

Efecto del nivel de alimentación sobre la actividad ovárica, expresión de transportadores de glucosa y tolerancia a la insulina en vacas mestizas durante el posparto

Ana Z. Ruiz^{1*}, Carlos Domínguez³, Nelson Martínez², Livia Pinto², Karin Drescher², Mario Rossini¹, Rafael Pérez³, Jesús Rojas¹, Richard Araneda¹, Adriana Fernández¹ y Nancy Jerez⁴

¹ Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias. Apartado Postal 4563, Maracay 2101, Aragua Venezuela. *Correo electrónico: ruizz11@yahoo.com.

² Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Maracay, Aragua. Venezuela.

³ Universidad Experimental Rómulo Gallegos, IDESSA. San Juan de los Morros, Guarico. Venezuela.

⁴ Universidad del Zulia, Instituto de Investigaciones Agronómicas. Maracaibo, Zulia. Venezuela.

RESUMEN

Para evaluar el efecto del plano nutricional sobre estructuras ováricas (EO), calidad de ovocitos, expresión de transportadores de glucosa (Gluts) y tolerancia a la insulina, se emplearon ocho vacas mestizas doble propósito (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Los animales fueron aleatoriamente asignados a dos grupos de tratamientos: Tratamiento 1: cuatro vacas de condición corporal (CC) alta y baja, sometidas a nivel de alimentación bajo (BA) y Tratamiento 2: cuatro vacas de CC baja y alta sometidas a nivel de alimentación alto (AA). La evaluación de la actividad reproductiva se realizó semanalmente mediante palpación transrectal y ultrasonografía entre los 15 y 45 días posparto. Las EO fueron evaluadas a través de la presencia de cuerpos lúteos y por las clases de folículos ováricos. Los ovocitos fueron clasificados en: A (ovocitos con presencia de un *cumulus oophurus* claro y compacto y un ooplasma oscuro), B (ovocitos con un *cumulus oophurus* oscuro y compacto y un ooplama oscuro) y C (ovocitos con *cumulus oophurus* oscuro y expandido y ooplasma oscuro). Se evaluó la expresión de Glut-1 y Glut-4 mediante la técnica de Western Blot. Se realizó una prueba de tolerancia a la insulina. Se encontró asociación entre el nivel de nutrición con el porcentaje de ovocitos A (0,756; P<0,05). Se detectó una mayor expresión del Glut-1 en las vacas sometidas a BA y del Glut-4 en animales sometidos a AA. También, se evidenció el efecto del nivel de nutrición sobre la concentración plasmática de glucosa, tanto antes como después de la administración de insulina. Los resultados de este estudio sugieren que el plano de alimentación podría afectar el desarrollo folicular en su etapa final de maduración, debido a que el aporte nutricional es capaz de influir sobre la respuesta reproductiva tanto a nivel ovárico como hipotalámico.

Palabras clave: alimentación, actividad ovárica, transportadores glucosa, tolerancia insulina, vacas doble propósito.

Effect of nutritional level on ovarian activity, glucose transporters expression and insulin tolerance in dual purpose cows during the postpartum period

ABSTRACT

To evaluate the feeding effect on ovarian structure (OS), ovocyte quality, Glut-1 receptor expression, and insulin tolerance test, eight crossbred (*Bos taurus* x *Bos indicus*), dual purpose cows were used. The animals were randomly allocated to two treatments: Treatment 1: Four cows with low and high corporal conditions and a low feed level (LF) and Treatment 2: Four cows with low and high corporal conditions and a high feed level (HF). The evaluation of reproductive activity was done weekly using trans-rectal palpation and ultrasound from 15 to

45 days post-partum. The OS was assessed by the presence of corpus *luteum* and the classes of ovarian follicles. The oocytes were classified as follows: A (oocyte with the presence of a clear and compact *cumulus oophorus* and translucent ooplasm), type B (oocyte with dark and compact *cumulus oophorus* and dark ooplasm), and type C (oocyte with dark and expanded *cumulus oophorus* and dark ooplasm). The expression of Glut-1 and Glut-4 was evaluated by Western Blot analysis; additionally, an insulin tolerant test was performed. The correlation analysis showed an association between feed level and oocytes type A (0.756; $P < 0.05$). The Glut-1 expressed more in animals under Treatment 1 and Glut-4 in animal under Treatment 2. Also, the feed level affected plasmatic glucose concentration before and after insulin injection. The results of this study suggest that the feed level affects the follicular development at its final stage of maturation because the nutritional supply is capable of modulating the reproductive response both at the hypothalamic and ovarian levels.

Keywords: nutrition, ovarian activity, glucose transporter, insulin tolerance, dual purpose cattle.

INTRODUCCIÓN

En el trópico, uno de los factores productivos limitantes a considerar es el bajo aporte nutricional de la dieta animal debido a que existen diferencias marcadas en cuanto a la cantidad y calidad de la alimentación basal, especialmente en ciertas épocas del año. La magnitud del aporte nutricional va a depender de las características ambientales de la zona de producción (Domínguez *et al.*, 1998). En épocas de escasez de nutrientes disponibles para el animal, pueden presentarse importantes redistribuciones en la partición de uso de los mismos, lo que conlleva a la disminución de las reservas corporales endógenas, así como en la deposición de tejido muscular y a una baja tasa de reproducción (Cronjé *et al.*, 2000; Khun *et al.*, 2004).

Se han evidenciado respuestas diferenciales en el comportamiento reproductivo, dependiendo de la condición corporal al momento del parto y de su variación posparto (Martínez *et al.*, 1998; Butler, 2000; Domínguez *et al.*, 2007). En animales con deficiente estado corporal o balance energético negativo, los niveles de leptina circulante en sangre disminuyen y producen un efecto estimulador de la secreción del neuropéptido Y (Iain y Henry, 1999). Este mensajero químico produce una retroalimentación negativa sobre las neuronas hipotalámicas que estimula la secreción de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH), disminuyendo en consecuencia, la secreción de la hormona luteinizante (LH). El juego hormonal anteriormente mencionado afecta el desarrollo de los folículos en el estadio preantral, los cuales no evolucionan y terminan en atresia (Bach, 2001). Es importante mencionar el efecto del balance energético negativo sobre el inicio de la actividad ovárica y

sobre las concentraciones del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1), insulina y glucosa, los cuales se presentan en bajos niveles (Buttler, 2000). Buttler (2000) y Bach (2001) coinciden con que el reestablecimiento de la actividad ovárica ocurre cuando se produce el NADIR (cambio a balance energético positivo) en el balance energético, lo que trae como consecuencia una elevación de los niveles de insulina, IGF-1, leptina y LH, estradiol (E_2) y la producción de folículos dominantes destinados a la ovulación (Morrison *et al.*, 2001). La regulación endocrina de la foliculogénesis involucra a las gonadotropinas, además de hormonas y factores de crecimiento producidos localmente (Fortune *et al.*, 2004). Existe evidencia (Hafez y Hafez, 2000) de que durante el inicio de la foliculogénesis, hasta la etapa en que se forma el antro folicular, la hormona foliculo estimulante (FSH) no tiene influencia sobre esa fase, pues se ha confirmado que dicha fase inicial se encuentra estimulada por otros factores de carácter intraovárico (Díaz, 1999), mientras que el folículo antral requiere la presencia de gonadotropinas (Eppig, 2001).

El término “perfil metabólico” involucra el estudio de diferentes grupos de parámetros sanguíneos para monitorear el estado metabólico y de salud de las vacas lecheras (Payne, 1989). Quintela *et al.* (2003) correlacionaron las concentraciones sanguíneas de glucosa y del colesterol total en el período posparto con la involución del útero, encontrando una clara correlación, entre las concentraciones séricas de colesterol total, en las primeras semanas del posparto, con el transcurso de la involución uterina.

Para mantener una adecuada nutrición celular cuando la disponibilidad de nutrientes es escasa, se

modifica la expresión de transportadores de glucosa (Gluts), como parte de una respuesta adaptativa (Kahn, 1994). Rubio *et al.* (1996) evidenciaron un incremento significativo en la expresión de transportadores de glucosa no sensible a insulina tipo 1 (Glut-1) en el tejido adiposo en ratas previamente sub-nutridas, mientras que el contenido global del transportador de glucosa sensible a insulina tipo 4 (Glut-4), tanto de tejido muscular como adiposo, no se vio alterado. El Glut-1 se encuentra en todas las células del organismo, tiene una elevada afinidad por la glucosa y su función principal sería la de mantener la concentración de glucosa basal en la célula y posibilitar su entrada al interior de la misma, en estado reposo. Este receptor aumenta su expresión en condiciones de hipoglicemia como un mecanismo de protección al cerebro. La composición de la dieta y el contenido de macronutrientes influyen marcadamente el contenido de Gluts (Kahn, 1994). Estudios *in vivo* en cerdos, vacas y cabras han demostrado que la regulación de la expresión de los Gluts (especialmente Glut-4) es debido a factores nutricionales y hormonales (Hocquette y Abe, 2000).

En función de lo anteriormente descrito, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del nivel de alimentación sobre la expresión del Glut-1 y Glut-4, tolerancia a la insulina, involución uterina, crecimiento folicular y calidad de los ovocitos en vacas mestizas durante el posparto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y localización

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de la Sección de Bovinos del Instituto de Producción Animal de la Facultad de Agronomía de la UCV, Maracay, Aragua, Venezuela. La precipitación promedio anual en la zona es de 800 mm, con una temperatura promedio de 27°C.

Fueron empleados un total de ocho vacas mestizas (3/4-1/2 *Holstein* x *Brahman*) de doble propósito, con dos o más partos. Los animales fueron evaluados entre los 15 y 45 días posparto, luego de los cuales fueron faenados en un frigorífico industrial (Matadero Industrial de Turmero, FITCA, Turmero, Aragua).

Manejo general y alimentación

Las vacas fueron alojadas en puestos individuales de 18 m largo y 2 m de ancho, con piso de cemento y tierra en partes iguales y techado. Cada puesto fue condicionado con un comedero y un bebedero automático donde se ofreció agua a voluntad. La alimentación se basó en el suministro de alimento concentrado (AC), bloque multinutricional (BMN) y pacas de heno de pasto estrella (*Cynodon nlemfluensis*). El AC y el BMN se prepararon en el laboratorio. El aporte calculado de la energía metabolizable del AC y BMN fue de 3,2 y 0,86 EM/kg, respectivamente. En el caso de la proteína cruda (PC) y proteína degradable en el rumen (PDR), los aportes fueron de 23,1 y 19,3%, respectivamente, para el AC y de 50,9 y 47,9%, respectivamente, para el BMN. El pasto aportó 2,01 EM/kg, 8,0% de PC y 4,68 % de PDR.

Tratamientos y diseño del experimento

Los animales fueron asignados al azar y balanceados de acuerdo a la condición corporal (CC) al momento del parto y el nivel de producción de leche de la lactancia anterior. Se dividieron en dos tratamientos experimentales, cada uno con 4 repeticiones (vacas). El Tratamiento 1 estuvo conformado por cuatro vacas sometidas a un nivel bajo de alimentación (BA). El Tratamiento 2 contó con cuatro vacas, sometidas a un nivel alto de alimentación (AA). En el grupo de animales con BA, la dieta cubría el 85% de los requerimientos totales de energía del animal, mientras que para los animales sometidos a una AA, las dietas cubrían 115% de los requerimientos totales de energía. La aplicación de los tratamientos se inició a los tres días posparto. Los requerimientos de las vacas fueron determinados en función del peso corporal y la producción de leche de la lactancia anterior (promedio diario hasta los 60 días), de acuerdo a los requerimientos del National Research Council (NRC, 1984). Se decidió mantener la relación de la cantidad de nitrógeno fermentable (NFR) y de materia orgánica degradable en el rumen (MODR) entre 25 y 30 g NFR/kg, con el propósito de evitar efectos confundidos debido a la variación entre tratamientos por dicha causa.

Medidas corporales

Se evaluó la condición corporal al momento del parto y el cambio de la CC a los 15, 30 y 45 días posparto. La CC fue clasificada en la escala del 1 al 5, según National Institute of Research in Dairyring,

modificado por Fattet y Jaurena (1988). Las vacas fueron consideradas como de CC alta al momento del parto, si tenían valores mayores o iguales a 2,5 y como de CC baja al momento del parto, si sus valores eran inferiores a 2,5.

Actividad ovárica

La evaluación de la actividad ovárica se llevo a cabo a través de la palpación rectal y del uso de ultrasonido por vía transrectal (Aloka SSD 900 Co. Ltd., Tokyo, Japón), usando una sonda lineal de 7,5 MHz. Dicha evaluación se realizó una vez por semana, antes de la aparición del primer celo y dos veces por semana, a partir de la misma (Domínguez *et al.*, 2007). Esto permitió clasificar la población folicular en el momento del examen ginecológico en varias clases: Clase 1: ≤ 5 mm, Clase 2: 6-9 mm y Clase 3: ≥ 10 mm (Díaz *et al.*, 1998). Igualmente, la evaluación con el ultrasonido permitió confirmar la presencia de cuerpos lúteos.

Prueba de tolerancia a la glucosa

A los 45 días posparto se tomaron muestras seriadas de sangre para la determinación de glucosa de las vacas sometidas al experimento. Para la toma de muestras se colocó en la vena yugular un catéter con estilete metálico (Intracath®, Becton Dickinson, México). El muestreo se inició previo al consumo de alimento (tiempo basal ó tiempo 0) y continuó, con intervalos de 30 min, hasta 3 h después del suministro del mismo. Posteriormente, se inyectó por vía endovenosa, una dosis de insulina (0,1 UI/100 kg peso vivo; Insulina Zinc ADN Recombinate Humana, HUMULIN, Eli Lilly and Company, EUA). El muestreo de sangre continuó, con intervalos de 20 min cada uno, durante 3 h adicionales para completar 6 h totales de muestreo. La concentración de glucosa fue determinada a través del método enzimático descrito por Henry (1974), cuyo principio se basa en la reacción de la glucosa oxidasa (GOP) con la glucosa de la muestra, la cual produce una coloración de color rojo, cuya intensidad es proporcional a la concentración de la glucosa (mg/dL) y es medida por espectrometría a 510 nm.

Toma de muestras de tejido en el matadero

Los animales fueron faenados a los 45 días posparto. Inmediatamente después de la faena, se procedió a la toma de muestras de tejido

adiposo a nivel intercostal. Las muestras fueron inmediatamente conservadas en nitrógeno líquido y posteriormente, almacenadas a -80°C hasta ser procesadas.

Clasificación de los ovocitos (calidad de ovocitos)

Aproximadamente 20 min después del sacrificio de las vacas, se recolectaron los ovarios para evaluar la calidad de sus ovocitos, lo cual se realizó en el Laboratorio del Instituto de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV. Los ovarios se separaron con bisturí y se colocaron en frascos que contenían 500 mL de medio de transporte (solución salina estéril a temperatura entre $37-39^{\circ}\text{C}$). Luego, aproximadamente a las 4 h de recolectadas se procedió a la aspiración de los folículos con diámetros mayores a 2 mm, usando para esto una jeringa de plástico de 5 mL con aguja calibre 18 (Weplast®). El contenido aspirado se colocó en tubos cónicos de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), que contenía el medio de cultivo modificado con líquido folicular humano (HTF, Irvine Scientific, UK).

Finalmente, se clasificaron los ovocitos, colocando el precipitado con una pipeta de transferencia estéril en una placa de cultivo de 100 mm (Costa Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), la cual contenía el medio de maduración HTF (pH 7,4) a 37°C . Mediante el uso de un estéreomicroscopio (Carl Zeiss, Modelo Stemi SV8, Jena GmbH, Jena, Germany) con aumento de 100X, los ovocitos fueron clasificaron en: Ovocitos tipo A (ovocitos con presencia de un cumulus oophurus claro y compacto y un ooplasma oscuro), B (ovocitos con un cumulus oophurus oscuro y compacto y un ooplama oscuro) y C (ovocito con cumulus oophurus oscuro y expandido y ooplasma oscuro) (Boni *et al.*, 2002).

Expresión del Glut-1 y Glut-4 mediante la técnica de Western Blot

Se preparó un minigel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (10-5% p/v) del tipo discontinuo (SDS-PAGE). En este gel, se descargaron 200 μg de proteínas (cuantificadas mediante kit de BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA) del tejido adiposo de cada animal. Las proteínas fueron separadas mediante un sistema de electroforesis vertical (GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA). Además, se cargó el gel con diferentes estándares: estándar

precoloreado de proteínas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), muestras de tejido adiposo de rata y ratón (100 µg, como controles positivos) y una muestra de ganglio bovino (100 µg, como control negativo).

Se realizó la corrida electroforética del gel a 120 V, durante 3 h a 4°C. Las bandas proteicas fueron transferidas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa (45 µm; Sigma, St. Louis MI, EUA), mediante un equipo de transferencia semi seco (Owl Separation System, Portsmouth, NH, EUA). Para este procedimiento, se aplicaron 14 V durante 1,5 h a 4°C. Las membranas fueron bloqueadas con solución buffer Tris-Tween (2,42 g de Base Tris + 29,24 g de NaCl + 0,5 mL Tween-20 / 1 L de H₂O destilada; TBST, pH 7,5), que contenía 5% de leche deshidratada y descremada. Este procedimiento se realizó durante 1 h a 4°C.

La membrana se incubó con el primer anticuerpo para el Glut-1 de humano producido en conejo (H-43: sc-7903, Santa Cruz Biotechnology, EUA) a una dilución 1:100 durante 16-20 h a 4°C, luego de lo cual fue lavada tres veces con TBST durante 5 min. Posteriormente, fue incubada con el segundo anticuerpo, policlonal de cabra anti-conejo conjugado con la enzima peroxidasa (sc: 2004, Santa Cruz Biotechnology, EUA), durante 1 h a 4°C. El segundo anticuerpo fue usado a una dilución de 1: 5000.

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

Luego, la membrana fue incubada con el primer anticuerpo para el Glut-4 de humano producido en cabra (C-20: sc-1608, Santa Cruz Biotechnology, EUA) a una dilución 1:100 durante 16-20 h. Posteriormente fue incubada con el segundo anticuerpo, IgG (molécula completa) de conejo anti-cabra conjugado con la enzima peroxidasa (A-5420, Sigma St. Louis, MI, EUA), durante 1 h a 4°C. El segundo anticuerpo fue usado a una dilución de 1: 80.000. Luego se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados a través del paquete estadístico SPSS (2000), versión 10. Para evaluar el efecto del nivel de alimentación sobre la CC al momento del parto y el cambio de CC, poblaciones foliculares, presencia de cuerpo lúteo y tipos de ovocitos, por ser todas variables respuestas de tipo cualitativo (discretas) se recurrió a estadística no paramétrica. Primero, se calculó una matriz de correlación no paramétrica de Kendall y posteriormente se realizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal y Wallis, por tener solo un criterio de clasificación.

Las concentraciones de glucosa plasmática con y sin administración de insulina fueron analizadas empleando el mismo paquete estadístico, mediante un análisis de varianza univariado para medidas paramétricas. El modelo estadístico incluyó tratamiento, tiempo y la interacción tiempo*tratamiento, y los niveles de glucosa como variable dependiente.

RESULTADOS

Medidas corporales

El análisis de la matriz de correlación no paramétrica y el ANAVAR no mostró efecto del nivel de alimentación sobre la CC al parto.

Actividad ovárica

El análisis no paramétrico de los datos no detectó asociaciones entre las clases de folículos ováricos y el nivel de alimentación; así como tampoco se detectó este efecto al aplicar el ANAVAR. Además, no se detectó efecto de nivel de alimentación sobre la aparición del CL.

Prueba de tolerancia a la glucosa

El nivel de alimentación de las vacas afectó significativamente ($P < 0,05$) la concentración plasmática de glucosa posprandial. Los valores de glucosa previa inyección de insulina fueron en promedio de 58,04 y 64,62 mg/dL para los animales sometidos a los tratamientos BA y AA, respectivamente (Figura 1). La concentración de glucosa posterior a la inyección de insulina también fue afectada significativamente por el tipo de alimentación ($P < 0,01$). Los animales sometidos a AA mostraron los niveles más bajos de glucosa plasmática posterior a la inyección de insulina en comparación al grupo sometido a BA

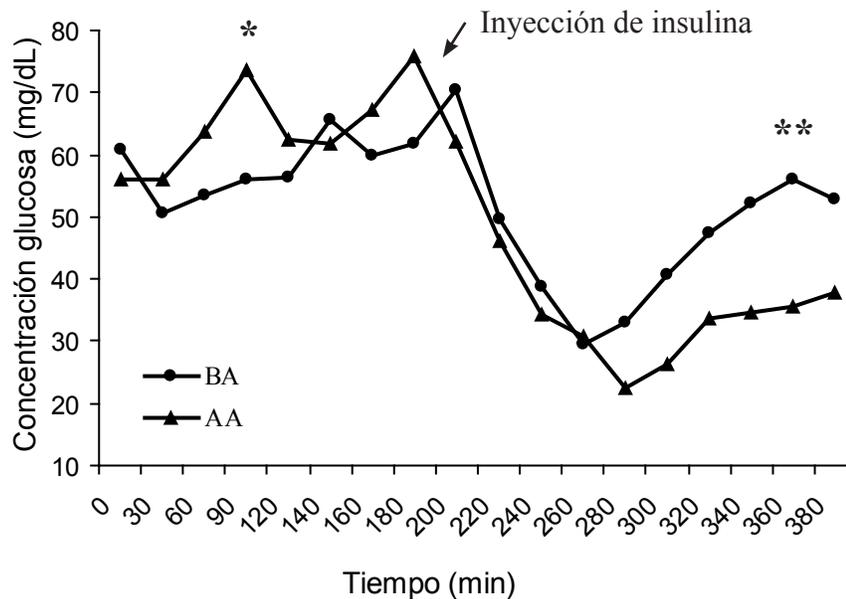


Figura 1. Concentración plasmática de glucosa (mg/dL) antes y después de la administración de insulina en vacas mestizas sometidas a dos niveles de alimentación. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

(22,60 vs. 29,53 mg/dL), así como el efecto de la insulina fue más prolongado para el tratamiento 2 (80 min posinyección de insulina), en comparación con los animales sometidos al tratamiento 1, los cuales comenzaron a recuperar sus valores plasmáticos de glucosa a los 60 min posinyección de insulina (Figura 1).

Calidad de los ovocitos

El análisis de la matriz de correlación no paramétrica reveló una relación de 0,756 ($P < 0,05$) entre los ovocitos tipo A y el los tratamientos aplicados. Además, al analizar los datos mediante el ANAVAR se pudo evidenciar que el nivel de alimentación afectó significativamente ($P < 0,05$) el porcentaje de ovocitos tipo A (Cuadro 1). En la Figura 2 (a, b y c) se pueden observar los tipos de ovocitos encontrados en el experimento. Los promedios de ovocitos tipo A para los tratamientos 1 y 2 fueron 0,620 y 0,845, respectivamente, aplicando un ANAVAR no paramétrico.

Expresión del Glut-1 y Glut-4

La expresión del Glut-1 fue demostrada mediante la aparición de una banda de peso molecular de aproximadamente 55 kDa. La mayor expresión del receptor de Glut-1 en el tejido adiposo, medido como unidades de densidad óptica, se presentó en las vacas

sometidas a un BA en comparación con las que fueron sometidas a un AA, independientemente de la CCde las vacas al momento del parto (Figura 3).

En el caso del Glut-4, se identificó una banda proteica de aproximadamente 60 kDa. Al evaluar la expresión del Glut-4 en el tejido adiposo, se pudo observar una mayor expresión de este transportador de glucosa en los animales sometidos a un AA en comparación con los que fueron sometidos a un BA (Figura 4).

DISCUSIÓN

Las vacas sometidas al tratamiento 1 mostraron un menor número de ovocitos maduros tipo A. Se ha reportado que una alimentación insuficiente y/o sin balancear puede causar graves desórdenes reproductivos y un retraso en el inicio de la ovulación (Ferguson, 1996). Una deficiencia energética puede reducir el crecimiento folicular y el desarrollo y secreción hormonal de IGF-I, estrógeno y progesterona (Reksen y Ropstad, 2002). El desbalance energético negativo (BEN) puede afectar la calidad de los ovocitos, durante el período de posparto temprano (Buttler, 2005), imprimiendo condiciones negativas dentro de los folículos durante su desarrollo, fundamentalmente durante los días 60-80 del posparto. En el presente estudio se evidenció

Cuadro 1. Tipos de ovocitos (%) en vacas mestizas sometidas a dos niveles de alimentación

Tratamiento	Ovocitos	Tipos de ovocitos		
		A	B	C
	N°	----- % -----		
BA	21	66,67	14,29*†	19,05
AA	17	82,3*	5,8	11,7

† Asterisco indica diferencia significativa (P<0,05) entre medias



Figura 2. Tipos de ovocitos. a). Tipo A, b) Tipo B y c). Tipo C

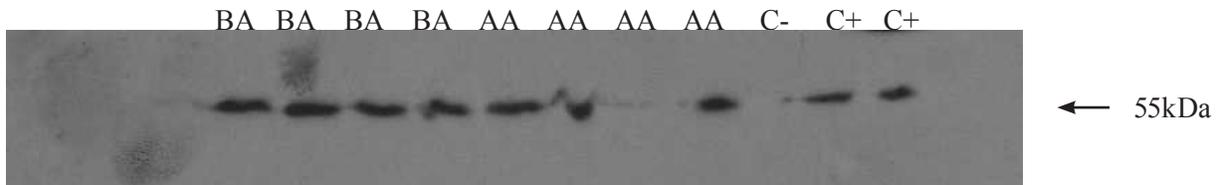


Figura 3. Expresión del Glut-1 en el tejido adiposo de vacas mestizas sometidas a dos niveles de alimentación

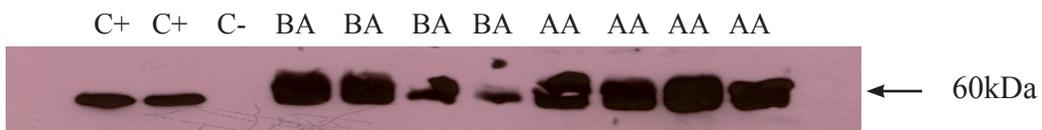


Figura 4. Expresión del Glut-4 en el tejido adiposo de vacas mestizas sometidas a dos niveles

que de los animales que recibieron un AA, el 83,3% de sus ovocitos fueron del tipo A. Fihri *et al.* (2005) colectaron ovocitos de vacas de diferentes CC faenadas en matadero y encontraron que en las vacas de alta condición el 79% de dichos ovocitos fueron de buena calidad ($P < 0,05$). Las vacas de pobre CC tuvieron bajos rendimientos en el número de ovocitos colectados, lo cual estuvo relacionado con el nivel de energía de la dieta. Kendrick *et al.* (1999) señalaron que el rendimiento en la aspiración de ovocitos fue mayor en vacas que consumían dietas altas en energía. De hecho, la CC tiene un significativo efecto sobre el número de folículos y sobre el rendimiento y calidad de los ovocitos (Rhind *et al.*, 1989; Domínguez, 1995; Kumar *et al.*, 1998). Las observaciones de los trabajos anteriormente mencionados indican que la calidad de los ovocitos está asociada con la reducción de la fertilidad en las vacas de baja CC al parto, las que probablemente estén en un balance energético negativo. En el presente estudio, no pudo ser evidenciado efecto del nivel de alimentación sobre la CC, aunque se detectó una asociación significativa entre los folículos Clase 1 con los cambios en la CC.

En cuanto a la concentración de glucosa, previo a la inyección de insulina, ésta estuvo afectada por el nivel de alimentación, siendo mayores las concentraciones registradas en los animales que recibieron un AA, como era de esperarse. El descenso en las concentraciones plasmáticas de glucosa después de la inyección de insulina fue mayor en los animales sometidos a un AA, así como el efecto de esta hormona se mantuvo más en el tiempo en este grupo (Figura 1), lo que permite sugerir que después de la liberación de insulina posprandial, los niveles de glucosa sanguíneas normales se recuperan más rápidamente en animales sometidos a un BA, debido a que estos animales pudieran hacerse no dependientes de la insulina para mantener sus requerimientos energéticos, sobre todo los del sistema nervioso. Uno de los mecanismos que pone en marcha el organismo animal para compensar esta situación de déficit de nutrientes es a través de la modificación de la expresión de algunos genes, como los que codifican para los transportadores de la glucosa. Así, en el presente estudio se observó un incremento de la expresión del Glut-1 en el tejido adiposo de los animales sometidos a un BA. Esto coincide con los resultados presentados por Rubio *et al.* (1996), los cuales evidenciaron cómo la hipoglicemia crónica de las ratas mal-nutridas

influyó sobre el aumento de la expresión del Glut-1. Estos resultados sugieren que ante el suministro de niveles energéticos bajos en la dieta, el organismo animal puede compensar el déficit nutricional sobre-expresando los transportadores de glucosa que no dependen de la insulina para de esta forma captar la mayor cantidad posible de la glucosa circulante. En cuanto a la expresión del Glut-4, fue mayor en los animales sometidos a un AA (Figura 4), difiriendo con lo reportado por Rubio *et al.* (1996), los cuales no pudieron evidenciar alteración en el contenido global del Glut-4, tanto de tejido muscular como adiposo. Es de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, en animales sometidos a diferentes planos nutricionales, la estimulación de la síntesis de transportadores de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina, como es el tejido muscular y adiposo (Kahn, 1994). Ha sido reportado que el balance energético negativo conduce a bajos niveles hormonales (insulina e IGF), así como al descenso en los niveles de glucosa (Buttler, 2000), lo cual podría explicar el bajo número de ovocitos observado en el grupo de animales que recibieron un BA.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio permiten sugerir que el nivel de alimentación afecta la calidad de los ovocitos, especialmente los del tipo A, debido a que las restricciones nutricionales, particularmente las del tipo energético, podrían afectar la actividad reproductiva, así como a la concentración de algunos metabolitos como es el caso de la glucosa, los cuales imprimen un efecto negativo sobre la actividad reproductiva.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fonacit) por haber aportado los recursos económicos (Proyecto G-2005000446) para llevar a cabo esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Bach A. 2001. La reproducción del vacuno lechero: Nutrición y Fisiología. XVII Curso de Especialización. Avances en nutrición y alimentación animal. FEDNA. Purina, España.
- Boni R., A. Cuomo y E. Tosti. 2002. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-

- oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores *B. Rep.*, 66: 836-842.
- Buttler W. R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Rep. Sci.* 60 –61: 449–457.
- Buttler R. 2005. Relationship of dietary protein and fertility. *Adv. Dairy Tech.*, 17.: 159-168.
- Cronjé P., M. Jager y E. Vlok. 2000. Nutrient partitioning and response to insulin challenge at different planes of nutrition during lactation in goats of high vs. low milk production potential. *South African J. Anim. Sci.*, 30(3): 178 – 185.
- Diaz T., E.J-P Schmitt, R.L. de la Sota, M.J. Thatcher y W.W. Thatcher. 1998. Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *J. Anim. Sci.*, 76: 1929–1936.
- Díaz T. 1999. Dinámica del desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral en el bovino. *Rev. Fac. Cien. Vet. UCV*, 40: 3-18.
- Domínguez C., P. Herrera, B. Birbe y N. Martínez. 1998. Impacto de la suplementación estratégica con bloques nutricionales en vacas de doble propósito. *En* C. González Stagnaro, N. Madrid Bury y E. Soto Belloso (Eds). *Mejora de la Ganadería Mestiza de Doble Propósito*. Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Facultad de Agronomía, CONDES, GIRARZ. Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela. pp. 349-379.
- Domínguez C.E., J. Garmendia y N. Martínez. 2007. Influencia de la época de parto, la condición corporal y la suplementación sobre la actividad ovárica posparto de vacas mestizas bajo pastoreo mixto en el norte del estado Guarico, Venezuela. *Rev. Fac. Cien. Vet. LUZ*, 48(1): 37-50.
- Dominguez M.M. 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology*, 43: 1405-1418.
- Eppig J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122: 829-838.
- Fattet I. y M. Jaurena. 1988. *El Estado Corporal de las Vacas Lecheras*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Fihri A.F., H. Lakhdissi, L. Derqaoui, M. Naciri y A. Goumari. 2005. Genetic and nongenetic effects on the number of ovarian follicles and oocyte yield and quality in the bovine local (*Oulmes zaer*), exotic breeds and their crosses in Morocco. *African J. Biotech.*, 4(1): 9-13.
- Ferguson J.D. 1996. Diet, production and reproduction in dairy cows. *An. Feed Sci. Tech.*, 59: 173-184.
- Fortune J.E., G.M. Rivera y M.Y. Yang. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Rep. Sci.*, 82- 83: 109-126.
- Hafez E.S.E. y B. Hafez. 2000. Folliculogenesis, egg maturation, and ovulation. *En* Hafez E.S.E. y B. Hafez (Eds.) *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams & Wilkins. PA, pp. 68-81.
- Hocquette J.F. y H. Abe 2000. Facilitative glucose transporters in livestock species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40(6): 517-533.
- Iain J.C. y A. Henry. 1999. Leptin and reproduction. *Rev. Rep.*, 4: 48-55.
- Henry R.J. 1974. *Clinical Chemistry. Principles and Techniques* 2^{da} ed, Harper & Row, New York, NY..
- Kahn B.B. 1994. Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose tissue cells and muscle. *J. Nutr.* 124(8 suppl): 1289S-1295S.
- Kendrick K.W., T.L. Bailey, A.S. Garst, A.W. Pryor, A. Ahmadzadeh ARM. Akers, W.E. Eyestone, R.E. Pearson y G. Gwazdauskas. 1999. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows, using transvaginal follicular aspiration. *J. Dairy Sci.*, 82: 1731-1740.
- Kühn, C., Bellmann, O., Voigt, J., Wegner, J., Guiard, V. y K. Ender. 2004. An experimental approach for studying the genetic and physiological background of nutrient transformation in cattle with respect nutrient secretion and accretion

- type. Research Institute for the Biology of Farm Animals, Dummerstorf, Alemania.
- Kumar B., S.M. Francis, J.M. Suttie y M.P. Thompson. 1998. Expression of obese mRNA in genetically lean and fat selection line sheep. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120: 543-548.
- Martínez, N., P. Herrera, B. Birbe y C. Domínguez. 1998. Relación entre la condición corporal y la respuesta reproductiva de hembras bobinas de doble propósito. *En* C. González, N. Madrid-Bury y E. Soto Belloso (Eds). *Mejora de la Ganadería Mestiza de Doble Propósito*. Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Facultad de Agronomía, CONDES, GIRARZ. Ediciones Astro Data, Maracaibo. Venezuela. pp.398-412.
- Morrison C.D., J.A. Daniel, B.J. Holmberg, J. Djiane, N. Raver, A. Gertler y D.H. Keisler. 2001. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: Effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *J. Endocrin.*, 168: 317-324.
- NRC.1984. *Nutrient Requirement of Beef Cattle 6th ed*, National Academy Press. Washington, DC.
- Payne J.M. 1989. *Metabolic and nutritional diseases of cattle*. Blackwell Scientific. Oxford. Londres.
- Reksen O y E. Ropstad. 2002. Influence of dietary energy and protein on reproductive performance in dairy cattle. *Norsk-Veterinaertidsskrift*, 114(1): 21-25.
- Rhind S.M., W.A.C. McKelvey, S.R. McMillen, R.G. Gunn y D.A Elston. 1989. Effect of restricted food intake, before and/or after mating, on the reproductive performance of greyface ewes. *Anim. Prod.*, 48: 149-155.
- Rubio E., M. Agote, F. Escriba y A.M. Pascual-Leone. 1996. Contenido en glut-4 y glut-1 en respuestas in vivo a la insulina en músculos de ratas subnutridas y realimentadas. *Ars. Pharma.*, 37: 957-969.
- Quintela L.A., M.E. García, A.I. Peña, A.C. Díaz, M. Barrio, J.J. Becerra y P.G. Herradón. 2003. Asociación entre el perfil sérico bioquímico y la duración de la involución uterina en hembras bovinas de producción láctea. *Arch. Zootec.*, 52: 419-429.