenburg FJCM. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Vet Q* 2005; 27: 117-126.

**Ahrén** B. Diurnal variation in circulating leptin is dependent on gender, food intake and circulating insulin in mice. *Acta Physiol Scand* 2000; 169: 325-331.

**Alila-Johansson** A, Ericksson L, Soveri T, Laakso ML. The daily rhythms of melatonin and free fatty acids in goats under varying photoperiods and constant darkness. *Chronobiol Int* 2006; 23: 565-581.

**Altmann** M, Sauerwein H, von Borell E. The relationship between leptin concentrations and body fat reserves in lambs are reduced by short-term fasting. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2006; 90: 407-413.

**Brann** DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD. Leptin and Reproduction. *Steroids* 2002; 67: 95-104.

**Brecchia** G, Bonanno A, Galeati G, Federici C, Maranesi M, Gobbetti A, Zerani M, Boiti C. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Dom Anim Endocrinol* 2006; 31: 105-122.

**Bucholtz** DC, Vidwans NM, Herbosa CG, Schillo KK, Foster DL. Metabolic interfaces between growth and reproduction. V. Pulsatile luteinizing hormone secretion is dependent on glucose availability. *Endocrinol* 1996; 137: 601-607.

**Caldeira** RM, Belo AT, Santos CC, Vazques MI, Portugal AV. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rumin Res* 2007; 68: 233-241.

**CEA**. 2009. Periodos invernales 2006-2008 en Querétaro. Comisión estatal de aguas. <http://www.ceaqueretaro.gob.mx/index/heladas>. F

**Choshniak** I, Ben Kohav N, Taylor CR, Robertshaw D, Barnes RJ, Dobson A, Belkin V, Shkolnik A. Metabolic adaptations for desert survival in the Bedouin goat. *Am J Physiol* 1995; 268: R1101-1010. Abstract

**Daniel** JA, Whitlock BK, Baker JA, Steele B, Morrison CD, Keisler DH, Sartin JL. Effect of body fat mass and nutritional status on 24-hour leptin profiles in ewes. *J Anim Sci* 2002; 80: 1083-1089.

**Delavaud** C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J Endocrinol* 2000; 165: 519-526.

**Ekpe** ED, Christopherson RJ. Metabolic and endocrine responses to cold and feed restriction in ruminants. *Can J Anim Sci* 2000; 80: 87-95.

**Estrada** CE, Urrutia MJ, Villagómez AE, Jiménez SH, Mejía G, Rivera LMT, Gámez VH, Basurto GR, Villa GA, Vera AH. Actividad lútea durante transición a anestro en cabras con índice de masa corporal alto o bajo sometidas o no a restricción nutricional en fases. Memorias XLI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Morelos 2005; p. 108.

**Estrada** CE. Efecto de las reservas corporales de energía y de la restricción nutricional sobre la expresión de la transición reproductiva estacional en cabras criollas. Tesis Maestría en Ciencias. UNAM-FMVZ 2007; 97 p.

**Gaál** T, Mézes M, Miskucza O, Ribiczey-Szabó P. Effect of fasting on blood lipid peroxidation parameters of sheep. Res Vet Sci 1993; 55: 104-107. Abstract.

**Galvis** GRD, Correa CHJ. Interacciones entre el metabolismo y la reproducción en la vaca lechera: es la actividad gluconeogénica el eslabón perdido? Rev Col Cienc Pec 2002; 15: 36-50.

**Gámez** VHG, Rosales NCA, Bañuelos VR, Urrutia MJ, Díaz GMO, Silva RJM, Meza HCA. Leptin and glucose concentration of Creole does with different body condition scores (BCS) under tropical latitude (22°NL). Memorias 9<sup>th</sup> International Conference on Goats Aug 31-Sep 4, 2008; Querétaro México. p 328.

**Henry** BA, Goding JW, Tilbrook AJ, Dunshea FR, Blache D, Clarke IJ. Leptin-mediated effects of undernutrition or fasting on luteinizing hormone and growth hormone secretion in ovariectomized ewes depend on the duration of metabolic perturbation. J Neuroendoc 2004; 16: 244-255.

**Herd** TH. Ruminant adaptation to negative energy balance. Veterinary Clin of N Am. Food Anim Pract 2000; 16: 215-230.

**Hippen** AR, She P, Young JW, Beitz DC, Lindberg GL, Richardson LF, Tucker LW. Metabolic responses of dairy cows and heifers to various intravenous dosages of glucagón. J Dairy Sci 1999; 82: 1128-1138.

**Huntington** GB, Archibeque SL. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. Proc Am Soc Anim Sci 1999; 1-8.

**INEGI**. 2008. Catálogo de Claves de Entidades Federativas, Municipios y Localidades. <http://mapserver.inegi.gob.mx/mgn2k/?s=geo&c=1223>

**Kalsbeek** A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, Endert E, Buijs RM. The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinol* 2001; 142: 2677-2685.

**Kinsbergen** M, Sallmann HP, Blum JW. Metabolic, endocrine and haematological changes in 1-week-old calves after milk intake, in response to fasting and during total parenteral nutrition. *Zentralb Veterinarmed A* 1994; 41: 268-282. Abstract.

**Mani** AU, McKelvey WAC, Watson ED. Effect of undernutrition on gonadotropin profiles in non-pregnant cycling goats. *Anim Reprod Sci* 1996; 43: 25-33.

**Matsuyama** S, Ohkura S, Ichimaru T, Sakurai K, Tsukamura K, Maeda K, Okamura H. Simultaneous observation of the GnRH pulse generator activity and plasma concentrations of metabolites and insulin during fasting and subsequent refeeding periods in Shiba goats. *J Reprod Dev* 2004; 50: 697-704.

**McMahon** CD, Corson ID, Littlejohn RP, Stuart SK, Veenvliet BA, Suttie JM. Effects of season, protein and nutritional state of glucose tolerance during an annual cycle of growth in young red deer stags. *J Endocrinol* 1997; 154: 275-283.

**Nagatani** S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinol* 2000; 141: 3965-3975.

**Ohkura** S, Ichimaru T, Itoh F, Matsuyama S, Okamura H. Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. *Endocrinol* 2004; 145: 3239-3246.

**Perry** RC, Corah LR, Cochran RC, Beal WE, Stevenson JS, Minton JE, Simms DD, Brethour JR. Influence of dietary energy on follicular development, serum gonadotropins, and first postpartum ovulation in suckled beef cows. *J Anim Sci* 1991; 69: 3762-3773.

**Rule** DC, Beitz DC, de Boer G, Lyle RR, Trenkle AH, Young JW. Changes in hormone and metabolite concentrations in plasma of steers during a prolonged fast. *J Anim Sci* 1985; 61: 868-875.

**Sano** H, Takebayashi A, Kodama Y, Nakamura K, Ito H, Arino Y, Fujita T, Takahashi H, Ambo K. Effects of feed restriction and cold exposure on glucose



metabolism in response to feeding and insulin in sheep. *J Anim Sci* 1999; 77: 2564-2573.

**Sasaki** Y, Takahashi H. Insulin secretion in sheep exposed to cold. *J Physiol* 1980; 306: 323-335.

**Sasaki** Y, Takahashi H, Aso H, Ohneda A, Weekes TEC. Effects of cold exposure on insulin and glucagón secretion in sheep. *Endocrinol* 1982; 111: 2070-2076.

**Schillo** KK. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci* 1992; 70: 1271-1282.

**Schneider** JE, Zhou D. Interactive effects of central leptin and peripheral fuel oxidation on estrous cyclicity. *Am J Physiol Reg Integ Com Physiol* 1999; 46: R1020-R1024.

**Tanaka** T, Akaboshi N, Inoue Y, Kamomae H, Kaneda Y. Fasting-induced supresión of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy status in ovariectomized goats. *Anim Reprod Sci* 2002; 72: 185-196.

**Vasconcelos** JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriog* 2003; 60: 795-807.

**Wagner** R, Oberste-Berghaus C, Herpertz S, Blum WF, Pelz B, Hebebrand H, Senf W, Mann K, Albers N. Time relationship between circadian variation of serum levels of leptin, insulin and cortisol in healthy subjects. *Horm Res* 2000; 54: 174-180.

**Wiltbank** MC, Fricke PM, Sangsritavong S, Sartori R, Ginther OJ. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2000; 83: 2998-3007.

**Zarazaga** LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim Reprod Sci* 2005; 87: 253-267.

## VII. INSULINA COMO REGULADOR DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA LUTENIZANTE

### 7.1 INTRODUCCIÓN

En diferentes especies se ha observado que la nutrición puede modificar diferentes aspectos de la reproducción. En general, la nutrición está relacionada con la presentación y duración del anestro estacional (Estrada, 2007; Zarazaga *et al.*, 2005), el desarrollo folicular (Espinosa *et al.*, 2003; Mani *et al.*, 1996; Rondina *et al.*, 2005), la presentación de ciclos estrales de duración normal (Kusina *et al.*, 2001; Zarazaga *et al.*, 2005) y la concentración circulante de diferentes hormonas (Al-Azraqi, 2007; Matsuyama *et al.*, 2004). Entre las diferentes hormonas que son modificadas por la nutrición está la secreción pulsátil de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)-Hormona Luteinizante (LH). El efecto que la nutrición puede tener sobre la frecuencia pulsátil de LH puede verse modificado por el estado energético de un animal. En la especie caprina, existe una disminución en la frecuencia de pulsos pero sólo en animales con una menor cantidad de reservas corporales de energía (Tanaka *et al.*, 2002). Adicionalmente, al parecer la actividad reproductiva sólo puede ser influenciada por la nutrición durante fases de transición a las épocas de anestro y/o reproductiva, en comparación a lo observado durante plena época reproductiva (Estrada *et al.*, 2005; Mani *et al.*, 1996).

La razón de la modificación en la secreción de LH no está aclarada completamente; se ha sugerido que entre las diferentes hormonas y metabolitos, insulina podría jugar un papel clave en la regulación de la secreción de esta hormona. Aunque en estudios en rumiantes se han reportado efectos adversos de la insulina sobre la frecuencia pulsátil de LH, los resultados podrían deberse a la hipoglucemia resultante de la administración de esta hormona y no por un efecto directo de la insulina (Clarke *et al.*, 1990; Matsuyama *et al.*, 2004; Ohkura *et al.*, 2004). Por lo anterior, este trabajo analizó la función de insulina sobre la regulación de la secreción de LH y su modulación por el índice de masa corporal y diferente etapa reproductiva.

## **7.2 HIPÓTESIS**

“Una condición hiperinsulinémica-euglicémica modificará la secreción de LH y la respuesta será modulada por el estado energético estático y/o etapa del ciclo reproductivo anual”

## **7.3 OBJETIVOS**

Analizar la función de insulina sobre la regulación de la secreción de LH en cabras y su modulación por el estado energético estático (IMC) y/o etapa del ciclo reproductivo anual.

Determinar la sensibilidad a diferente dosis exógena de insulina sobre la secreción de LH.

## **7.4 MATERIAL Y MÉTODOS**

Se emplearon 3 cabras de cada grupo de IMC (IMCA=  $\geq 10$  e IMCB=  $\leq 9.5$ ) con las características ya descritas con anterioridad (ovariectomizadas y con implante conteniendo  $17\beta$ -estradiol), durante la época reproductiva (diciembre-enero) y de transición al anestro (febrero-marzo). Se obtuvieron muestras seriadas de sangre (c/10 min por 8 h) a partir de 2 h posteriores al consumo del alimento de la mañana. Estas muestras fueron obtenidas durante 4 horas previas y 4 h posteriores a la administración iv repetida de insulina, manteniendo la euglicemia. Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales y para la obtención de estas muestras se insertaron cánulas en ambas yugulares. La vena yugular izquierda se empleó para la obtención de muestras sanguíneas y la derecha para la infusión de glucosa. A las 4 h de iniciar la toma de muestras y hasta su término, se administró cada 30 minutos una de dos dosis iv de insulina bovina (0.08 y 0.16 U/kg PV; Sigma<sup>®</sup>, St Louis MO)(Figura 1). De manera conjunta, para mantener la euglicemia, durante el periodo de administración de insulina se administró de manera intravenosa una solución de glucosa al 10%. La insulina administrada fue

diluida previamente en una solución estéril de cloruro de sodio al 0.9% y la glucosa se administró mediante una bomba peristáltica (Masterflex Modelo 07523-60). La concentración de glucosa se mantuvo al valor promedio  $\pm 10\%$ , calculado de muestras obtenidas a los 10, 5 y 0 minutos, previo a la primera administración de insulina (Mashek *et al.*, 2001). Para lograr lo anterior, la concentración de glucosa se determinó colectando muestras sanguíneas cada 2.5 minutos y analizándolas en un glucómetro portátil (One<sup>®</sup> Touch<sup>®</sup> Ultra 2; Johnson & Johnson) y ajustando manualmente la tasa de infusión de la solución con glucosa. Para mejorar la precisión de este procedimiento, se titularon previamente las respuestas glicémicas individuales a cada dosis de insulina, así como las tasas de infusión de glucosa correspondientes para mantener la condición de euglicemia. Se permitió un descanso en las cabras de al menos siete días entre cada procedimiento con cada una de las dosis de insulina y estos fueron realizados manteniendo dos animales juntos para evitar el estrés por aislamiento (Tilbrook *et al.*, 1999).

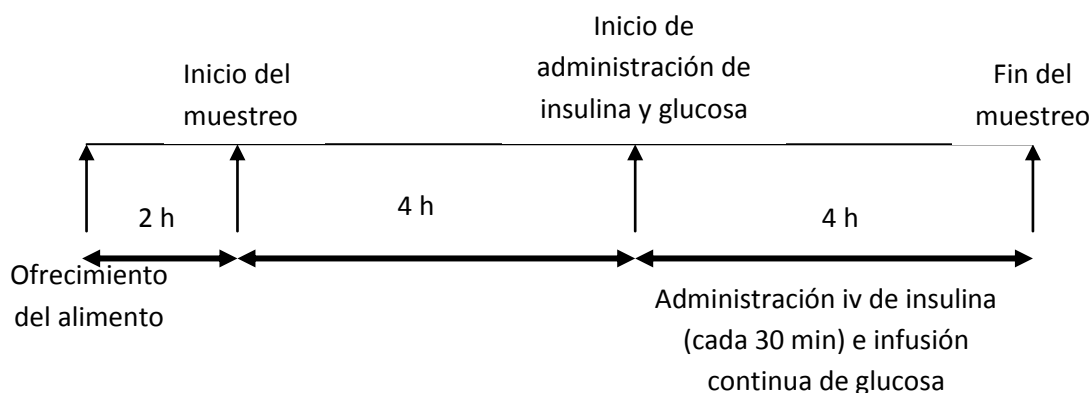


Figura 1. Esquema de muestreo y administración de glucosa e insulina

Las muestras de sangre colectadas fueron transferidas a tubos con EDTA y mantenidas a 4 °C hasta ser centrifugadas a 3000 rpm x 15 minutos, para la obtención de plasma, que posteriormente se almacenó a -20 °C hasta ser analizado en el laboratorio. Adicionalmente, una alícuota de la muestra fue depositada en tubos conteniendo fluoruro de sodio y oxalato de potasio, cuyo

plasma fue destinado para determinar la concentración de glucosa. En muestras que se obtuvieron cada 60 min se determinaron las concentraciones de leptina, insulina y glucosa (510A, Sigma, St. Louis, MO, USA). Adicionalmente, en las muestras colectadas c/10 min se determinaron las concentraciones de LH.

La concentración de leptina se determinó empleando estuches comerciales (Linco Research, St. Charles Missouri). El límite de detección fue de 0.36 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 9% y 10.8%, respectivamente.

La concentración de insulina se determinó mediante un RIA de fase líquida en un solo ensayo. El límite de detección fue de 0.02 ng/ml y el CV intraensayo fue de 10.5%.

Para la determinación de la concentración de LH, se empleó un RIA heterólogo de doble anticuerpo. El límite de detección fue de 0.3 ng/ml y los CV intra e interensayo fueron de 12.2 y 13.1%, respectivamente. A partir de las concentraciones plasmáticas de LH se caracterizaron los patrones pulsátiles de la hormona mediante el programa PULSAR. Las variables de respuesta consideradas para esta hormona fueron: concentración promedio, concentración basal, frecuencia pulsátil y amplitud de pulsos.

La concentración de glucosa en plasma se determinó cuantitativamente mediante un análisis enzimático, empleando un kit comercial (Glucose HK assay kit; Sigma<sup>®</sup>, St Louis MO) y las lecturas se realizaron en un fotómetro de microplacas (Multiscan<sup>®</sup> RC).

Los análisis estadísticos iniciales consideraron sólo los datos obtenidos con el empleo de una dosis alta de insulina, para evaluar la respuesta a esta hormona. La frecuencia de pulsos y amplitud de pulsos de LH, además de la concentración basal y los promedios de la concentración plasmática de LH, leptina, insulina y glucosa fueron analizadas empleando un diseño de parcelas divididas, incluyendo al IMC (alto y bajo) como efecto de parcela grande y como efectos de subparcela, la administración de insulina (previo o posterior al tratamiento) y la etapa de la época reproductiva (reproductiva o de transición al anestro), además de sus

diferentes interacciones dobles entre estos factores. Los datos de la frecuencia de pulsos de LH fueron transformados (raíz cuadrada de  $y + 0.5$ ) para su análisis estadístico. El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y = \mu + M_i + \text{anim}(M) + A_j + (M^*A)_{ij} + E_k + (M^*E)_{ik} + (A^*E)_{jk} + E_{ijk}$$

Donde:

Y= Variable de respuesta

$\mu$ = Media general

$M_i$ = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento de índice de masa corporal (parcela grande, donde  $i$ = Alto o Bajo)

Anim(M)= Error asociado a la parcela grande

$A_j$ = Efecto asociado al  $j$ -ésimo tratamiento de administración de insulina (donde  $j$ = periodo previo o posterior a la administración)

$(M^*A)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el índice de masa corporal y la administración de insulina

$E_k$ = Efecto del  $k$ -ésimo tratamiento de época del año (donde  $k$ = época reproductiva o transición al anestro)

$(M^*E)_{ik}$ = Efecto de la interacción entre el índice de masa corporal y la época del año

$(A^*E)_{jk}$ = Efecto de la interacción entre la administración de insulina y la época del año

$E_{ijkl}$ = Error experimental

Adicionalmente, para determinar la sensibilidad a diferentes dosis de insulina, los datos fueron analizados sólo para el periodo posterior a la administración de insulina. Para ello, el modelo estadístico incluyó al IMC (bajo o alto) como parcela grande y los efectos de dosis de insulina (baja y alta), época (reproductiva o transición al anestro) y sus diferentes interacciones dobles como efectos de subparcela.

## 7.5 RESULTADOS

Considerando durante esta primera parte sólo el efecto de la dosis alta de insulina empleada, se observa que la administración de esta hormona aumentó la concentración plasmática de insulina sin afectar la de glucosa (Cuadros 1 y 2).

El referente de la actividad reproductiva, es decir, la frecuencia de pulsos de LH, fue afectada por los tres diferentes factores estudiados: IMC, Administración de insulina y Época (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, administración de insulina y época y sus interacciones dobles sobre la secreción de LH, leptina, insulina y glucosa de cabras**

	IMC	ADM	EPO	IMCxADM	IMCxEPO	ADMxEPO
LH Pulsos	<b>0.042</b>	<b>0.057</b>	<b>0.037</b>	0.499	0.214	0.607
LH Amplitud	0.998	0.602	0.537	0.537	0.450	0.340
LH Prom	0.117	0.612	0.126	0.434	<b>0.004</b>	0.549
LH Basal	0.118	0.561	0.200	0.567	<b>0.005</b>	0.723
Leptina	0.252	0.476	<b>0.046</b>	<b>0.063</b>	<b>0.007</b>	<b>0.038</b>
Insulina	0.380	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.028</b>	0.383	0.166	0.497
Glucosa	<b>0.047</b>	0.690	<b>0.027</b>	0.340	0.569	0.114

IMC= Índice de masa corporal; ADM= Administración de insulina; EPO= Época

**Cuadro 2. Valores promedio de características de secreción de LH, leptina, insulina y glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal, administración de insulina, diferente dosis de insulina y época (medias mínimo cuadráticas)**

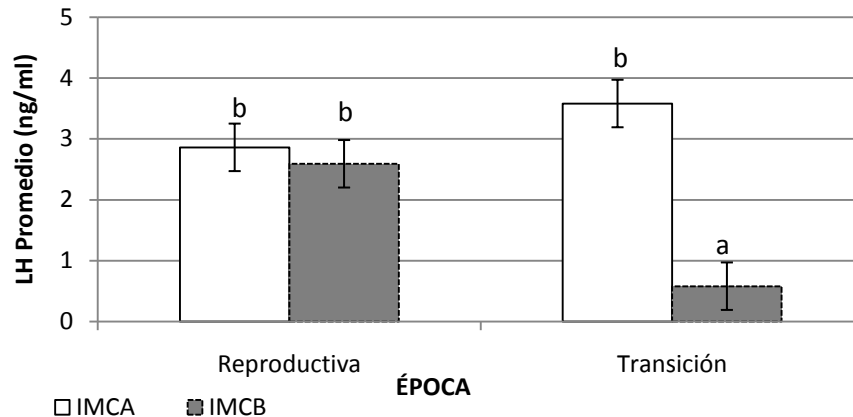
	INDICE DE MASA CORPORAL		ADMINISTRACIÓN DE INSULINA		ÉPOCA	
	IMCA	IMCB	Periodo previo	Periodo posterior	Reprod	Transición
LH Pulsos/4h	3.42±0.36 <sup>a</sup>	1.92±0.36 <sup>b</sup>	3.33±0.37 <sup>a</sup>	2.00±0.37 <sup>b</sup>	3.33±0.37 <sup>a</sup>	2.00±0.37 <sup>b</sup>
LH Amp (ng/ml)	3.11±0.62	3.11±0.72	2.96±0.38	3.26±0.42	2.91±0.38	3.31±0.46
LH Prom (ng/ml)	3.22±0.58	1.59±0.58	2.51±0.28	2.30±0.28	2.73±0.28	2.08±0.28
LH Basal ng/ml	2.82±0.52	1.34±0.52	2.19±0.25	1.97±0.26	2.32±0.26	1.84±0.26
Leptina (ng/ml)	1.38±0.12	1.16±0.12	1.25±0.04	1.29±0.04	1.34±0.04 <sup>a</sup>	1.21±0.04 <sup>b</sup>
Insulina (ng/ml)	3.48±0.46	2.83±0.46	1.06±0.25 <sup>a</sup>	5.25±0.25 <sup>b</sup>	2.71±0.25 <sup>a</sup>	3.60±0.25 <sup>b</sup>
Glucosa (mg/dl)	74.96±3.45 <sup>a</sup>	61.09±3.45 <sup>b</sup>	67.69±1.16	68.36±1.16	65.97±1.16 <sup>a</sup>	70.07±1.16 <sup>b</sup>

Diferente literal entre grupos de un mismo factor indica diferencia estadística significativa (Ver cuadro 1).

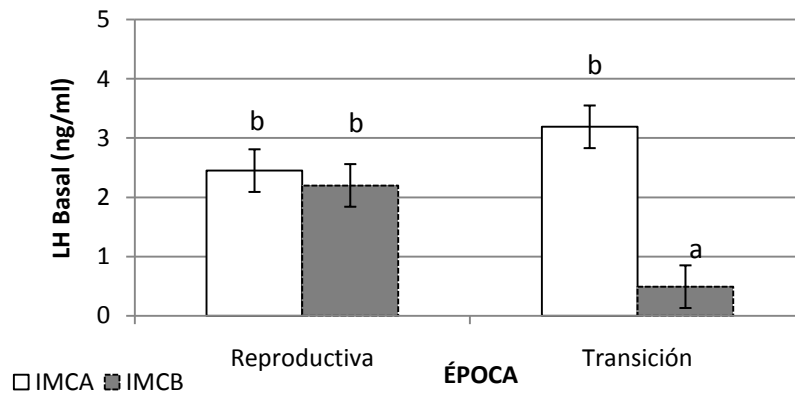
IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

La condición hiperinsulinémica/euglicémica deprimió la frecuencia pulsátil de LH. La época al igual que en el estudio previo, afectó diferentes variables. Además de modificar la frecuencia de pulsos de LH (Cuadro 2), en asociación con el IMC provocó diferencias en la concentración promedio y basal de esta hormona.

Ambas variables no mostraron modificación durante la época reproductiva en ambos grupos de IMC; sin embargo en época de transición, la concentración fue mayor en animales con un IMCA vs IMCB (Gráficas 1 y 2).



**Gráfica 1. Concentración promedio de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época (P=0.004).** IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

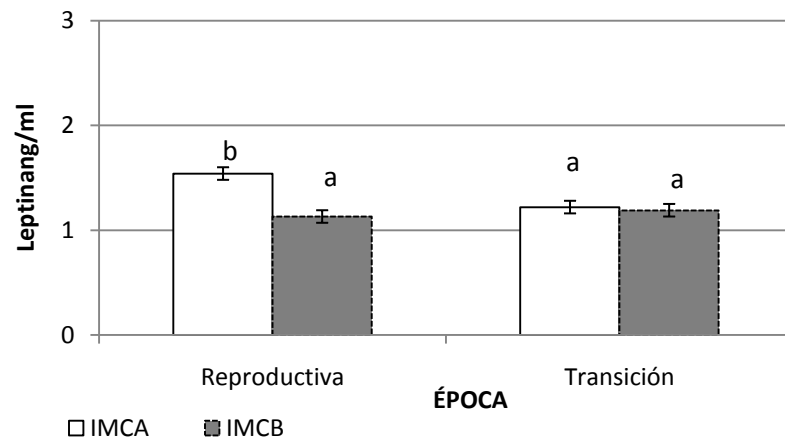


**Gráfica 2. Concentración basal de LH en cabras con diferente índice de masa corporal, durante la época reproductiva o de transición al anestro (P=0.005).** IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

Insulina y glucosa también fueron afectadas por el factor época, existiendo una mayor concentración plasmática de ambas variables en época de transición vs época reproductiva (Cuadro 2). Leptina fue modificada por la época y su interacción con los otros dos factores, IMC y la administración de insulina. Existió diferencia en la concentración plasmática de esta hormona entre ambos grupos de

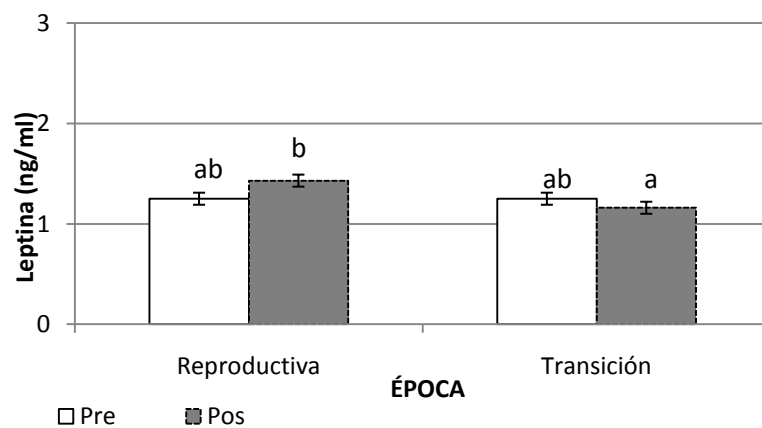


IMC pero solamente durante la época reproductiva (Gráfica 3). Adicionalmente, aunque la concentración de leptina fue similar previo y posterior a la administración de insulina en ambas épocas, la concentración durante el periodo hiperinsulinémico fue mayor en época reproductiva vs la época de transición (Gráfica 4).



**Gráfica 3. Concentración plasmática de leptina en cabras con diferente índice de masa corporal y en época reproductiva o de transición al anestro (P=0.007)**

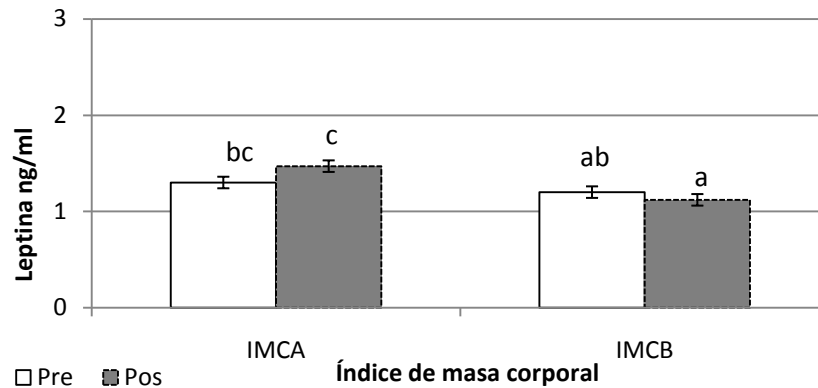
IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo



**Gráfica 4. Concentración plasmática de leptina en cabras durante el periodo previo y posterior a la administración de insulina en época reproductiva o de transición (P=0.007)**

Pre= Periodo previo a la administración de insulina; Pos= Periodo posterior a la administración de insulina

Finalmente, sólo durante el periodo hiperinsulinémico se observaron mayores concentraciones de leptina en animales con un IMCA vs IMCB (Gráfica 5).



**Gráfica 5. Concentración de leptina en cabras con diferente índice de masa corporal durante el periodo previo y posterior a la administración de insulina (P=0.063)**

IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo; Pre= Periodo previo a la administración de insulina; Pos= Periodo posterior a la administración de insulina

El IMC modificó la frecuencia de pulsos y de glucosa, observándose mayores valores para aquellas cabras con mayores reservas corporales de energía vs las de menor cantidad (Cuadro 2).

La interacción entre los factores IMC y Época, afectó el indicador de las reservas corporales de energía de las cabras, el valor de IMC. Aunque en ambas épocas se observaron diferencias entre los dos grupos de IMC, la diferencia fue ligeramente mayor en la época de transición (Gráfica 6).

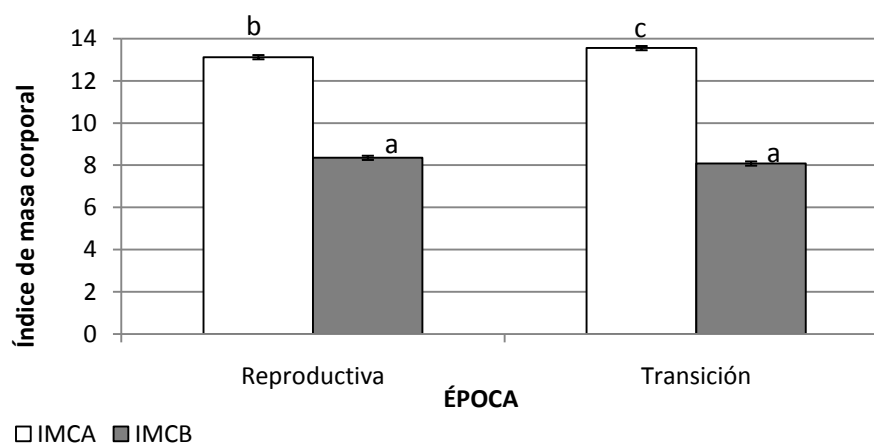
Mientras que insulina mostró una correlación negativa con la frecuencia de pulsos, glucosa lo hizo de manera positiva, y mostrando correlación con todas las diferentes variables de LH. EL IMC también mostró una correlación positiva con la frecuencia de pulsos, concentración promedio y basal de LH (Cuadro 4).

**Cuadro 3. Valores de índice de masa corporal para los factores índice de masa corporal, dosis de insulina administrada y época del año y valores de probabilidad para sus diferentes interacciones**

		IMC
<b>IMC</b>	IMCA	13.33±0.39 <sup>a</sup>
	IMCB	8.22±0.39 <sup>b</sup>
<b>Dosis</b>	Baja	10.82±0.07
	Alta	10.73±0.07
<b>Época</b>	Reproductiva	10.73±0.07
	Transición	10.82±0.07
<b>Interacción</b>		<b>Valor de P</b>
<b>IMCxDosis</b>		0.87
<b>IMCxEPO</b>		<b>0.004</b>
<b>DosisxEPO</b>		0.27

<sup>ab</sup>P<0.001

IMC= Índice de masa corporal; IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo; EPO= Época



**Gráfica 6. Índice de masa corporal en cabras con diferente cantidad de reservas corporales de energía, durante la época reproductiva o de transición al anestro (P=0.004).** IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

Al hacer los análisis incluyendo las dos diferentes dosis empleadas de insulina sólo durante el periodo de administración de esta hormona (4 horas), fue posible visualizar la sensibilidad que puede existir a estas diferentes dosis. Este factor modificó las respuestas en la concentración promedio y basal de LH, además de la concentración de insulina (Cuadro 5). Ambas concentraciones de LH fueron deprimidas con una dosis alta de insulina, mientras que la concentración plasmática de insulina fue mayor con la dosis alta vs la dosis baja de esta hormona (Cuadro 6).

**Cuadro 4. Coeficiente de correlación y valor de probabilidad para las variables asociadas a LH, leptina, insulina y glucosa en cabras**

	Leptina	Insulina	Glucosa	LH pulsos	LH prom	LH Basal	LH Amplitud	IMC
Leptina	1.00	0.147	0.234	0.218	0.096	0.082	0.077	<b>0.479</b>
		0.32	0.11	0.14	0.52	0.58	0.63	<b>&lt;0.001</b>
Insulina	0.147	1.00	0.207	<b>-0.253</b>	0.015	0.020	0.018	0.212
		0.32	0.16	<b>0.08</b>	0.92	0.89	0.91	0.15
Glucosa	0.234	0.207	1.00	0.123	<b>0.643</b>	<b>0.652</b>	<b>0.599</b>	<b>0.693</b>
		0.11	0.16	0.41	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.001</b>
LH pulsos	0.218	<b>-0.253</b>	0.123	1.00	<b>0.542</b>	<b>0.503</b>	<b>0.322</b>	<b>0.456</b>
		0.14	0.41		<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.04</b>	<b>0.001</b>
LH prom	0.096	0.015	<b>0.643</b>	<b>0.542</b>	1.00	<b>0.996</b>	<b>0.796</b>	<b>0.547</b>
		0.52	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>		<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.001</b>
LH Basal	0.082	0.020	<b>0.652</b>	<b>0.503</b>	<b>0.996</b>	1.00	<b>0.760</b>	<b>0.537</b>
		0.58	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0003</b>	<b>&lt;0.0001</b>		<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.001</b>
LH Amplitud	0.077	0.018	<b>0.599</b>	<b>0.322</b>	<b>0.796</b>	<b>0.760</b>	1.00	<b>0.302</b>
		0.63	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.04</b>	<b>0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>		<b>0.05</b>
IMC	<b>0479</b>	0.212	<b>0.693</b>	<b>0.456</b>	<b>0.547</b>	<b>0.537</b>	<b>0.302</b>	
	<b>&lt;0.001</b>	0.15	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.05</b>	

**Cuadro 5. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, dosis de insulina y época y sus interacciones sobre la secreción de LH, leptina, insulina y glucosa durante las 4 h de administración de insulina en cabras**

	IMC	Dosis	EPO	IMCxDOSIS	IMCxEPO	DOSISxEPO
LH Pulsos	<b>0.022</b>	0.300	0.117	0.758	0.494	0.829
LH Amplitud	0.639	0.962	0.163	0.225	0.224	<b>0.033</b>
LH Prom	<b>0.086</b>	<b>0.066</b>	0.575	0.180	<b>0.006</b>	0.320
LH Basal	<b>0.094</b>	<b>0.060</b>	0.729	0.237	<b>0.007</b>	0.430
Leptina	<b>0.078</b>	0.780	<b>0.005</b>	0.867	0.527	0.713
Insulina	<b>0.067</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.018</b>	0.460	0.512	0.852
Glucosa	<b>0.032</b>	0.746	<b>0.042</b>	<b>0.080</b>	0.717	0.151

IMC= Índice de masa corporal; EPO= Época

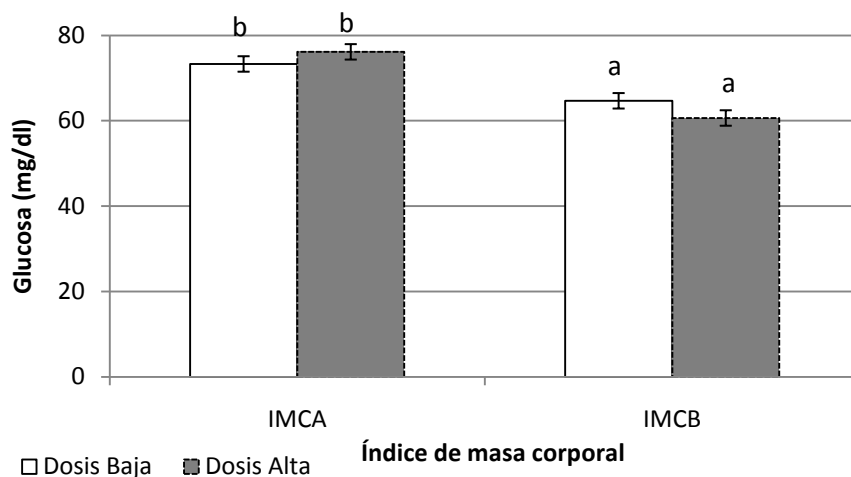
Adicionalmente, la dosis en interacción con el IMC modificó la concentración de glucosa. Aunque la diferente dosis no modificó la concentración de este combustible metabólico en animales con el mismo IMC, la concentración fue mayor en animales con un IMCA vs IMCB y la diferencia entre grupos de IMC fue mayor para la dosis alta (Gráfica 7).

La época nuevamente modificó las respuestas en la concentración circulante de leptina, insulina y glucosa. La concentración de leptina fue mayor en época reproductiva vs en transición, mientras que las concentraciones plasmáticas de insulina y glucosa fueron mayores durante la época de transición vs la reproductiva (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Valores promedio de secreción de LH, leptina, insulina y glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal, dosis administrada de insulina y en diferente época, posterior a la administración de insulina (medias mínimo cuadráticas)**

	ÍNDICE DE MASA CORPORAL		DOSIS DE INSULINA		ÉPOCA	
	IMCA	IMCB	Alta	Baja	Reprod	Transic
LH Pulsos/4h	3.00±0.28 <sup>a</sup>	1.83±0.28 <sup>b</sup>	2.00±0.47	2.83±0.47	3.00±0.47	1.83±0.47
LH Amp (ng/ml)	3.51±0.59	3.02±0.76	3.25±0.36	3.28±0.38	2.82±0.32	3.71±0.44
LH Prom (ng/ml)	3.90±0.65 <sup>a</sup>	1.81±0.65 <sup>b</sup>	2.30±0.39 <sup>a</sup>	3.41±0.39 <sup>b</sup>	3.01±0.39	2.70±0.39
LH Basal (ng/ml)	3.48±0.62 <sup>a</sup>	1.56±0.62 <sup>b</sup>	1.97±0.37 <sup>a</sup>	3.06±0.37 <sup>b</sup>	2.61±0.37	2.42±0.37
Leptina (ng/ml)	1.47±0.10 <sup>a</sup>	1.14±0.10 <sup>b</sup>	1.29±0.05	1.31±0.05	1.43±0.05 <sup>a</sup>	1.18±0.05 <sup>b</sup>
Insulina (ng/ml)	4.89±0.36 <sup>a</sup>	3.62±0.36 <sup>b</sup>	5.25±0.28 <sup>a</sup>	3.25±0.28 <sup>b</sup>	3.72±0.28 <sup>a</sup>	4.78±0.28 <sup>b</sup>
Glucosa (mg/dl)	74.69±2.64 <sup>a</sup>	62.62±2.64 <sup>b</sup>	68.36±1.28	68.96±1.28	66.62±1.28 <sup>a</sup>	70.69±1.28 <sup>b</sup>

Diferente literal entre grupos de un mismo factor indica diferencia estadística significativa (Ver cuadro 5). IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

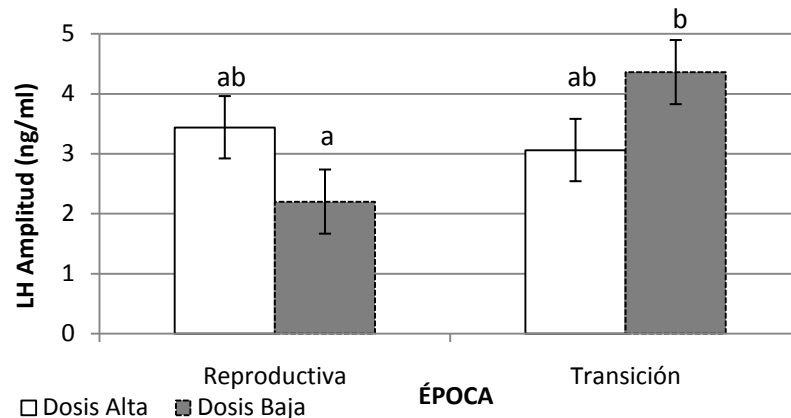


**Gráfica 7. Concentración de glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal y dosis de insulina, posterior a su administración (P=0.08).**

IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

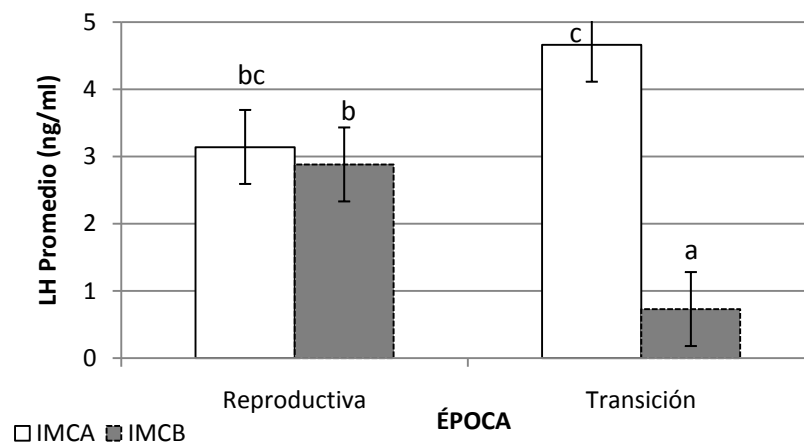
Por otro lado, la época en interacción con la dosis modificó la amplitud de los pulsos de LH y en interacción con el IMC afectó las concentraciones promedio y basales de LH. Aunque no existió diferencia en la amplitud de LH entre las dosis empleadas durante la época reproductiva o de transición, la amplitud en el grupo

con una dosis baja de insulina durante la transición fue mayor a lo visto en el mismo grupo durante la época reproductiva (Gráfica 8).

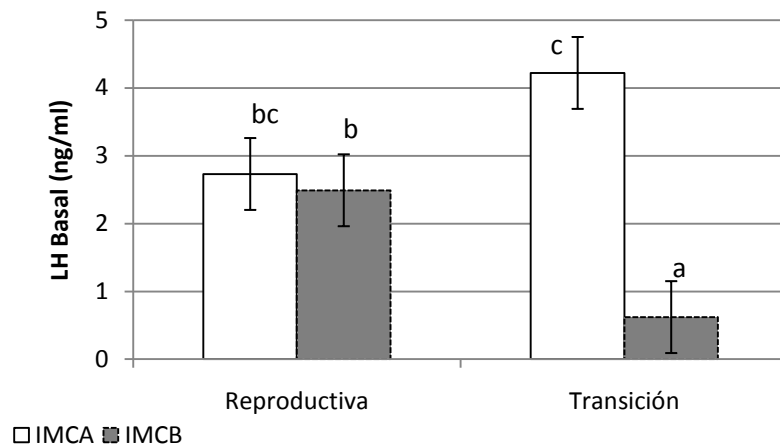


**Gráfica 8. Amplitud de pulsos de LH en cabras con diferente dosis administrada de insulina y en diferente época, posterior a la administración de insulina (P=0.33)**

Para la concentración promedio y basal de LH, durante la época reproductiva no existieron diferencias entre ambos grupos de IMC, mientras que en la época de transición la concentración fue mayor en animales con una mayor cantidad de reservas energéticas en comparación a lo observado en el grupo con un índice de masa corporal bajo (Gráficas 9 y 10).



**Gráfica 9. Concentración promedio de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época, posterior a la administración de insulina (P=0.006).**  
 IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo



**Gráfica 10. Concentración basal de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época, posterior a la administración de insulina (P=0.007).** IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

El IMC provocó diferencias en la frecuencia de pulsos de LH y en la concentración plasmática de leptina e insulina, además de los efectos ya descritos en asociación con la dosis de insulina y la época. En las tres variables de respuesta los valores fueron mayores para animales con un IMCA vs un IMCB (Cuadro 6).

La cantidad de glucosa administrada durante el periodo de aplicación de insulina, sólo fue diferente debido a la dosis de insulina administrada; con el uso de una dosis alta se administró mayor cantidad de glucosa en comparación a la dosis baja (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Cantidad de glucosa administrada durante el periodo de aplicación de insulina, a cabras con diferente índice de masa corporal, dosis de insulina, época y valores de probabilidad para las diferentes interacciones dobles**

		Glucosa infusionada (g/kg PV)*
<b>IMC</b>	IMCA	0.74±0.10
	IMCB	0.89±0.10
<b>Dosis</b>	Baja	<b>0.71±0.05<sup>a</sup></b>
	Alta	<b>0.92±0.05<sup>b</sup></b>
<b>Época</b>	Reproductiva	0.80±0.05
	Transición	0.83±0.05
<b>Interacción</b>		<b>Valor de P</b>
	IMCxDosis	0.430
	IMCxEPO	0.855
	DosisxEPO	0.964

\*Medias mínimo cuadráticas±ee para los diferentes factores. <sup>ab</sup>Diferencia estadística significativa P=0.014. IMC= Índice de masa corporal; IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo; EPO= Época

## 7.6 DISCUSIÓN

Una hormona que ha sido sugerida como señalizador para regular la secreción de GnRH-LH es insulina (Clarke *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 2002). La administración exógena de esta hormona en ovejas puede disminuir la concentración plasmática de LH (Clarke *et al.*, 1990) o una disminución en la actividad del generador de pulsos de GnRH (Ohkura *et al.*, 2004). Sin embargo, es probable que los efectos negativos que se han observado con su aplicación en rumiantes puedan deberse a la hipoglucemia resultante y no a la insulina misma. Sin embargo, en este estudio empleando un estado de hiperinsulinemia-euglicémica se presentaron resultados similares.

En los rumiantes domésticos, la frecuencia de pulsos de LH es el determinante de la presentación de su actividad reproductiva. Al igual que ha sido reportado en estudios previos (Clarke *et al.*, 1990; Ohkura *et al.*, 2004), insulina provocó efectos adversos sobre la frecuencia de pulsos de la hormona luteinizante. A diferencia de los estudios anteriores, los resultados de este trabajo sugieren que el efecto depresor de insulina sobre la frecuencia pulsátil de LH no puede atribuirse a una hipoglicemia, ya que la concentración de glucosa no se modificó con la administración de la hormona. La concentración plasmática de



glucosa pudo mantenerse dentro del rango fisiológico de esta especie mediante su infusión lo que sugiere que el resultado observado en la frecuencia pulsátil puede deberse de manera directa a la administración de insulina.

Adicionalmente, se observaron efectos ya reportados con anterioridad del IMC y la época, sobre la frecuencia de pulsos de LH. En cabras se ha descrito que una pobre cantidad de reservas corporales de energía podrían ser insuficientes para mantener la actividad del generador de pulsos de GnRH-LH (Tanaka *et al.*, 2002). Adicionalmente, la frecuencia disminuyó en época de transición, lo cual es una situación que se presenta en especies con reproducción estacional. A medida que se acerca el periodo de anestro, las cabras disminuirán paulatinamente su frecuencia de pulsos de LH, lo cual las lleva gradualmente a suspender su actividad ovulatoria durante este periodo.

Al igual que en el estudio anterior, la época determinó cambios en la concentración plasmática promedio y basal de LH en cabras con diferente IMC. Durante la época de transición, el grupo con un IMCB no pudo mantener su concentración promedio y basal a los niveles mostrados durante la época reproductiva. Así, mientras que durante la época reproductiva se mantiene la concentración promedio y basal de LH sin importar la cantidad de reservas corporales de energía, lo que indica el papel predominante del fotoperiodo, durante la época de transición esto no fue suficiente. De esta manera, la cantidad de reservas corporales de energía es crítica para poder mantener las concentraciones circulantes de esta hormona en un periodo crítico del ciclo reproductivo anual, lo cual podría determinar el continuar o detener el periodo de actividad ovulatoria cíclica en la especie caprina.

Es probable que los efectos provocados por insulina sobre la secreción de LH sean diferentes entre especies. En este estudio, la insulina causó en general, efectos adversos sobre parámetros de LH, mientras que en estudios empleando roedores, insulina favorece la secreción de LH (Burcelin *et al.*, 2003). Adicionalmente, es probable que el diseño experimental pueda explicar parte de las diferencias; en el estudio con roedores la administración de insulina se realizó

de manera constante durante 3 horas, administrando una dosis fija de glucosa de manera iv, mientras que en este estudio se empleo una dosis de insulina aplicada cada 30 minutos manteniendo la euglicemia. Por otro lado, Miller *et al.* (1995) observaron un aumento en la frecuencia de pulsos de LH en borregos que recibieron insulina o insulina + glucosa por infusión en el tercer ventrículo durante 12 h al día durante 4 días, por lo que el tiempo de exposición a esta hormona o el sitio de administración podrían ser también factores críticos para estimular la secreción de LH.

Una hormona secretada por los adipocitos y que está involucrada en múltiples aspectos fisiológicos como la reproducción es leptina (Brann *et al.*, 2002; Zieba *et al.*, 2005). Nuevamente, la época tienen un papel importante determinando su secreción en animales con un IMC diferente. Insulina tuvo un efecto estimulante en la secreción de leptina, aunque sólo lo hizo durante la época reproductiva. Se han reportado efectos favorables de insulina sobre la secreción de leptina en otras especies (Ishioka *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2000) y como se ha observado, al parecer tiene una mayor influencia durante la época reproductiva que durante la época de reproducción. Nuevamente, esto podría descartar el involucramiento directo de leptina en la actividad reproductiva de la especie durante este periodo de transición. El efecto estimulante de insulina sobre leptina podría presentarse sólo en animales con un IMCA, ya que en aquellos con menor cantidad de reservas de energía (IMCB) se observó una disminución.

Como era de esperarse, la administración repetida de insulina provocó una mayor concentración circulante de esta hormona en comparación al periodo previo. La cantidad requerida de glucosa para mantener un estado euglicémico sólo fue diferente, por la dosis empleada de insulina, requiriéndose de una mayor cantidad con el uso de una dosis alta de esta hormona, en comparación al uso de una dosis baja.

Glucosa es el combustible metabólico esencial para el aporte de energía de los seres vivos y se ha sugerido como uno de los señalizadores que podrían determinar la secreción de LH (Ohkura *et al.*, 2004). El área postrema en la

médula oblonga podría ser el glucosensor involucrado en la modulación de la secreción de LH (Murahashi *et al.*, 1996; Ohkura *et al.*, 2000). Como se indicó previamente, la concentración de glucosa pudo mantenerse dentro de los niveles fisiológicos circulantes en esta especie. Se observaron diferencias debido al IMC, lo que sustenta información ya reportada con anterioridad (Caldeira *et al.*, 2007; Gámez *et al.*, 2008).

Cuando se consideraron sólo los valores de los periodos en que se mantuvo la administración de insulina, se encontró que existe una sensibilidad diferente de acuerdo a las dos diferentes dosis empleadas, sobre la concentración promedio y basal de LH y la interacción de la dosis de insulina con la época afectó la amplitud de pulsos. Nuevamente se pone de manifiesto el efecto depresor de la dosis alta de insulina sobre la concentración promedio y basal de LH. Adicionalmente estas dos variables presentaron resultados similares a los resultados iniciales producto de la interacción IMC x Época. La amplitud de pulsos sólo aumentó durante la época de transición empleando una dosis baja de insulina. Así, insulina podría alterar diferentes parámetros de secreción de LH y la época podría modular estas respuestas.

En cuanto a la secreción de LH, existió una mayor frecuencia pulsátil en animales con un IMCA vs IMCB. Aunque las concentraciones plasmáticas de leptina e insulina fueron similares a los resultados previos, durante la administración de insulina, los efectos del IMC fueron significantes. La interacción de este factor con la dosis de insulina provocó diferencias que han sido reportadas previamente entre animales con un IMCA vs IMCB en la concentración de glucosa (Caldeira *et al.*, 2007). Sin embargo, el empleo de una dosis mayor de insulina causó una mayor diferencia en la concentración de glucosa entre ambos grupos de IMC. De esta manera, aquellos animales con un IMCB podrían ser más sensibles a la acción de insulina sobre la regulación de glucosa.

Nuevamente, se observa una correlación positiva entre glucosa y las diferentes variables asociadas a LH, similar a lo que ocurre con el IMC. Insulina se

correlacionó de manera negativa con la frecuencia de pulsos de LH, mientras que leptina no mostró ninguna correlación con esta hormona reproductiva.

## **7.7 CONCLUSIONES**

Una mayor cantidad de reservas corporales de energía en la especie caprina, favorece el mantenimiento de la secreción de LH en comparación a animales con menos reservas, durante la época de transición

Insulina tiene un efecto depresor directo no dependiente de glucosa sobre diferentes variables asociadas a la secreción de hormona luteinizante.

La época puede inducir cambios en la concentración de LH y hormonas metabólicas, en cabras con diferente IMC.

**Al-Azraqi** AA. Effect of fasting on luteal function, leptin and steroids concentration during estrous cycle in the goat in natural photo-status. *Anim Reprod Sci* 2007; 98: 343-349.

**Brann** DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD. Leptin and Reproduction. *Steroids* 2002; 67: 95-104.

**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. *Endocrinol* 2003; 144: 4484-4491.

**Caldeira** RM, Belo AT, Santos CC, Vazques MI, Portugal AV. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rumin Res* 2007; 68: 233-241.

**Clarke** IJ, Horton RJE, Doughton BW. Investigation of the mechanism by which insulin-induced hypoglycemia decreases luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinol* 1990; 127: 1470-1476.

**Estrada** CE, Urrutia MJ, Villagómez AE, Jiménez SH, Mejía G, Rivera LMT, Gámez VH, Basurto GR, Villa GA, Vera AH. Actividad lútea durante transición a anestro en cabras con índice de masa corporal alto o bajo sometidas o no a

restricción nutricional en fases. Memorias XLI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Morelos 2005; p. 108.

**Estrada CE.** Efecto de las reservas corporales de energía y de la restricción nutricional sobre la expresión de la transición reproductiva estacional en cabras criollas. Tesis Maestría en Ciencias. UNAM-FMVZ 2007; 97 p.

**Gámez VHG,** Rosales NCA, Bañuelos VR, Urrutia MJ, Díaz GMO, Silva RJM, Meza HCA. Leptin and glucose concentration of Creole does with different body condition scores (BCS) under tropical latitude (22°NL). Memorias 9<sup>th</sup> International Conference on Goats Aug 31-Sep 4, 2008; Querétaro México. p 328.

**Ishioka K,** Hatai H, Komabayashi K, Soliman MM, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M. Diurnal Variations of Serum Leptin in Dogs: Effects of Fasting and re-feeding. Vet J 2005; 169: 85-90.

**Kusina NT,** Chinuwot, Hamudikuwanda H, Ndlovu LR, Musanenhamo S. Effect of different dietary energy level intakes on efficiency of estrus synchronization and fertility in Mashoa goat does. Small Rumin Res 2001; 39: 283-288.

**Mani AU,** McKelvey WAC, Watson ED. Effect of undernutrition on gonadotropin profiles in non-pregnant cycling goats. Anim Reprod Sci 1996; 43: 25-33.

**Matsuyama S,** Ohkura S, Ichimaru T, Sakurai K, Tsukamura K, Maeda K, Okamura H. Simultaneous observation of the GnRH pulse generator activity and plasma concentrations of metabolites and insulin during fasting and subsequent refeeding periods in Shiba goats. J Reprod Dev 2004; 50: 697-704.

**Miller DW,** Blache D, Martin GB. The role of intracerebral insulin in the effect of nutrition on gonadotrophin secretion in mature male sheep. J Endocrinol 1995; 147-321-329.

**Murahashi K,** Bucholtz DC, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster DL. Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. Endocrinology 1996; 137:1171.

**Ohkura S,** Ichimaru T, Itoh F, Matsuyama S, Okamura H. Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. Endocrinol 2004; 145: 3239-3246.

**Tanaka** T, Akaboshi N, Inoue Y, Kamomae H, Kaneda Y. Fasting-induced supresión of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy status in ovariectomized goats. *Anim Reprod Sci* 2002; 72: 185-196.

**Tilbrook** AJ, Canny BJ, Serapiglia MD, Ambrose TJ, Clarke IJ. Suppression of the secretion of luteinizing hormone due to isolation/restraint stress in gonadectomised rams and ewes is influenced by sex steroids. *J Endocrinol* 1999; 160: 469-481

**Wagner** R, Oberste-Berghaus C, Herpertz S, Blum WF, Pelz B, Hebebrand H, Senf W, Mann K, Albers N. Time relationship between circadian variation of serum levels of leptin, insulin and cortisol in healthy subjects. *Horm Res* 2000; 54: 174-180.

**Zarazaga** LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim Reprod Sci* 2005; 87: 253-267.

**Zieba** DA, Amstalden M, Williams GL. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domestic Anim Endocrinol* 2005; 29: 166-185.

## VIII. GLUCOSA COMO REGULADOR DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE

### 8.1 INTRODUCCIÓN

En la especie caprina, se ha documentado que una condición de estrés nutricional como una restricción alimenticia o ayuno afecta de manera adversa aspectos reproductivos como la duración de la época reproductiva (Estrada, 2007; Zarazaga *et al.*, 2005), la frecuencia de pulsos de GnRH-LH (Matsuyama *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2002), el comportamiento estral y la ovulación (Tanaka *et al.*, 2004) y la presentación de ciclos estrales de duración normal (Rondina *et al.*, 2005; Zarazaga *et al.*, 2005).

Por otro lado, en la especie caprina los periodos de reproducción y de transición pueden modificar las respuestas reproductivas a la nutrición. A diferencia de lo que ocurre en plena época reproductiva, se ha observado que los periodos de transición las cabras muestran respuestas diferentes en su actividad reproductiva de acuerdo al nivel de consumo de alimento (Estrada, 2007). Esto sugiere que las respuestas de señales metabólicas involucradas con la reproducción o su interpretación, podrían ser diferentes de acuerdo a la etapa de la época reproductiva. La señal o las señales que comunican el estado nutricional de un individuo al sistema nervioso central y que provocan una alteración en la secreción de GnRH-LH no ha sido establecida de manera precisa, aunque se ha sugerido que glucosa podría ser esa señal. Adicionalmente, se ha reportado que el estado energético del animal podría determinar la respuesta de la nutrición sobre la frecuencia pulsátil de LH. Sólo cabras con una menor cantidad de reservas corporales de energía disminuyeron su frecuencia de pulsos de LH, después de un ayuno de 72h (Tanaka *et al.*, 2002).

La disponibilidad de glucosa a nivel del área postrema podría ser un elemento clave en la regulación de la secreción de la hormona luteinizante y los efectos de leptina sobre la reproducción podrían depender de la disponibilidad de este combustible, además de que esta hormona podría actuar como moduladora de señales asociadas a la disponibilidad de combustibles metabólicos (Schneider

*et al.*, 2000). Por ello, este estudio tuvo como objetivo evaluar la función de glucosa sobre la secreción de hormona luteinizante y su modulación por el IMC y la etapa del ciclo reproductivo anual.

## **8.2 Hipótesis**

“La disminución en la disponibilidad metabólica de glucosa afectará de manera adversa la secreción de LH, y la respuesta será modulada por el estado energético estático y/o la etapa del ciclo reproductivo anual”

## **8.3 Objetivos**

Determinar la función de glucosa sobre la regulación de la secreción de LH en cabras y su modulación por el estado energético estático (IMC) y/o la etapa del ciclo reproductivo anual

Determinar la sensibilidad a dos diferentes dosis de un inhibidor metabólico de la utilización de glucosa, sobre la secreción de LH

## **8.4 MATERIAL Y MÉTODOS**

En cabras divididas en dos grupos de índice de masa corporal, alto (IMCA,  $\geq 10$ ; n=3) y bajo (IMCB,  $\leq 9.5$ ; n=3), con las características descritas previamente (ovariectomizadas y con implante conteniendo  $17\beta$ -estradiol) y en la época reproductiva (noviembre-enero) y de transición al anestro (febrero-marzo) se evaluaron las características de secreción de LH, después de la aplicación de un inhibidor metabólico de la utilización de glucosa, la 2 Deoxy-D-glucosa (2DG; Sigma, St. Louis MO).

Las muestras sanguíneas se obtuvieron cada 10 min por 8 h, a partir de 2 h posteriores al consumo del alimento de la mañana. Estas muestras fueron obtenidas durante 4 h antes y 4 h después de administrar una de dos dosis iv de 2DG (550 y 620 mg/kg PV<sup>0.75</sup> diluido en solución salina fisiológica). Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales durante todo el periodo de muestreo para el cual fueron cateterizados en la yugular 12 horas antes. En cada una de las



cabras empleadas, se probaron las dos dosis de 2DG con un intervalo entre ambos muestreos de al menos dos semanas.

Las muestras de sangre colectadas fueron transferidas a tubos con EDTA, los cuales se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento para obtención de plasma, que posteriormente se almacenó a -20°C hasta ser analizado en el laboratorio. Adicionalmente, una alícuota de la muestra fue depositada en tubos conteniendo fluoruro de sodio y oxalato de potasio, cuyo plasma fue destinado para determinar la concentración de glucosa. En las muestras que se obtuvieron cada 60 min se determinaron las concentraciones de leptina, insulina y glucosa. Adicionalmente, en las muestras colectadas c/10 min se determinaron las concentraciones de LH.

La concentración plasmática de leptina se determinó mediante estuches comerciales (Linco Research St Charles MI). El límite de detección fue de 0.39 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 6.9 y 5.4%, respectivamente.

Para la determinación de las concentraciones de insulina se empleó un RIA de fase líquida en un mismo ensayo. El límite de detección fue de 0.02 ng/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue de 10.5%.

En el mismo laboratorio se determinó la concentración de LH, empleando un RIA heterólogo de doble anticuerpo. El límite de detección fue de 0.03 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 14.3 y 16.7%, respectivamente. Las variables de la hormona luteinizante generadas fueron: concentración promedio, concentración basal, frecuencia pulsátil y amplitud de los pulsos.

La concentración de glucosa en plasma se determinó cuantitativamente mediante un análisis enzimático, empleando un kit comercial (Glucose HK assay kit; Sigma<sup>®</sup>, St Louis MO), realizando las lecturas en un fotómetro de microplacas (Multiscan<sup>®</sup> RC, Labsystems).

Los primeros análisis estadísticos consideraron únicamente los valores obtenidos con una dosis alta de 2DG, para determinar la respuesta a este

producto. La frecuencia de pulsos y amplitud de pulsos de LH, concentración basal de LH y los promedios de LH, leptina, insulina y glucosa fueron analizados empleando un diseño de parcelas divididas, incluyendo al IMC (alto o bajo) como efecto de parcela grande y como efectos de subparcela a la administración del 2DG (antes y después) y la etapa de época reproductiva (reproductiva o transición al anestro), así como sus diferentes interacciones. Los datos de la frecuencia de pulsos de LH fueron transformados (raíz cuadrada de  $y + 0.5$ ) para su análisis estadístico.

$$Y = \mu + M_i + \text{anim}(M) + A_j + (M^*A)_{ij} + E_k + (M^*E)_{ik} + (A^*E)_{jk} + E_{ijk}$$

Donde:

Y= Variable de respuesta

$\mu$ = Media general

$M_i$ = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento de índice de masa corporal (parcela grande, donde  $i$ = Alto o Bajo)

Anim(M)= Error asociado a la parcela grande

$A_j$ = Efecto asociado al  $j$ -ésimo tratamiento de periodo de administración de 2DG (donde  $j$ = periodo previo o posterior a la administración)

$(M^*A)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el índice de masa corporal y la administración de 2DG

$E_k$ = Efecto del  $k$ -ésimo tratamiento de época del año (donde  $k$ = época reproductiva o transición al anestro)

$(M^*E)_{ik}$ = Efecto de la interacción entre el índice de masa corporal y la época del año

$(A^*E)_{jk}$ = Efecto de la interacción entre la administración de 2DG y la época del año

$E_{ijkl}$ = Error experimental

Posteriormente, con la finalidad de comparar la sensibilidad a diferentes dosis de 2DG, los promedios de LH, leptina, insulina y glucosa fueron analizados considerando únicamente el periodo posterior a la administración de 2DG. El modelo estadístico incluyó al IMC como parcela grande y los efectos de

administración de 2DG, dosis de 2DG, época y sus diferentes interacciones dobles como efectos de subparcela.

## 8.5 RESULTADOS

La disminución en la disponibilidad de glucosa (administración de 2DG en la dosis alta) provocó un aumento en las concentraciones de insulina y glucosa (Cuadros 1 y 2). Adicionalmente la administración de 2DG, en conjunto con el IMC, modificó la respuesta en la frecuencia de pulsos de LH.

**Cuadro 1. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, administración de 2DG y época y sus interacciones dobles sobre la secreción de LH, leptina, insulina y glucosa de cabras**

	IMC	ADM	EPO	IMCxADM	IMCxEPO	EPOxADM
LH Pulsos	0.189	0.241	0.971	<b>0.087</b>	<b>0.034</b>	0.541
LH Amplitud	0.991	0.675	0.784	0.707	0.380	0.812
LH Prom	0.172	0.384	0.653	0.399	<b>0.018</b>	0.744
LH Basal	0.182	0.254	0.687	0.268	<b>0.014</b>	0.776
Leptina	0.374	0.309	0.250	0.951	<b>&lt;0.001</b>	0.984
Insulina	0.114	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.063</b>	0.201	0.812	0.454
Glucosa	0.989	<b>&lt;0.001</b>	0.135	0.594	0.491	0.244

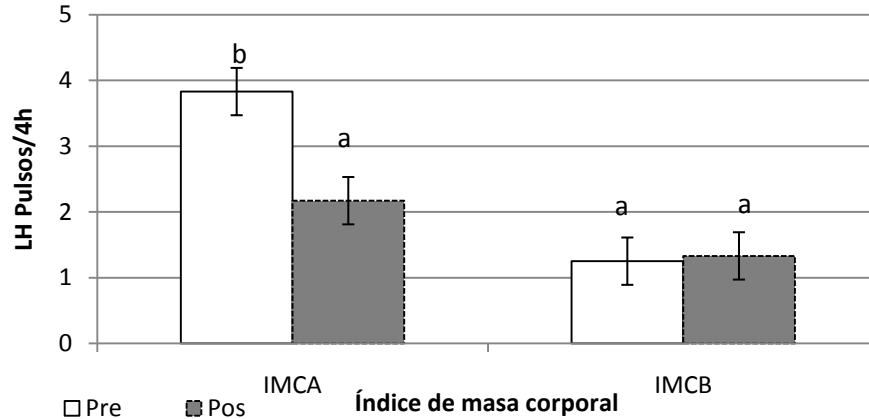
IMC= Índice de masa corporal; ADM= Administración de 2DG; EPO= Época

**Cuadro 2. Valores promedio de características de secreción de LH, leptina, insulina y glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal, administración de 2DG y época (medias mínimo cuadráticas)**

	INDICE DE MASA CORPORAL		ADMINISTRACION DE 2DG		ÉPOCA	
	IMCA	IMCB	Periodo previo	Periodo posterior	Reprod	Transición
LH Pulsos/4h	2.58±0.83	1.08±0.83	2.25±0.45	1.42±0.45	1.83±0.45	1.83±0.45
LH Amp (ng/ml)	1.11±0.24	1.12±0.59	1.21±0.37	1.02±0.22	1.05±0.22	1.18±0.37
LH Prom (ng/ml)	1.31±0.33	0.53±0.33	1.02±0.16	0.82±0.16	0.87±0.16	0.97±0.16
LH Basal (ng/ml)	1.15±0.30	0.46±0.30	0.92±0.14	0.69±0.14	0.77±0.14	0.85±0.14
Leptina (ng/ml)	1.35±0.27	1.74±0.27	1.59±0.06	1.50±0.06	1.50±0.06	1.59±0.06
Insulina (ng/ml)	0.69±0.06	0.52±0.06	0.36±0.05 <sup>a</sup>	0.85±0.05 <sup>b</sup>	0.68±0.05 <sup>a</sup>	0.53±0.05 <sup>b</sup>
Glucosa (mg/dl)	133.36±5.4	133.24±5.4	63.90±3.8 <sup>a</sup>	202.70±3.8 <sup>b</sup>	137.62±3.8	128.97±3.8

Diferente literal entre grupos de un mismo factor indica diferencia estadística significativa (Ver cuadro 1); IMCA=Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

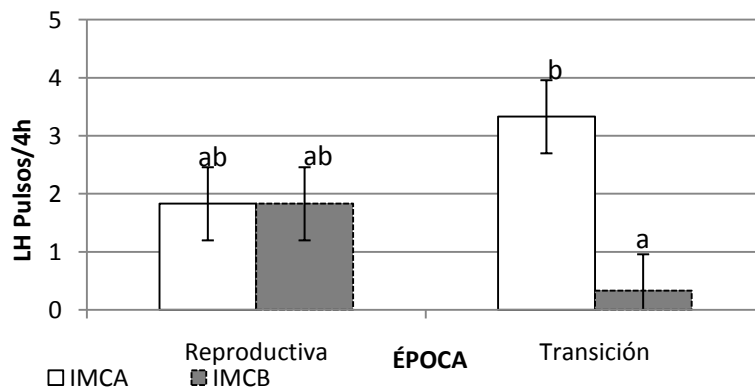
El periodo de disminución en la disponibilidad metabólica de glucosa tuvo un efecto depresor sobre la frecuencia de pulsos de LH, pero sólo en animales con un IMCA (Gráfica 1).



**Gráfica 1. Frecuencia de pulsos de LH en cabras con diferente índice de masa corporal, durante el periodo previo y posterior a la administración de 2DG (P=0.087).**

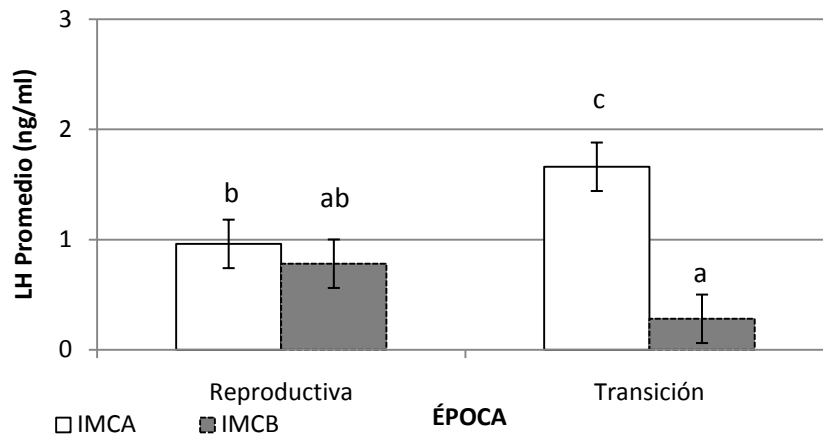
IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo; Pre= Periodo previo a la administración de 2DG; Pos= Periodo posterior a la administración de 2DG.

La época modificó la respuesta en la concentración plasmática de insulina, existiendo una mayor concentración en la época reproductiva vs en transición. Por otro lado este mismo factor y su interacción con el IMC, determinó cambios en la concentración promedio y basal de LH y la concentración plasmática de leptina en cabras con diferente IMC. Sólo durante la época de transición aumentó la frecuencia de pulsos, la concentración promedio y basal de LH en animales con un IMCA vs IMCB (Gráfica 2, 3 y 4).

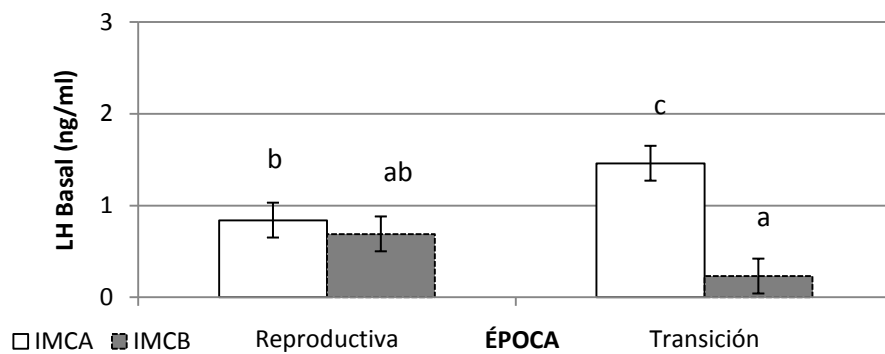


**Gráfica 2. Frecuencia de pulsos de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y diferente época del año (P=0.034).**

IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo.

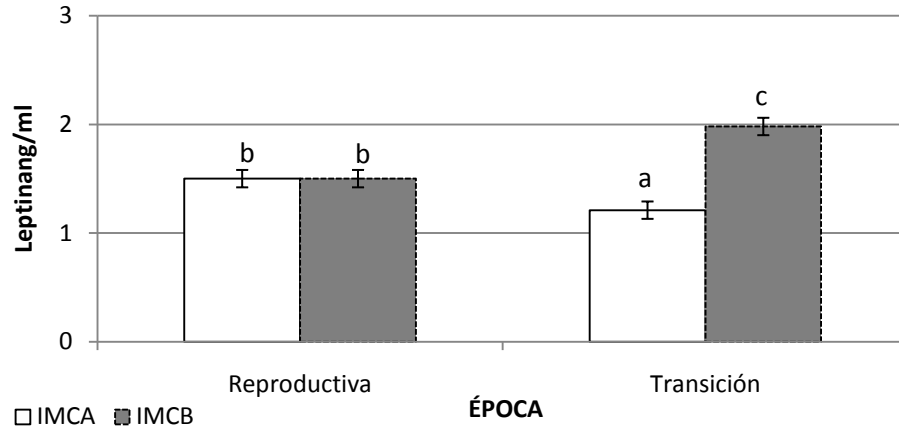


**Gráfica 3. Concentración plasmática promedio de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.018).**  
 IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo



**Gráfica 4. Concentración basal de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.014).**  
 IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

Finalmente, la concentración de leptina fue mayor en animales con un IMCB vs IMCA, aunque sólo durante la época de transición (Gráfica 5).



**Gráfica 5. Concentración plasmática de leptina en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P<0.001).**

IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

Cuando se consideraron en el análisis estadístico únicamente los valores del periodo posterior a la administración de 2DG y probando la diferente sensibilidad que pudiera existir a las dos diferentes dosis de 2DG administrada, se observaron efectos de estas dosis sólo sobre la frecuencia de pulsos de LH, glucosa y en interacción con el IMC, sobre la concentración plasmática de insulina. La frecuencia de pulsos fue deprimida en mayor medida con el uso de una dosis alta de 2DG, es decir, con una menor disponibilidad metabólica de glucosa, mientras que la concentración plasmática de glucosa fue mayor con el empleo de una dosis alta de 2DG vs una dosis baja (Cuadro 4).

**Cuadro 3. Valores de probabilidad del efecto de los factores índice de masa corporal, dosis de 2DG, época y sus interacciones dobles sobre la secreción de LH, leptina, insulina y glucosa de cabras**

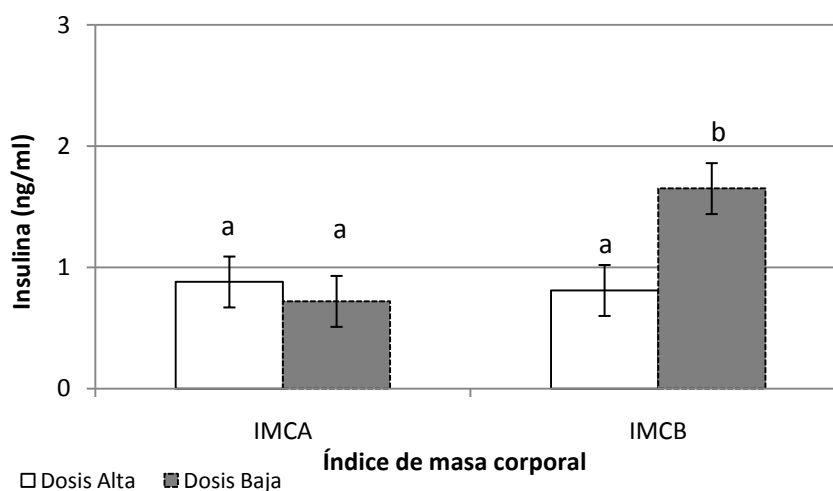
	IMC	Dosis	EPO	IMCxDOSIS	IMCxEPO	DOSISxEPO
LH Pulsos	0.444	<b>0.098</b>	0.774	0.529	<b>0.065</b>	0.303
LH Amplitud	0.270	0.225	0.239	0.454	<b>0.097</b>	0.118
LH Prom	0.211	0.246	0.415	0.461	<b>0.098</b>	0.984
LH Basal	0.233	0.234	0.470	0.395	<b>0.105</b>	0.986
Leptina	0.512	0.371	0.327	0.169	0.260	0.795
Insulina	0.195	0.140	0.710	<b>0.035</b>	<b>0.094</b>	0.192
Glucosa	0.820	<b>0.036</b>	<b>0.027</b>	0.902	0.766	0.602

**Cuadro 4. Valores promedio de características de secreción de LH, leptina, insulina y glucosa en cabras con diferente índice de masa corporal, dosis de 2DG y época (medias mínimo cuadráticas±ee)**

	ÍNDICE DE MASA CORPORAL		DOSIS DE 2DG		ÉPOCA	
	IMCA	IMCB	Alta	Baja	Reprod	Transic
LH Pulsos/4h	2.17±0.86	1.33±0.86	1.42±0.30 <sup>a</sup>	2.08±0.30 <sup>b</sup>	1.83±0.30	1.67±0.30
LH Amp (ng/ml)	1.51±0.22	0.82±0.47	0.91±0.34	1.42±0.25	0.92±0.26	1.41±0.33
LH Prom (ng/ml)	1.32±0.35	0.57±0.35	0.82±0.14	1.07±0.14	0.86±0.14	1.03±0.14
LH Basal (ng/ml)	1.13±0.32	0.49±0.32	0.69±0.13	0.93±0.13	0.74±0.13	0.88±0.13
Leptina (ng/ml)	1.35±0.19	1.54±0.19	1.50±0.09	1.39±0.09	1.38±0.09	1.51±0.09
Insulina (ng/ml)	0.80±0.19	1.23±0.19	0.85±0.15	1.18±0.15	0.98±0.15	1.06±0.15
Glucosa (mg/dl)	195.08±10.1	198.56±10.1	202.70±3.6 <sup>a</sup>	190.94±3.6 <sup>b</sup>	203.10±3.6 <sup>a</sup>	190.54±3.6 <sup>b</sup>

Diferente literal entre grupos de un mismo factor indica diferencia estadística significativa (Ver cuadro 3)

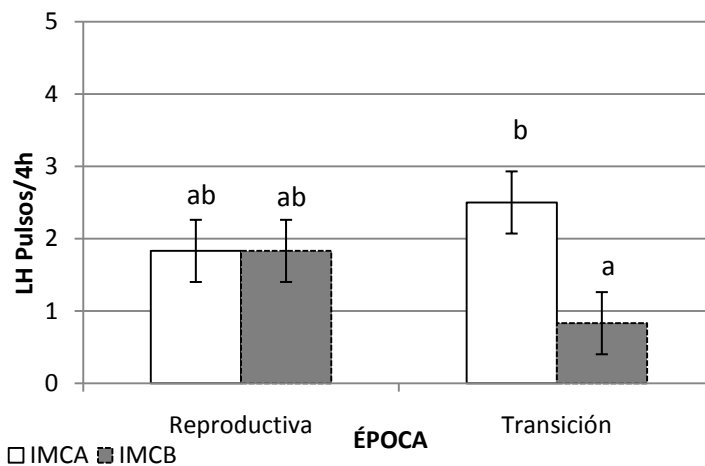
Sólo en animales con un IMCB se presentó una diferencia en la sensibilidad a la disponibilidad metabólica de glucosa sobre la secreción de insulina. En este grupo de IMC la concentración plasmática de insulina fue mayor con la administración de una dosis baja vs una dosis alta de 2DG (Gráfica 6).



**Gráfica 6. Concentración plasmática de insulina en cabras con diferente índice de masa corporal y diferente dosis de 2DG administrada (P=0.035).**

IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo.

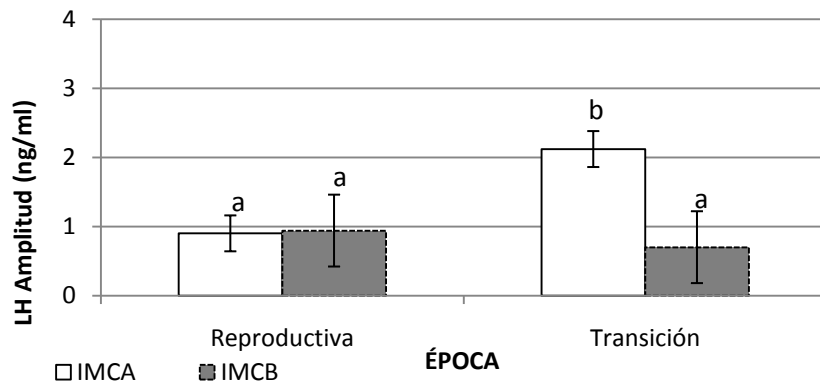
Por otro lado, los resultados muestran de manera evidente la importancia de la época para determinar las respuestas de diferentes variables en animales con diferente IMC. Las cuatro diferentes variables asociadas a LH fueron modificadas por esta interacción. La frecuencia de pulsos mostró diferencias entre grupos de IMC, pero sólo durante la época de transición. Durante ella, la frecuencia fue mayor en animales con un IMCA vs IMCB (Gráfica 7).



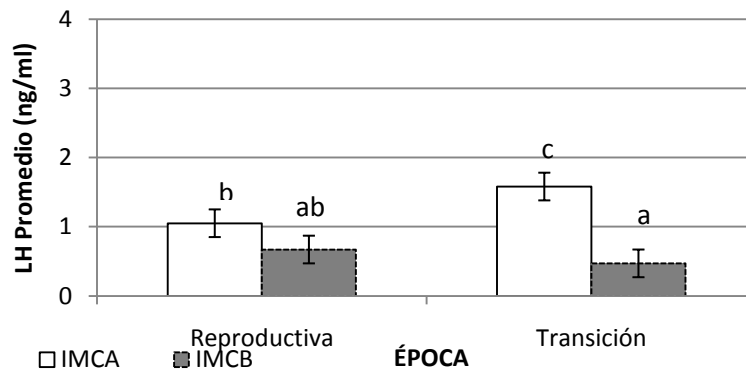
**Gráfica 7. Frecuencia de pulsos de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.065).**  
 IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo.

Tanto en la amplitud de pulsos de LH, como en la concentración promedio y basal de esta hormona, se observaron diferencias entre grupos de IMC que ocurrieron sólo durante la época de transición. Durante ella, la amplitud y ambas concentraciones fueron mayores en animales con un IMCA vs IMCB (Gráfica 8, 9 y 10).

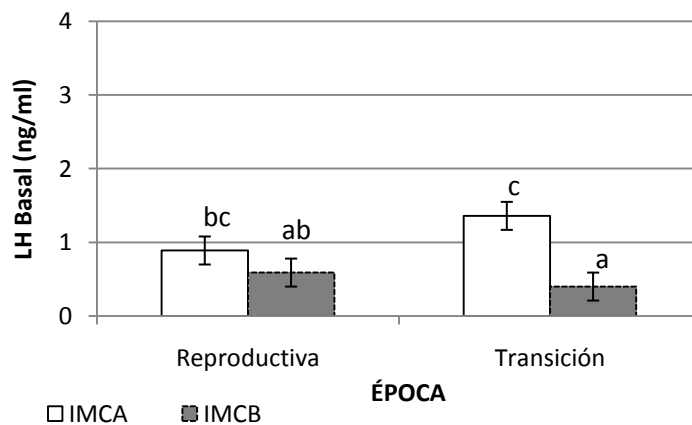




**Gráfica 8. Amplitud de pulsos de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.097).**  
 IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo.

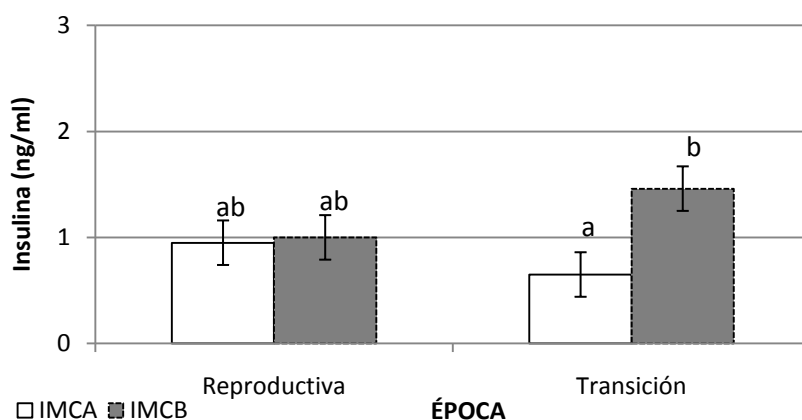


**Gráfica 9. Concentración promedio de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.098)**  
 IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo



**Gráfica 10. Concentración basal de LH en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.105).**  
 IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo

Insulina también fue modificada por la interacción entre el IMC y la Época. En esta hormona tampoco se observan diferencias durante la época reproductiva; sin embargo, durante la época de transición, la concentración fue mayor en animales con un IMCB vs IMCA (Gráfica 11).



**Gráfica 11. Concentración plasmática de insulina en cabras con diferente índice de masa corporal y en diferente época del año (P=0.094).**

IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo.

Como era el propósito, el IMC sólo se modificó en animales que fueron alimentados para tener una menor o mayor cantidad de reservas corporales de energía (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Valores de índice de masa corporal para los factores Índice de masa corporal, dosis de 2DG administrada y época del año y valores de probabilidad para las diferentes interacciones dobles**

		IMC
<b>IMC</b>	IMCA	12.37±0.75 <sup>a</sup>
	IMCB	7.80±0.75 <sup>b</sup>
<b>Dosis</b>	Baja	10.05±0.10
	Alta	10.12±0.10
<b>Época</b>	Reproductiva	10.12±0.10
	Transición	10.04±0.10
<b>Interacción</b>		<b>Valor de P</b>
IMCxDosis		0.82
IMCxEPO		0.17
DosisxEPO		0.74

<sup>ab</sup>P=0.013. IMC= Índice de masa corporal; IMCA= Índice de masa corporal alto; IMCB= Índice de masa corporal bajo; EPO= Época

Durante el presente estudio, ninguna de las hormonas (leptina e insulina) o glucosa, tuvieron alguna correlación con los indicadores de LH. Sin embargo, el IMC se relacionó con la frecuencia de pulsos y la concentración promedio y basal de LH. Finalmente, sólo insulina se relacionó de manera positiva con glucosa (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Coeficientes de correlación y valores de probabilidad entre leptina, insulina, glucosa, pulsos de LH y concentración promedio, basal y amplitud de LH**

	Leptina	Insulina	Glucosa	LH pulsos	LH prom	LH Basal	LH Amplitud	IMC
<b>Leptina</b>	1.00	-0.106	-0.150	-0.046	0.094	0.115	0.275	<b>-0.553</b>
		0.47	0.31	0.76	0.52	0.44	0.13	<b>&lt;0.001</b>
<b>Insulina</b>	-0.106	1.00	<b>0.501</b>	0.007	0.006	0.112	-0.277	-0.074
	0.47		<b>&lt;0.001</b>	0.96	0.96	0.45	0.12	0.62
<b>Glucosa</b>	-0.1507	<b>0.501</b>	1.00	-0.214	-0.163	0.124	-0.038	0.047
	0.31	<b>&lt;0.001</b>		0.14	0.27	0.40	0.84	0.75
<b>LH pulsos</b>	-0.046	0.007	-0.214	1.00	<b>0.867</b>	<b>0.756</b>	<b>0.381</b>	<b>0.397</b>
	0.76	0.96	0.14		<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.03</b>	<b>0.005</b>
<b>LH prom</b>	0.094	0.006	-0.163	<b>0.867</b>	1.00	<b>0.919</b>	<b>0.633</b>	<b>0.363</b>
	0.52	0.96	0.27	<b>&lt;0.001</b>		<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.01</b>
<b>LH Basal</b>	0.115	0.112	0.125	<b>0.756</b>	<b>0.919</b>	1.00	<b>0.693</b>	<b>0.345</b>
	0.44	0.45	0.40	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>		<b>&lt;0.001</b>	<b>0.02</b>
<b>LH Amplitud</b>	0.275	-0.277	-0.038	<b>0.38</b>	<b>0.633</b>	<b>0.693</b>	1.00	0.119
	0.13	0.12	0.84	<b>0.03</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>		0.52
<b>IMC</b>	<b>-0.553</b>	-0.074	0.047	<b>0.397</b>	<b>0.363</b>	<b>0.345</b>	0.119	1.00
	<b>&lt;0.001</b>	0.62	0.75	<b>0.005</b>	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>	0.52	

## 8.6 DISCUSIÓN

Glucosa ha sido referida como un combustible metabólico que podría regular la secreción de GnRH-LH (Ohkura *et al.*, 2000; Ohkura *et al.*, 2004; Archer *et al.*, 2005). Esta regulación podría depender de otros factores como la condición energética de un individuo o la etapa de la época reproductiva en especies con reproducción estacional, por lo que uno de los objetivos de este estudio fue evaluar la respuesta de la secreción de LH al reducir la disponibilidad de glucosa, mediante la administración de 2-deoxiglucosa (2DG) y su modulación por la diferente cantidad de reservas corporales de energía y la diferente época. El 2DG, un análogo de glucosa que inhibe de manera competitiva su oxidación se ha empleado en diferentes estudios para evaluar una disminución en la disponibilidad

de glucosa sobre respuestas reproductivas en rumiantes y roedores (Murahasi *et al.*, 1996; Ohkura *et al.*; 2004; Schneider y Zhou, 1999).

En este estudio, la administración intravenosa de 2DG provocó en las cabras signos atribuibles a una hipoglucemia (temblores musculares, contracciones musculares prolongadas), en especial con dosis alta empleada, tal como ha sido reportado en otros estudios (Bucholtz *et al.*, 1996). Los signos se observaron principalmente en animales con un IMCA (datos no mostrados). En estudios con la misma especie, los signos de una depresión del sistema nervioso central ocurrieron con concentraciones de glucosa <30 mg/dl (Gómez *et al.*, 1992). Aunque en nuestro estudio, la concentración de glucosa estuvo muy por arriba de estos valores después de la aplicación del 2DG, hay que indicar que esta glucosa no se encontraba disponible para ser metabolizada.

En este estudio la época alteró las respuestas en variables asociadas a la secreción de LH en animales con diferente IMC. Esto se presentó tanto en la frecuencia de pulsos de LH como en la concentración promedio y basal de esta hormona. Sale a relucir nuevamente que durante plena época reproductiva no importa la cantidad de reservas corporales de energía de la cabra, ya que esta mantendrá una frecuencia pulsátil de LH necesaria para mantener su actividad reproductiva. Sin embargo, durante la época de transición, un bajo IMC no es suficiente para continuar manteniendo esta actividad, lo que puede determinar la continuación o el término de este periodo reproductivo. Una situación similar se presenta para otras variables como la concentración promedio y basal de la hormona luteinizante. De esta manera, se confirma una vez más la importancia de mantener una alta cantidad de reservas corporales de energía durante el periodo de transición en las cabras. Esta condición favorecerá el mantenimiento de la actividad secretora de la hormona luteinizante y esto en consecuencia permitirá prolongar el periodo de reproducción de esta especie. Se han reportado algunos efectos benéficos de una mayor cantidad de reservas corporales de energía en cabras ayunadas sobre la frecuencia de pulsos de LH (Tanaka *et al.*, 2002) y esto podría ser aún más importante durante periodos de transición en esta especie.

Adicionalmente, el efecto supresor de la frecuencia de pulsos de LH por una menor disponibilidad de glucosa, es evidente sólo en animales con una mayor reserva corporal de energía. Es probable que las cabras con un IMCB no mostraran un cambio mayor en su frecuencia de pulsos de LH, por ser menos sensibles a estados agudos de privación de combustibles metabólicos en forma de glucosa, debido a su estado de restricción alimenticia crónica. Por otro lado, es probable que la baja frecuencia de pulsos observada previo a la administración de 2DG en este grupo (IMCB), no permita una caída en esta frecuencia como la observada en el grupo con un IMCA. De esta manera, glucosa puede ser un elemento que participe en la regulación de la secreción de hormona luteinizante en la especie caprina y animales con una mayor cantidad de reservas corporales de energía podrían ser más sensibles a una restricción súbita de este combustible en virtud de su mayor requerimiento nutricional. La importancia de glucosa como regulador de la secreción de LH puede ser mayor en ausencia de la disponibilidad de otros metabolitos, dando como resultado una depresión inmediata en la frecuencia pulsátil de esta hormona (Ohkura *et al.*, 2004).

Se ha descrito que durante días largos, estos podrían sensibilizar al sistema GnRH a responder a un estímulo nutricional cuando el fotoperiodo no es estimulador, mientras que la estimulación por este factor predomina sobre la retroalimentación nutricional en días cortos (Archer *et al.*, 2005) y podría presentarse algo similar para una mayor cantidad de reservas energéticas. Durante plena época reproductiva el fotoperiodo tendría el papel principal mientras que durante la transición una mayor cantidad de reservas corporales de energía sería un estímulo para continuar con la actividad reproductiva de la especie caprina.

A diferencia de los estudios previos, en este la concentración plasmática de leptina fue modificada entre animales con diferente IMC sólo durante la época de transición. En este momento, nuevamente las cabras del grupo con un IMCB mostraron una mayor concentración de leptina en comparación a aquellos animales con un IMCA. Aunque se ha observado en otras especies que la

hormona insulina podría estimular la secreción de leptina (Ishioka *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2000), en este estudio la concentración plasmática de insulina no fue modificada por esta interacción. Otra causa probable de la mayor concentración de leptina en animales con un IMCB es, el mayor metabolismo de animales con mayor IMC causara una mayor degradación de esta hormona en comparación a aquellas cabras del grupo IMCB, como se ha reportado para otras hormonas como progesterona (Vasconcelos *et al.*, 2003). Sin embargo, la respuesta del porqué sólo durante la época de transición se observan diferencias es difícil aclararla. En los estudios previos, los cambios en la concentración plasmática de leptina sólo se observaron durante la época reproductiva, contrario a lo aquí obtenido. Esto podría sugerir que existen algunos mecanismos adicionales que podrían regular la secreción de esta hormona, los cuales no han sido reportados.

Las concentraciones de insulina y glucosa respondieron a una menor disponibilidad metabólica de glucosa, elevando de manera drástica sus concentraciones circulantes. Esto ya ha sido reportado previamente (Bucholtz *et al.*, 1996; Ohkura *et al.*, 2000) y es importante indicar que el efecto no pudo revertirse durante el periodo examinado, por lo que los efectos de la administración de 2DG tienen una duración mayor a las 4 horas en la especie caprina. En otros estudios se ha observado que el efecto hiperglicémico concluye hasta 8 horas después de administrarse el 2DG y se ha sugerido que la concentración de glucosa aumenta probablemente por una reacción cruzada del 2DG con el ensayo de glucosa empleado para su medición (Bucholtz *et al.*, 1996). Por otro lado, también se ha indicado que la hiperglicemia en respuesta a la neuroglicopenia causada por el 2DG se debe a aumentos en epinefrina y glucagón (Nagatani *et al.*, 1996). Adicionalmente, la elevación de insulina posterior a la administración del 2DG puede deberse al aumento que existió en la concentración de glucosa; insulina es la principal hormona reguladora de glucosa, por lo que al existir una hiperglicemia, se estimula la producción de esta hormona.

La mayor concentración de insulina durante la época de transición es probablemente resultado de la mayor concentración de glucosa en esta misma época. Aunque el factor época no modificó la concentración de glucosa, la diferencia entre ambas épocas estuvo cerca de resultar significativa. Otra posible razón de lo anterior es una mayor tasa de eliminación de glucosa en función de la época; en venados se ha reportado una mayor tasa de eliminación en verano vs invierno (McMahon *et al.*, 1997).

En términos generales se observa que durante la época de transición, sin importar como se encuentre el IMC entre las cabras, no se modifican las características de secreción de LH. Sin embargo, una mayor cantidad de reservas corporales de energía tiene un efecto favorable sobre todas ellas durante la transición al anestro. En este momento, los animales con un IMCB no pueden mantener sus características de secreción, por lo que la cantidad de energía almacenada es un factor crítico para la duración de su periodo de actividad reproductiva.

En este estudio, no se observó correlación de leptina, glucosa o insulina sobre alguna de las variables de LH. A diferencia de uno de los estudios anteriores en los que glucosa se correlacionó positivamente con variables de LH, es importante indicar que en este estudio, aunque existió una alta concentración de insulina y de glucosa posterior a la administración de 2DG, esta glucosa no se encontraba disponible para ser metabolizada. Por otro lado, al igual que en el estudio anterior, el IMC se correlacionó de manera positiva con la frecuencia de pulsos de LH, la concentración promedio y concentración basal de esta hormona. De acuerdo a lo anterior, se podría asumir que cabras con un IMCA podrían favorecer la secreción de LH y en consecuencia continuar por un periodo adicional su periodo de actividad reproductiva.

## **8.7 CONCLUSIONES**

Glucosa es un regulador de la secreción de hormona luteinizante en cabras, cuya respuesta se ve modificada en función del IMC y la etapa del ciclo reproductivo.

Leptina no es afectada por una disminución en el metabolismo de glucosa, lo que indica un papel secundario sobre la regulación de la secreción de LH

Una mayor cantidad de reservas corporales de energía, tienen un efecto benéfico sobre la respuesta observada en variables de secreción de LH sólo durante la época de transición.

## **8.8 LITERATURA CITADA**

**Archer** ZA, Rhind SM, Findlay PA, Kyle CE, Barber MC. Hypothalamic responses to peripheral infusion in food-restricted sheep are influenced by photoperiod. *J Endocrinol* 2005; 184: 515-525.

**Bucholtz** DC, Vidwans NM, Herbosa CG, Schillo KK, Foster DL. Metabolic interfaces between growth and reproduction. V. Pulsatile luteinizing hormone secretion is dependent on glucose availability. *Endocrinol* 1996; 137: 601-607.

**Estrada** CE. Efecto de las reservas corporales de energía y de la restricción nutricional sobre la expresión de la transición reproductiva estacional en cabras criollas. Tesis Maestría en Ciencias. UNAM-FMVZ 2007; 97 p.

**Gómez** B, García-Villalón AL, Flank A, García JL, Monge L, Diéguez G. Effects of hypoglycemia on the cerebral circulation in awake goats. *Neurology* 1992; 42: 909-916. Abstract.

**Matsuyama** S, Ohkura S, Ichimaru T, Sakurai K, Tsukamura K, Maeda K, Okamura H. Simultaneous observation of the GnRH pulse generator activity and plasma concentrations of metabolites and insulin during fasting and subsequent refeeding periods in Shiba goats. *J Reprod Dev* 2004; 50: 697-704.

**McMahon** CD, Corson ID, Littlejohn RP, Stuart SK, Veenvliet BA, Suttie JM. Effects of season, protein and nutritional state of glucose tolerance during an annual cycle of growth in young red deer stags. *J Endocrinol* 1997; 154: 275-283.

**Murahashi** K, Bucholtz DC, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster DL. Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. *Endocrinology* 1996; 137:1171.



**Nagatani S**, Bucholtz DC, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster DL. Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. *Endocrinol* 1996; 137:1171.

**Ohkura S**, Ichimaru T, Itoh F, Matsuyama S, Okamura H. Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. *Endocrinol* 2004; 145: 3239-3246.

**Ohkura S**, Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz DC, Tsukamura, Maeda K, Foster DL. Central, but not peripheral, glucose sensing mechanisms mediate glucoprivic suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the sheep. *Endocrinol* 2000; 141: 4472-4480.

Schneider JE, Zhou D, Blum RM. Leptin and metabolic control of reproduction. *Horm Behav* 2000; 37:306.

**Schneider JE**, Zhou D. Interactive effects of central leptin and peripheral fuel oxidation on estrous cyclicity. *Am J Physiol Reg Integ Com Physiol* 1999; 46: R1020-R1024.

**Tanaka T**, Akaboshi N, Inoue Y, Kamomae H, Kaneda Y. Fasting-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy status in ovariectomized goats. *Anim Reprod Sci* 2002; 72: 185-196.

**Vasconcelos JLM**, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriog* 2003; 60: 795-807.

**Wagner R**, Oberste-Berghaus C, Herpertz S, Blum WF, Pelz B, Hebebrand H, Senf W, Mann K, Albers N. Time relationship between circadian variation of serum levels of leptin, insulin and cortisol in healthy subjects. *Horm Res* 2000; 54: 174-180.

**Zarazaga LA**, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim Reprod Sci* 2005; 87: 253-267.

## **IX.CONCLUSIONES GENERALES**

Una característica que puede mostrar la especie caprina en su secreción de leptina, es la presentación de un ritmo circadiano, mismo que puede modificarse dependiendo de la cantidad de reservas corporales de energía. Por otro lado, no existieron resultados suficientes que permitan sugerir un papel principal de esta hormona sobre la regulación de la secreción de LH. El estado de alimentación puede tener una mayor influencia sobre la secreción de LH y hormonas metabólicas y metabolitos que el IMC. Los resultados indican que en la especie caprina glucosa e insulina afectan de manera directa la secreción de LH; sin embargo insulina parece tener un efecto depresor, mientras que glucosa parece favorecer esta secreción. Adicionalmente, la época puede modificar algunas respuestas en la secreción de la hormona luteinizante y de hormonas y metabolitos asociados a la movilización de energía y una alta cantidad de reservas corporales de energía puede favorecer el mantenimiento de la actividad reproductiva durante el periodo de transición en la especie caprina; sin embargo la relación negativa entre leptina y el IMC no permite afirmar que leptina esté involucrada en estas respuestas.

## **X.LITERATURA CITADA**

**Adam** CL, Archer ZA, Findlay PA, Thomas L, Marie M. Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine-and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. *Neuroendoc* 2002; 75: 250-256.

**Adewuyi** AA, Gruys E, Eerdenburg FJCM. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Vet Q* 2005; 27: 117-126.

**Ahrén** B. Diurnal variation in circulating leptin is dependent on gender, food intake and circulating insulin in mice. *Acta Physiol Scand* 2000; 169: 325-331.

**Al-Azraqi** AA. Effect of fasting on luteal function, leptin and steroids concentration during estrous cycle in the goat in natural photo-status. *Anim Reprod Sci* 2007; 98: 343-349.

**Alila-Johansson** A, Ericksson L, Soveri T, Laakso ML. The daily rhythms of melatonin and free fatty acids in goats under varying photoperiods and constant darkness. *Chronobiol Int* 2006; 23: 565-581.

**Altmann** M, Sauerwein H, von Borell E. The relationship between leptin concentrations and body fat reserves in lambs are reduced by short-term fasting. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2006; 90: 407-413.

**Archer** ZA, Rhind SM, Findlay PA, Kyle CE, Barber MC. Hypothalamic responses to peripheral infusion in food-restricted sheep are influenced by photoperiod. *J Endocrinol* 2005; 184: 515-525.

**Armentano**, LE. Ruminant hepatic metabolism of volatile fatty acids, lactate and pyruvate. *Am Inst Nutr* 1992; 838-842.

**Barash**, IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinol* 1996; 137: 3144-3147.

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

**Bergendahl** M, Iranmanesh A, Evans WS, Veldhuis JD. Short-term fasting selectively suppresses leptin pulse mass and 24-hour rhythmic leptin release in healthy midluteal phase women without disturbing leptin pulse frequency or its entropy control (pattern orderliness). *J Clin Endoc Metab* 2000; 85: 207-213.

**Berger** M, Hagg S, Ruderman NB. Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Interaction of insulin and exercise on glucose uptake. *Biochem J* 1975; 146: 231-238.

**Bertolucci** C, Caola G, Fò A, Piccione G. Daily rhythms of serum leptin in ewes: effects of feeding, pregnancy and lactation. *Chronobiol Int* 2005. 22: 817-827.

**Bertolucci** C, Fazio F, Piccione G. Daily rhythms of serum lipids in dogs: influences of lighting and fasting cycles. *Comp Med* 2008; 58: 485-489.

**Block** SS, Rhoads RP, Bauman DE, Ehrhardt RA, McGuire MA, Crooker BA, Griinari JM, Mackñe TR, Weber WJ, Van Amburgh ME, Boisclair YR. Demonstration of a role for insulin in the regulation of leptin in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2003; 86: 3508-3515.

**Blum** JW, Kunz P, Bachmann C, Colombo JP. Metabolic effects of fasting in steers. *Res Vet Sci* 1981; 31: 127-129. Abstract.

**Boden** G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endoc Metab* 1996; 81: 3419-3423.

**Bonnet** M, Delavaud C, Rouel J, Chilliard Y. Pregnancy increases plasma leptin in nulliparous but not primiparous goats while lactation depresses it. *Domest Anim Endocrin* 2005; 28: 216-223.

**Boukhliq** R, Miller DW, Martin GB. Relationship between nutritional stimulation of gonadotrophin secretion and the peripheral and cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of glucose and insulin in rams. *Anim Reprod Sci* 1996; 41: 201-214.

**Brann** DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD. Leptin and Reproduction. *Steroids* 2002; 67: 95-104.

**Brecchia** G, Bonanno A, Galeati G, Federici C, Maranesi M, Gobbetti A, Zerani M, Boiti C. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Dom Anim Endocrinol* 2006; 31: 105-122.

**Bucholtz** DC, Vidwans NM, Herbosa CG, Schillo KK, Foster DL. Metabolic interfaces between growth and reproduction. V. Pulsatile luteinizing hormone secretion is dependent on glucose availability. *Endocrinol* 1996; 137: 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. *Endocrinol* 2003; 144: 4484-4491.

**Caldeira** RM, Belo AT, Santos CC, Vazques MI, Portugal AV. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rumin Res* 2007; 68: 233-241.

**Chelikani** PK, Ambrose JD, Keisler DH, Kennelly JJ. Effect of short term fasting on plasma concentrations of leptin and other hormones and metabolites in dairy cattle. *Domest Anim Endoc* 2004; 26: 33-48.

**Celi** P, Blache D, Blackberry MA, Martin GB. Intracerebroventricular infusion of leptin into mature Merino rams of different metabolic status: effects on blood concentrations of glucose and reproductive and metabolic hormones. *Reprod Dom Anim* 2006; 41: 79-90.

**Choshniak** I, Ben Kohav N, Taylor CR, Robertshaw D, Barnes RJ, Dobson A, Belkin V, Shkolnik A. Metabolic adaptations for desert survival in the Bedouin goat. *Am J Physiol* 1995; 268: R1101-1010. Abstract

**Clarke** IJ, Horton RJE, Doughton BW. Investigation of the mechanism by which insulin-induced hypoglycemia decreases luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinol* 1990; 127: 1470-1476.

**Coward** BJ, Buttery PJ. Metabolism of perfused ruminant muscle. *J Agric Sci Camb* 1982; 98: 307-316.

**Daniel** JA, Whitlock BK, Baker JA, Steele B, Morrison CD, Keisler DH, Sartin JL. Effect of body fat mass and nutritional status on 24-hour leptin profiles in ewes. *J Anim Sci* 2002; 80: 1083-1089.

**Delavaud** C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J Endocrinol* 2000; 165: 519-526.

**Delgadillo** JA, Fitz-Rodríguez G, Duarte G, Véliz FG, Carrillo E, Flores JA, Vielma J, Hernández H, Malpaux B. Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 471-478.

**Delgadillo** JA, Flores JA, Véliz FG, Duarte G, Vielma J, Hernández H, Fernandez IG. Importance of the signals provided by the buck for the success of the male effect in goats. *Reprod Nutr Dev* 2006; 46: 391-400.

**Devendra** C. Challenges for research and development of goats. 7th International Conference on Goats. France, 15-21 may. 2000; p. 887-889.

**Downs** JL, Urbanski HF., 2006. Aging-related sex dependent loss of the circulating leptin 24-h rhythm in the rhesus monkey. *J Endocrinol* 2006; 190: 117-127.

**Dunshea** FR, Bell AW, Trigg TE. Relations between plasma non-sterified fatty acids metabolism and body fat mobilization in primiparous lactating goats. *Br J Nutr* 1989a; 62: 51-61.

**Dunshea** FR, Bell AW, Trigg TE. Relations between plasma non-sterified fatty acid metabolism and body tissue mobilization during chronic undernutrition in goats. *Br J Nutr* 1989b; 60: 633-644.

**Ekpe** ED, Christopherson RJ. Metabolic and endocrine responses to cold and feed restriction in ruminants. *Can J Anim Sci* 2000; 80: 87-95.

**Escandón** J. Ritmos biológicos. *Ciencias* 1994; 35: 69-75.

**Escobar** MJ. Efecto de fotoperiodo sobre la estacionalidad reproductiva de la cabra criolla en México. Tesis Doctorado. UNAM-FMVZ 2001; 131 p.

**Espinosa** MM, González-Padilla E, Romano JL, Villa-Godoy A. Caracterización de los ciclos estrales iniciales posparto, en cabras con dos niveles de energía y de amamantamiento. *Memorias XXXIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. FMVZ-UNAM* 2003; p. 183.

**Estrada** CE, Urrutia MJ, Villagómez AME, Jiménez SH, Mejía G, Rivera LMT, Gámez VH, Basurto GR, Villa GA, Vera AH. Desarrollo folicular durante transición a anestro en cabras con índice de masa corporal alto o bajo sometidas o no a restricción nutricional en fases. *Memorias XLI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Morelos* 2005a; p. 107.

**Estrada** CE, Urrutia MJ, Villagómez AE, Jiménez SH, Mejía G, Rivera LMT, Gámez VH, Basurto GR, Villa GA, Vera AH. Actividad lútea durante transición a anestro en cabras con índice de masa corporal alto o bajo sometidas o no a restricción nutricional en fases. *Memorias XLI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Morelos* 2005b; p. 108.

**Estrada** CE. Efecto de las reservas corporales de energía y de la restricción nutricional sobre la expresión de la transición reproductiva estacional en cabras criollas. Tesis Maestría en Ciencias. UNAM-FMVZ 2007; 97 p.

**Estrada** CE, Vera AH, Urrutia MJ, Villagómez-Amézcua E, Jiménez SH, Mejía GC, Rivera LT, Gámez VH. Efecto del estado nutricional sobre la expresión de la transición reproductiva estacional en cabras criollas. VI Congreso Latinoamericano de la Asociación de Especialistas en Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudamericanos. Querétaro, México Septiembre de 2009.

**FAO.** FAOSTAT. 2008. <http://faostat.fao.org>

**Fogteloo** AJ, Roelfsema PH, Frölich M, Meinders AM. Impact of meal timing and frequency on the twenty-four-hour leptin rhythm. *Horm Res* 2004; (62) 71-78.

**Gaál** T, Mézes M, Miskucza O, Ribiczey-Szabó P. Effect of fasting on blood lipid peroxidation parameters of sheep. *Res Vet Sci* 1993; 55: 104-107. Abstract.

**Galvis** GRD, Correa CHJ. Interacciones entre el metabolismo y la reproducción en la vaca lechera: es la actividad gluconeogénica el eslabón perdido? *Rev Col Cienc Pec* 2002; 15: 36-50.

**Gámez** VHG, Rosales NCA, Bañuelos VR, Urrutia MJ, Díaz GMO, Silva RJM, Meza HCA. Leptin and glucose concentration of Creole does with different body condition scores (BCS) under tropical latitude (22°NL). *Memorias 9<sup>th</sup> International Conference on Goats Aug 31-Sep 4, 2008; Querétaro México.* p 328.

**García** MR, Amstalden M, Williams SW, Stanko RL, Morrison CD, Keisler DH, Nizielski SE, Williams GL. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J Anim Sci* 2002; 80: 2158-2167.

**Gómez** B, García-Villalón AL, Flank A, García JL, Monge L, Diéguez G. Effects of hypoglycemia on the cerebral circulation in awake goats. *Neurology* 1992; 42: 909-916. Abstract.

**Havel** PJ, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL, Stern JS. Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4406-4413.

**Hennemann** G, R Docter, ECH Friesema, M de Gong, EP Krenning, TJ Visser. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endoc Rev* 2001; 22: 451-476.

**Henniawati** I, Fletcher IC. Reproduction in Indonesian sheep and goats at two levels of nutrition. *Anim Reprod Sci* 1986; 12: 77-84.

**Henry** BA, Goding JW, Tilbrook AJ, Dunshea FR, Blache D, Clarke IJ. Leptin-mediated effects of undernutrition or fasting on luteinizing hormone and growth hormone secretion in ovariectomized ewes depend on the duration of metabolic perturbation. *J Neuroendoc* 2004; 16: 244-255.

**Herd** TH. Ruminant adaptation to negative energy balance. Veterinary Clin of N Am. Food Anim Pract 2000; 16: 215-230.

**Hidalgo**. Regulación Global de la Concentración de la Glucosa Sanguínea. Físico-Bioquímica II 1999. [www.aula\\_virtual.com.sv/Fisio2/FISI02.htm](http://www.aula_virtual.com.sv/Fisio2/FISI02.htm) Buscar otra referencia

**Hileman** SM, Pierroz DD, Flier JS. Leptin, nutrition, and reproduction: timing is everything. J Clin Endocrinol & Metab 2000; 85: 804-807.

**Hippen** AR, She P, Young JW, Beitz DC, Lindberg GL, Richardson LF, Tucker LW. Metabolic responses of dairy cows and heifers to various intravenous dosages of glucagón. J Dairy Sci 1999; 82: 1128-1138.

**Hocquette** J-F, Abe H. Facilitative glucose transporters in livestock species. Reprod Nutr Dev 2000; 40: 517-533.

**Housknecht** KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS, Kahn BB. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. Diabetes 1996; 45: 1638-1643. Abstract.

**Huntington** GB, Archibeque SL. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. Proc Am Soc Anim Sci 1999; 1-8.

**Ichimaru** T, Mori Y, Okamura H. A possible role of neuropeptide Y as a mediator of undernutrition to the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator in goats. Endocrinol 2001; 142: 2389-2498.

**INEGI**. 2008. Catálogo de Claves de Entidades Federativas, Municipios y Localidades. <http://mapserver.inegi.gob.mx/mgn2k/?s=geo&c=1223>

**Ishioka** K, Hatai H, Komabayashi K, Soliman MM, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M. Diurnal Variations of Serum Leptin in Dogs: Effects of Fasting and re-feeding. Vet J 2005; 169: 85-90.

**Jud** C, Schmutz I, Hampp G, Oster H, Albrecht U. A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. Biol Proced Online 2005; 7: 101-116.

**Kalsbeek** A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, Endert E, Buijs RM. The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. Endocrinol 2001; 142: 2677-2685.

**Kelly** G. Peripheral metabolism of thyroid hormones: A review. Altern Med Rev 2000; 5: 306-333.



**Kinsbergen** M, Sallmann HP, Blum JW. Metabolic, endocrine and haematological changes in 1-week-old calves after milk intake, in response to fasting and during total parenteral nutrition. *Zentralb Veterinarmed A* 1994; 41: 268-282. Abstract.

**Kiyama** Z, Alexander BM, Van Kirk EA, Murdoch WJ, Hallford DM, Moss GE. Effects of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in ewes. *J Anim Sci* 2004; 82: 2548-2557.

**Kulcsár** M, Janosi SZ, Lehtolainen T, Kátai L, Delavaud C, Balogh O, Chilliard Y, Pyörälä S, Rudas P, Huszenicza GY. Feeding-unrelated factors influencing the plasma leptin level in ruminants. *Domestic Anim Endocrinol* 2005; 29: 214-226.

**Kusina** NT, Chinuwot, Hamudikuwanda H, Ndlovu LR, Musanenhamo S. Effect of different dietary energy level intakes on efficiency of estrus synchronization and fertility in Mashoa goat does. *Small Rumin Res* 2001; 39: 283-288.

**Kyriaki** G. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell and Molec Neurob* 2003; 23: 1-25.

**Langendonk** JG, Pijl H, Toornvliet AC, Burggraaf J, Frölich M, Schoemaker RC, Doornbos J, Cohen AF, Meinders AE. Circadian rhythm of plasma leptin levels in upper and lower body obese women: influence of body fat distribution and weight loss. *J Clin Endoc Metab* 1998; 83: 1706-1712.

**Larsen** PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. *Williams Textbook of Endocrinology*. Edit. Saunders, USA 2003; 1927 pp.

**Lefcourt** AM, Huntinton JB, Akers RM, Wood DL, Bitman J. Circadian and ultradian rhythms of body temperature and peripheral concentrations of insulin and nitrogen in lactating dairy cows. *Dom Anim Endocrinol* 1999; 16: 41-55.

**Lehninger** AL, Nelson DL, Cox MM. *Fundamentos de Bioquímica*. Barcelona, Omega.

**Licinio** J, Negrão AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong M, Bongiorno PB, Negro PP, Mulla A, Veldhuis JD, Cearnal L, Flier JS, Gold PW. Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endoc Metab* 1998; 83: 4140-4147.

**López** LL, Valencia MMJ, González PE. Interacton of suckling and nutrition on postpartum anoestrus of goats kidding in autumn. *Memorias 27th World Veterinary Congress*. Tunes. Septiembre 25-29 2002; p. 213.

**Majele-Sibanda** L, Bryant MJ, Ndlovu LR. Live weight and body condition changes of Matebele does during their breeding cycle in a semi-arid environment. *Small Rumin Res* 2000; 35: 271-275.

**Malau-Aduli** BS, Eduvie L, Lakpini C, Malau-Aduli AEO. Crop-residue supplementation of pregnant does influences birth weight and weight gain of kids, daily milk yield but not the progesterone profile of Red Sokoto goats. *Reprod Nutr Dev* 2004. 44: 111-121.

**Malpaux** B, Viguié C, Skinner DC, Thiéry JC, Pelletier J, Chemineau P. Seasonal breeding in sheep: mechanism of action of melatonin. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 109-117.

**Malpaux** B, Delgadillo JA, Chemineau P. Neuroendocrinología del fotoperiodo en el control de la actividad reproductiva. Seminario Internacional: Tópicos Avanzados en Reproducción Animal. Montecillo, México 1997; p: 23-42.

**Malpaux** B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms* 2001; 16: 336-347.

**Mani** AU, Watson ED, McKelvey WAC. Effect of undernutrition on progesterone concentration during the early luteal phase and mid-gestation in goats. *Vet Rec* 1995; 136(20): 518-519.

**Mani** AU, McKelvey WAC, Watson ED. Effect of undernutrition on gonadotropin profiles in non-pregnant cycling goats. *Anim Reprod Sci* 1996; 43: 25-33.

**Marie** M, Findlay PA, Thomas L, Adam CL. Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. *J Endocrin* 2001; 170: 277-286.

**Mashek** DG, Ingvarsten KL, Andersen JB, Vestergaard M, Larsen T. Effects of a four-day hyperinsulinemic-euglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins. *Dom Anim Endocrinol* 2001; 21: 169-185.

**Matsuyama** S, Ohkura S, Ichimaru T, Sakurai K, Tsukamura K, Maeda K, Okamura H. Simultaneous observation of the GnRH pulse generator activity and plasma concentrations of metabolites and insulin during fasting and subsequent refeeding periods in Shiba goats. *J Reprod Dev* 2004; 50: 697-704.

**McEwen** BS, Reagan LP. Glucose transporter expresión in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Europ J Pharmacol* 2004; 490: 13-24.

**McMahon** CD, Corson ID, Littlejohn RP, Stuart SK, Veenvliet BA, Suttie JM. Effects of season, protein and nutritional state of glucose tolerance during an annual cycle of growth in young red deer stags. *J Endocrinol* 1997; 154: 275-283.

**Mellado** M, Vera A, Loera H. Reproductive performance of crossbred goats in good or poor body condition exposed to bucks before breeding. *Small Rumin Res* 1994; 14: 45-48.

**Miller** DW, Blache D, Martin GB. The role of intracerebral insulin in the effect of nutrition on gonadotrophin secretion in mature male sheep. *J Endocrinol* 1995; 147-321-329.

**Molokwu** ECI, Oliveira DM. Reproduction and breeding management of does. *Vet Med Small Anim Clin* 1981; October: 1473-1476.

**Mueckler** M, Holman G. Homeostasis without a GLUT. *Nature* 1995; 377: 100-101

**Murahashi** K, Bucholtz DC, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster DL. Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. *Endocrinology* 1996; 137:1171.

**Nagatani** S, Bucholtz DC, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster DL. Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. *Endocrinol* 1996; 137:1171.

**Nagatani** S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinol* 2000; 141: 3965-3975.

**Ohkura** S, Ichimaru T, Itoh F, Matsuyama S, Okamura H. Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. *Endocrinol* 2004; 145: 3239-3246.

**Ohkura** S, Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz DC, Tsukamura, Maeda K, Foster DL. Central, but not peripheral, glucose sensing mechanisms mediate glucoprivic suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the sheep. *Endocrinol* 2000; 141: 4472-4480.

**Pell** JM, Bergman EN. Cerebral metabolism of amino acids and glucose in fed and fasted sheep. *Am Physiol Soc Endocrinol Metab* 1983; 244: E282-E289.

**Pessin** JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 165-169.

**Perry** RC, Corah LR, Cochran RC, Beal WE, Stevenson JS, Minton JE, Simms DD, Brethour JR. Influence of dietary energy on follicular development, serum gonadotropins, and first postpartum ovulation in suckled beef cows. *J Anim Sci* 1991; 69: 3762-3773.

**Plum** L, Schubert M, Brüning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *TRENDS Endoc Metab* 2005; 16: 59-65.

**Reddy** S, Elliot RB. Insulin, Glucagón, pancreatic polypeptide hormone and somatostatin in the goat pancreas: demonstration by immunocytochemistry. *Aust J Biol Sci* 1985; 38: 59-66.

**Rivas-Muñoz** R, Fitz-Rodríguez G, Poindron P, Malpoux B, Delgadillo JA. Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous exposure to males. *J Anim Sci* 2007; 85: 1257-1263.

**Robertson** SA, Leininger GM, Myers Jr MG. Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol & Behav* 2008; 94: 637-642.

**Rudas**, P, Zs Rónai, T Bartha. Thyroid hormone metabolism in the brain of domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29: 88-96.

**Rondina** D, Freitas VJF, Spinaci, Galeati G. Effect of nutrition on plasma progesterone levels, metabolic parameters and small follicles development in unstimulated goats reared under constant photoperiod regimen. *Reprod Dom Anim* 2005; 40: 548-552.

**Rule** DC, Beitz DC, de Boer G, Lyle RR, Trenkle AH, Young JW. Changes in hormone and metabolite concentrations in plasma of steers during a prolonged fast. *J Anim Sci* 1985; 61: 868-875.

**Sánchez** JC. Perfil fisiológico de la leptina. *Revista Colombia Médica* 2005; 36: 50-59.

**Sano** H, Takebayashi A, Kodama Y, Nakamura K, Ito H, Arino Y, Fujita T, Takahashi H, Ambo K. Effects of feed restriction and cold exposure on glucose metabolism in response to feeding and insulin in sheep. *J Anim Sci* 1999; 77: 2564-2573.

**Sasaki** Y, Takahashi H. Insulin secretion in sheep exposed to cold. *J Physiol* 1980; 306: 323-335.

**Sasaki** Y, Takahashi H, Aso H, Ohneda A, Weekes TEC. Effects of cold exposure on insulin and glucagón secretion in sheep. *Endocrinol* 1982; 111: 2070-2076.

**Schillo** KK. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci* 1992; 70: 1271-1282.

**Schneider** JE, Zhou D, Blum RM. Leptin and metabolic control of reproduction. *Horm Behav* 2000; 37:306.

**Schneider** JE, Zhou D. Interactive effects of central leptin and peripheral fuel oxidation on estrous cyclicity. *Am J Physiol Reg Integ Com Physiol* 1999; 46: R1020-R1024.

**Silanikove** N. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environment. *Small Rumin Res* 2000; 35: 181-193.

**Sinha** MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriaciunas A, Stephens TW, Magosin S, Cheryl M, Caro JF. Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 1996; 97: 1344-1347.

**Spicer** LJ. Leptin: a possible signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 21: 251-270.

**Szanyiová** M, Bod'a K, Bazanova NV, Tasenov KT, Karinbaev RS, Leng L, Makasev EK. Renal excretion of urea in the Merino and Steppe fat-tailed breeds of sheep after a short period of fasting. *Vet Med (Praha)* 1985; 30: 83-90.

**Tajima** D, Masaki T, Hidaka S, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Acute central infusion of leptin modulates fatty acid mobilization by affecting lipolysis and mRNA expression for uncoupling proteins. *Exp Biol Med* 2005; 230: 200-206.

**Tanaka** T, Akaboshi N, Inoue Y, Kamomae H, Kaneda Y. Fasting-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy status in ovariectomized goats. *Anim Reprod Sci* 2002; 72: 185-196.

**Tanaka** T, Fujiwara K-I, Kim S, Kamomae H, Kaneda Y. Ovarian and hormonal responses to a progesterone-releasing controlled internal drug releasing treatment in dietary-restricted goats. *Anim Reprod Sci* 2004; 84: 135-146.

**Tilbrook** AJ, Canny BJ, Serapiglia MD, Ambrose TJ, Clarke IJ. Suppression of the secretion of luteinizing hormone due to isolation/restraint stress in gonadectomised rams and ewes is influenced by sex steroids. *J Endocrinol* 1999; 160: 469-481

**Todini**, L, A Malfatti, A Valbonesi, M Trabalza-Marinucci, A Debenedetti. Plasma total T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> concentrations in goats at different physiological stages, as affected by the energy intake. *Small Rumin Res* 2007; 68: 285-290

**Urrutia** MJ, Díaz GMO, Gámez VH, Rivera LMT, Vera AH, Villagómez-Amezcu ME. Effect of continual presence of the male on seasonal variation of reproductive activity in crossbred Nubian goats under tropical photoperiod. *Memorias 9<sup>th</sup> International Conference on Goats* Aug 31-Sep 4, 2008; Querétaro México. p 451.

**U.S.** Census Bureau. World Population Information. 2009. <http://www.census.gov/ipc/www/idb/worldpopinfo.html>

**Valencia** J, Zarco L, Ducoing A, Murcia C, Navarro H. Delimitación de la estación de anestro de cabras criollas y granadinas mantenidas en un plano nutricional constante en el altiplano mexicano. En: *Memorias del V Congreso Nacional AZTECA*. México, D.F. 7-9 de Diciembre 1988: 28-35.

**Vasconcelos** JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriog* 2003; 60: 795-807.

**Veliz** FG, Moreno S, Duarte G, Vielma J, Chemineau P, Poindron P, Malpoux B, Delgadillo JA. Male effect in seasonally anovulatory lactating goats depends on the presence of sexually active bucks, but not estrous females. *Anim Reprod Sci* 2002; 72: 197-207.

**Wagner** R, Oberste-Berghaus C, Herpertz S, Blum WF, Pelz B, Hebebrand H, Senf W, Mann K, Albers N. Time relationship between circadian variation of serum levels of leptin, insulin and cortisol in healthy subjects. *Horm Res* 2000; 54: 174-180.

**Williams** GL, Amstalden M, García MR, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, Keisler DH. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domes Anim Endocrinol* 2002; 23: 339-349.

**Wiltbank** MC, Fricke PM, Sangsritavong S, Sartori R, Ginther OJ. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2000; 83: 2998-3007.

**Zarazaga** LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim Reprod Sci* 2005; 87: 253-267.

**Zieba** DA, Amstalden M, Williams GL. Regulatory roles of lepin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domestic Anim Endocrinol* 2005; 29: 166-185.