

Influencia de las alteraciones metabólicas sobre la actividad PEPCK, la generación de IGF-1 plasmático y la reactivación ovárica en vacas en la lactancia temprana.

Rubén D Galvis¹, Zoot, MS; Héctor J Correa¹, Zoot, MS; Nicolás F Ramírez², MV; Wilmer Soler³, Biol, MS.

¹Departamento de producción animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional, seccional Medellín; AA 9779.

²Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia; AA 1226.

³Departamento de fisiología y bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; AA 1226. rubengalvis@micorreoepm.net.co

(Recibido: 28 mayo, 2003; aceptado: 9 septiembre, 2003)

Resumen

Con el fin de evaluar la influencia de las alteraciones en el metabolismo energético y proteico sobre la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK), la generación de insulina, del factor I insulinoide de crecimiento (IGF-1) y sobre la reactivación ovárica, se utilizaron 10 vacas Holstein, las cuales se muestrearon el día 12 parto y los días 12, 24, 35 y 100 posparto (días en lactancia, DEL) con el fin de determinar el balance de energía neta de lactancia (EN_L), las concentraciones plasmáticas de urea (BUN), glucosa, colesterol total, amonio, b-OH butirato, ácidos grasos no esterificados (AGNE), insulina, IGF-1 y la actividad glutamato oxaloacetato transaminasa (AST). Adicionalmente los días 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 posparto se determinó la concentración de progesterona plasmática (p4). El día 12 parto, 12 y 24 posparto se tomaron biopsias de hígado con el objetivo de estimar la actividad (PEPCK). Los valores de glicemia e IGF-1 fueron significativamente más bajos en el posparto. Los valores promedio de b-OH butirato, BUN, amonio e insulina plasmáticos no presentaron variaciones significativas entre periodos. Los valores de AST fueron significativamente más bajos en el parto que en el posparto. Los valores más bajos de AGNE correspondieron en su orden al muestreo correspondiente al día 100 posparto y al muestreo parto. La actividad PEPCK fue significativamente más alta en el parto que en el posparto. Se encontraron relaciones positivas entre PEPCK y BUN, y entre EN_L y p4. Se encontraron relaciones negativas entre PEPCK y β -OH butirato y entre AGNE y p4. La relación entre PEPCK e IGF-1 y entre AGNE y p4 pudo ser debida a un efecto indirecto de la glicemia y de EN_L . Solo las vacas con EN_L superior a -10% de los requerimientos presentaron reactivación ovárica.

Palabras clave: transición, metabolismo, reproducción

Introducción

La absorción intestinal de glucosa en los rumiantes es muy baja debido a que la fermentación ruminal condiciona su disponibilidad (22). Dado que la glándula mamaria es capaz de utilizar glucosa en presencia de bajas concentraciones de insulina, y debido a las altas demandas por glucosa para la producción lechera al inicio de la lactancia, esta afecta la glicemia, la cual debe estabilizarse

por incremento en la tasa de gluconeogénesis y por disminución en las tasas de oxidación de la glucosa (10).

La capacidad de repuesta metabólica ante la reducción de la glicemia se puede ver disminuida por la exagerada movilización lipídica y el exceso de proteína cruda en la dieta. Se ha encontrado que en vacas con lipidosis hepática, la actividad de las enzimas claves de la gluconeogénesis es más baja que en las vacas sanas (19). Un trabajo reciente demostró que la adición *In vitro* de

cloruro de amonio (NH_4Cl) a hepatocitos ovinos disminuyó la tasa de gluconeogénesis (15).

En ruminantes el principal factor que regula la insulínogénesis es la glicemia (10) y tanto la glucosa como los esqueletos carbonados de aminoácidos e insulina o IGF-1, pueden modular la tasa de ovulación independientemente de las concentraciones plasmáticas de FSH por efectos directos en el ovario sobre el desarrollo folicular (8).

Todo lo anterior estaría sugiriendo la existencia de una fuerte interrelación entre el estado nutricional de los animales y su actividad reproductiva al inicio de la lactancia. Recientemente fue señalada la existencia de una alta incidencia de problemas metabólicos, reproductivos y nutricionales en los sistemas de lechería especializada en Antioquia que podrían estar asociados a la existencia de interrelaciones complejas entre las alteraciones metabólicas y las fallas reproductivas (4).

Se propone entonces, que en la lactancia temprana se potencializan los factores hormonales que favorecen la baja concentración de insulina e IGF-1 que sumados a la coexistencia de factores adversos como la ace-lerada movilización lipídica y los excesos de amoníaco, estarían reduciendo significativamente la tasa de gluconeogénesis y por ende la glicemia, conduciendo en último término a una disminución marcada de las concentraciones plasmáticas de insulina e IGF-1, los cuales son factores de crecimiento ovárico.

El propósito de este trabajo fue evaluar la influencia de las alteraciones en el metabolismo energético y proteico, sobre la actividad gluconeogénica, la generación de factores de crecimiento ovárico como IGF-1 y la reactivación ovárica en vacas Holstein en el posparto temprano.

Materiales y métodos

Localización

El trabajo de campo se llevó a cabo en la Ganadería La Montaña de la Universidad de Antioquia, ubicada a 2475 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 14°C y una humedad relativa promedio de 79.7% en una

formación ecológica de bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB).

Animales

Se utilizaron 10 vacas Holstein que cursaban la segunda o la tercera lactancia, las cuales ingresaron al experimento entre el 17 de noviembre de 2000 al 1 de febrero de 2001 cuando les faltaba 12 días para la fecha prevista del parto.

Toma de muestras

El experimento se realizó entre el 17 de noviembre de 2000 y el 20 de mayo de 2001 periodo dentro del cual a las vacas se les tomó muestras de sangre los días 12 preparto (esperado) y 12, 24, 35 y 100 días posparto. Estas se tomaron de la vena yugular derecha con tubos al vacío (secos, con EDTA y con heparina), siempre entre las 10:00 y las 11:00 a.m. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos, se separó el suero o el plasma, según el caso y se envasaron en alícuotas de 2.0 ml. Así mismo, durante los días 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 posparto se tomaron muestras de sangre para la cuantificación de progesterona.

Se tomaron biopsias de hígado en el día 12 preparto (esperado), 12 y 24 posparto utilizando una técnica descrita previamente (20). Se obtuvieron aproximadamente 100 mg de tejido hepático, el cual se sumergió en viales de 2 ml conteniendo una solución 0.25 M de sucrosa. Todas las muestras se almacenaron a -10°C para su transporte y a -72°C hasta su análisis.

Análisis químicos

A las muestras de forraje y suplementos alimenticios se les determinó el contenido de Fibra en Detergente Neutro (FDN) por métodos descritos previamente (21), mientras que el contenido de carbohidratos no estructurales se estimó por diferencia (7). Con los datos de FDN y utilizando ecuaciones reportadas (11, 12) se estimó el contenido de energía neta de lactancia (EN) del forraje y de los suplementos alimenticios. El consumo de materia seca del forraje se estimó por diferencia, utilizando una ecuación propuesta por la National Research Council (13).

Balace nutricional

El balance para EN_L se calculó por la diferencia entre los requerimientos estimados (12) y los aportes de la dieta consumida por cada animal durante cada muestreo, para tal efecto se utilizaron hojas de cálculo previamente elaboradas (2).

Cuantificación de metabolitos

En las muestras de sangre se cuantificaron las concentraciones de urea, glucosa, colesterol total y la actividad de la enzima aspartato-succinil transaminasa (AST) mediante el kit SERA-PAK® (Bayer, Tarrytown NY). Para estimar la concentración de amonio se utilizó el kit 171-UV (Sigma, St Louis MO), mientras que para la determinación de b-OH butirato se utilizó el kit 310-UV (Sigma, St Louis MO) y para los ácidos grasos no esterificados (AGNE) se utilizó el kit NEFA-C® 994-75409 E (Wako, Dallas TX). La concentración de insulina, IGF -1 y progesterona, se determinó mediante radioinmunoanálisis utilizando los kit (Diagnostic systems laboratories Inc, Webster TX) DSL-1600, DSL-5600 y DSL-3900, respectivamente.

Actividad gluconeogénica

Para la determinación de la actividad gluconeogénica las muestras de aproximadamente 100 mg de tejido hepático tomadas los días 12 preparto y 12 y 24 posparto se introdujeron por 2 minutos en un homogenizador manual de vidrio, previamente sumergido en hielo y conteniendo 9 volúmenes (900 ml) de un medio de extracción consistente de 100 mM-tris/HCL, 1mM-EDTA, 5 mM-MgCl₂ y 20 mM de b-Mercaptoetanol a un pH final de 7.5 (3). Los homogenados fueron

centrifugados a 2000 revoluciones por minutos por 5 minutos y a 4°C en una centrífuga Biofugue® (Heraeus Instruments, Hanau Germany) y el sobrenadante fue utilizado para determinar la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato-carboxikinasa (PEPCK).

Para la determinación de la actividad de la enzima PEPCK (16) se utilizó un medio de reacción con un volumen final de 1.0 ml y consistente de: 50 mM-Tris/HCL (pH 7.4), 20 mM-NaHCO₃, 0.5 mM-Fosfoenolpiruvato, 1mM-MnCl₂, 0.1 mM-NADH, 0.15 mM-dGDP, 2 unidades de malato deshidrogenasa y 100 ul de sobrenadante de homogenado. Todos los reactivos fueron proveídos por SIGMA chemical, Co. (St Louis, MO). La preparación de los medios de reacción se hizo en tubos previamente sumergidos en hielo; luego estos fueron preincubados a 30°C por 3 minutos; la reacción fue iniciada con la adición simultánea de 2 unidades de la enzima malato deshidrogenasa y 100 ml de sobrenadante de homogenado. La caída en la absorbancia a 340 nm fue seguida por 2 a 5 minutos en un espectrofotómetro Beckman DU 640® (Beckman Instruments, Palo alto CA). Un control separado que no contenía NaHCO₃ fue preparado y sujeto al mismo procedimiento.

La actividad PEPCK fue estimada a partir de la diferencia en la caída de las absorbancia entre el tubo experimental y el tubo control. Una submuestra de sobrenadante de homogenado se sometió a la determinación de la cantidad de proteína a través del método Bradford y utilizando el kit Protein Assay II® 500-0002 (Biorad, Richmond CA). La actividad de la enzima PEPCK se expresó como micromoles de sustrato convertidos en producto en un minuto y por miligramo de proteína.

Tabla 1. Actividad de la enzima PEPCK por periodos de muestreo

| Periodo de muestreo [@] | | |
|----------------------------------|------------------|------------------|
| Días al parto | | |
| -12 | 12 | 24 |
| 2.6918a | 1.2099b | 1.5172b |
| μmol/min/mg prot. | μmol/min/mg prot | μmol/min/mg prot |

¹ Error estándar de la media (EEM) 0.957

² Coeficiente de determinación (R²) 0.333

³ probabilidad de cometer el error tipo I. (p) <0.05

[@]Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

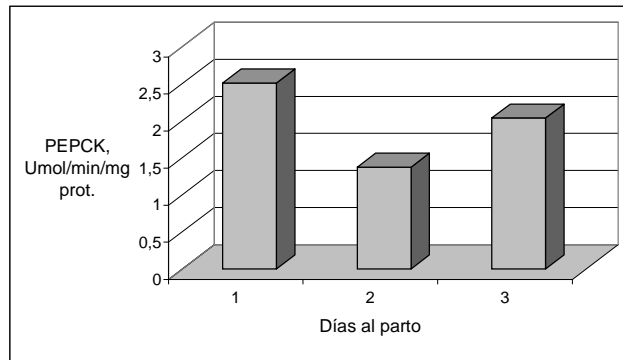


Figura 1. Promedio de la actividad de la PEPCK por periodos de muestreo.

Medias con letra distinta son estadísticamente diferentes a $p < 0.05$

Actividad ovárica

El retorno de la actividad ovárica posparto se determinó cuando las concentraciones plasmáticas de progesterona fueron superiores a 1ng/ml (1).

Análisis estadístico

Actividad gluconeogénica. Se hicieron análisis de varianza para establecer la variación en función de los periodos de muestreo y se realizó la prueba de Duncan para establecer diferencias entre medias. Para ello se utilizó el PROC GLM del programa SAS (17).

Relación entre variables metabólicas. Se estableció la relación entre la actividad gluconeogénica con las concentraciones de amoníaco, urea, AST, b-OH butirato, AGNE, insulina e IGF-1. Finalmente, se analizó la relación existente entre los valores de EN_L ,

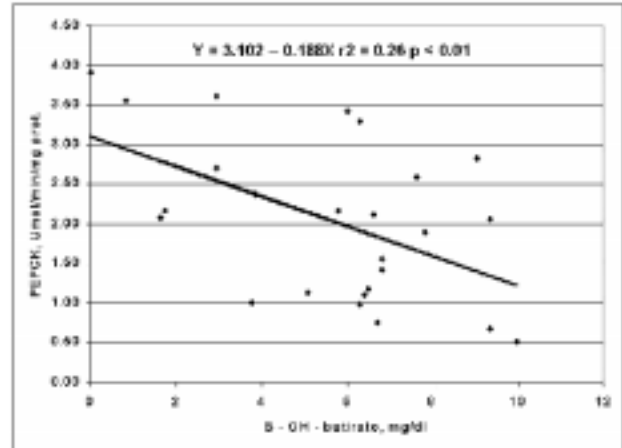


Figura 2. Ecuación de regresión que explica la variación en la actividad de la PEPCK en función de la concentración de β -OH butirato (mg/dl).

colesterol, glucosa, insulina e IGF-1 con las concentraciones plasmáticas de progesterona. Para ello se utilizó el PROC REG del programa estadístico SAS (17).

Resultados

Actividad gluconeogénica

Como indicador de la actividad gluconeogénica se utilizó la actividad de la enzima PEPCK (16). No existen reportes de la actividad PEPCK en rumiantes utilizando el método empleado en este trabajo. En la tabla 1 y en la figura 1, se consignan los resultados de la actividad PEPCK por periodos de muestreo. Como se puede observar la actividad PEPCK fue significativamente más alta en el preparto que en el posparto ($p < 0.05$). Aunque no hay diferencias significativas para el valor de actividad PEPCK a los 12 y 24 días posparto, la actividad PEPCK presentó un ligero aumento el día 24 posparto.

Tabla 2. Ecuaciones de regresión que relacionan los indicadores metabólicos con la actividad gluconeogénica.

| Variable independiente | Variable dependiente. | Intercepto. | Pendiente | ¹ R ² | ² p |
|------------------------|-----------------------|-------------|-----------|-----------------------------|----------------|
| BUN | Act. PEPCK | -0.205 | 0.08 | 0.28 | <0.01 |
| B-OH - BUTIRATO | Act. PEPCK | 3,102 | -0.19 | 0.26 | <0.01 |
| Act. PEPCK | COLESTEROL | 95,210 | 12.78 | 0.21 | <0.01 |
| Act. PEPCK | IGF-1 | -0.835 | 12.93 | 0.16 | <0.03 |

¹Coefficiente de determinación.

²Probabilidad de cometer el error tipo I

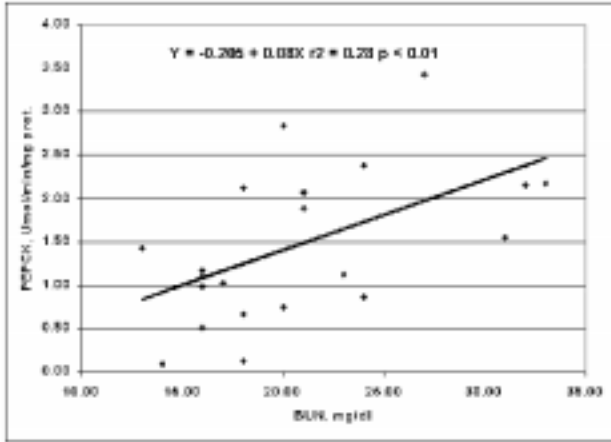


Figura 3. Ecuación de regresión que explica la variación en la actividad de la PEPCK en función del BUN.

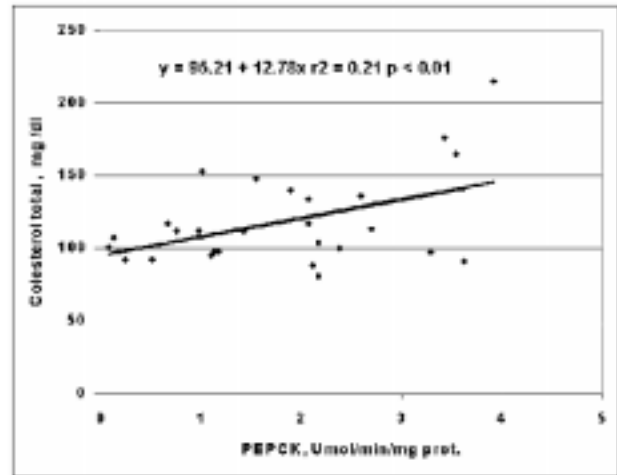


Figura 4. Ecuación de regresión que explica la variación en la concentración del colesterol en función de la actividad de la PEPCK.

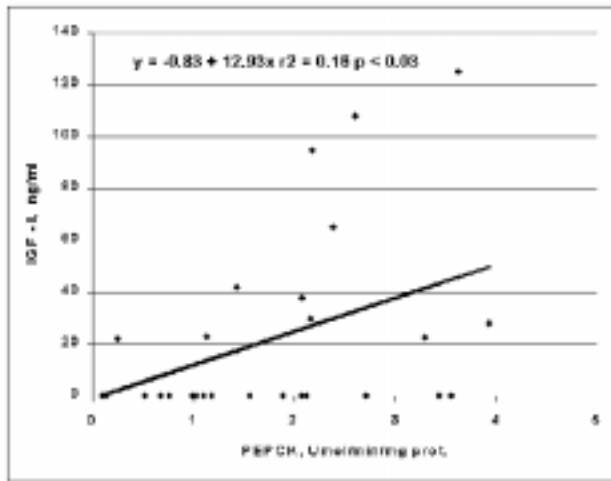


Figura 5. Ecuación de regresión que explica la variación en la concentración de IGF - I en función de la actividad de la PEPCK.

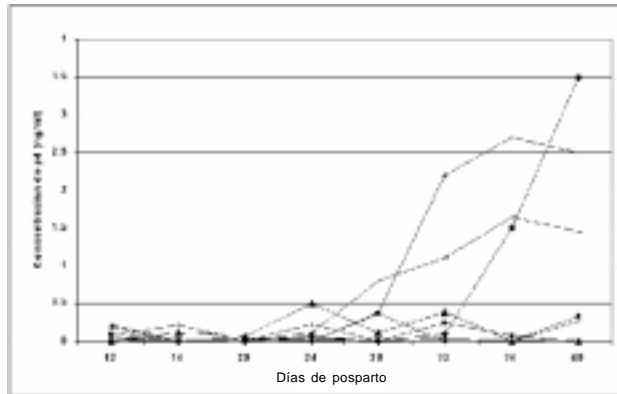


Figura 6. Variación en los niveles de p4 por vaca en función de los días posparto.

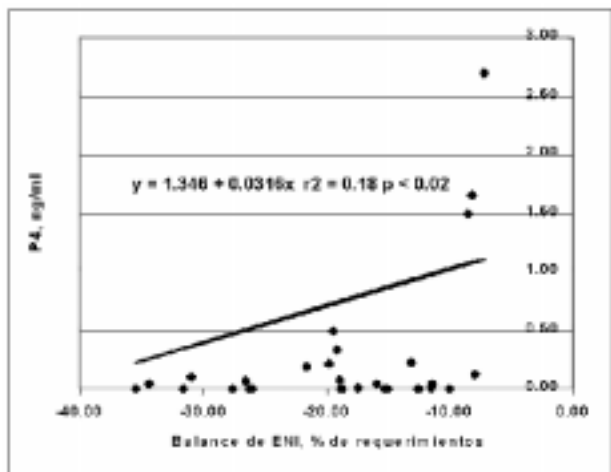


Figura 7. Ecuación de regresión que explica la variación en la concentración de p4 en función del balance de ENL.

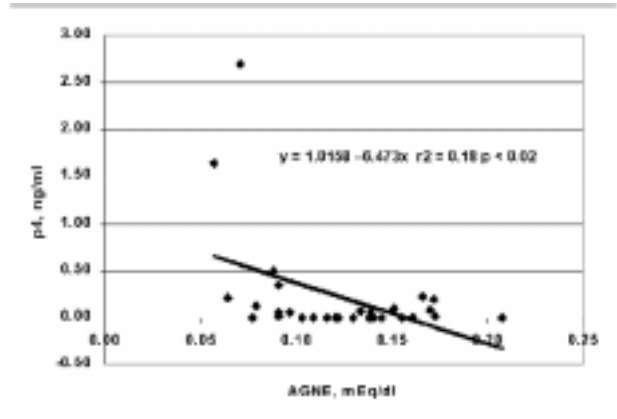


Figura 8. Ecuación de regresión que explica la variación en la concentración de p4 en función de los AGNE.

Relaciones entre indicadores metabólicos y actividad gluconeogénica

En la tabla 2 se consignan los estimativos para las relaciones estadísticamente significativas entre actividad gluconeogénica e indicadores metabólicos.

La actividad gluconeogénica se relacionó negativamente con la concentración plasmática de b-OH butirato ($p < 0.01$) (véase Figura 2) y positivamente con BUN ($p < 0.01$) (véase Figura 3) y con colesterol ($p < 0.01$) (véase Figura 4).

Se encontró una relación positiva y significativa ($p < 0.03$) entre la actividad PEPCK y los niveles plasmáticos de IGF-1 (véase Figura 5).

Aunque no se presentaron relaciones estadísticamente significativas entre AST y actividad PEPCK ni entre amonio y PEPCK, cabe destacar que ambas presentaron un coeficiente de determinación (b) negativo, lo que de alguna forma está indicando una relación negativa entre estas variables.

Reactivación ovárica

Valores de progesterona plasmática (p_4) superiores a 1 ng/ml indicaron reactivación ovárica (1). La figura 6 muestra la variación en los niveles de progesterona por vaca y por periodo de muestreo. Como puede observarse sólo tres vacas presentaron reactivación ovárica a los 40 días posparto.

No se presentaron relaciones estadísticamente significativas entre los valores plasmáticos de insulina, colesterol, glicemia, e IGF-1 con los valores de p_4 . Se encontró una relación lineal positiva y significativa ($p < 0.02$) entre EN_L y p_4 (véase Figura 7).

De igual manera se encontró una relación negativa y significativa ($p < 0.02$) entre AGNE y p_4 , la cual se ilustra en la figura 8. Como puede observarse los valores de p_4 disminuyeron conforme los valores de AGNE ascendieron.

Discusión

Actividad gluconeogénica

Theera *et al* (19) determinaron la actividad de la PEPCK por métodos radiométricos y no reportaron

diferencias significativas en la actividad PEPCK en el periodo preparto (7 y 3 días preparto) comparada con el periodo posparto (7, 14 y 21 días posparto). En otro trabajo (5) fue determinada la expresión de RNA mensajero (mRNA) para PEPCK a los días 28 y 14 preparto y a los días 1, 28 y 56 posparto encontrándose que solo los valores a los 28 y 56 días posparto fueron significativamente mayores. Por otro lado, otros autores (6) reportaron una relación estrecha entre la expresión de mRNA para PEPCK y la actividad de PEPCK en biopsias de hígado bovino. Estos autores encontraron un ligero cambio en la expresión de mRNA para PEPCK, la cual se incrementó al día 14 preparto para decrecer el día del parto e incrementarse el día 28 posparto persistiendo hasta el día 56 posparto. Los autores afirman que la ausencia de cambios en la actividad de PEPCK puede incapacitar a la vaca periparturienta a maximizar el metabolismo anaplerótico del piruvato y a la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos en el hígado y concluyen que los incrementos en la actividad de PEPCK son un reflejo en la adaptación al incremento en las necesidades de glucosa conforme se incrementa la producción de leche.

La disminución en la actividad PEPCK en el posparto temprano hace visible la dificultad que presentaron los animales para responder ante el incremento de las necesidades de glucosa. Estos resultados fueron diferentes a los reportados en otros trabajos (5, 19) en los que, si bien no hubo incrementos significativos en la actividad PEPCK en el posparto temprano, por lo menos no hubo disminución.

Relaciones entre indicadores metabólicos y actividad gluconeogénica

Las bajas actividades de PEPCK observadas a los 12 y 24 días posparto pueden ser debidas a diversos factores adversos que se presentaron en el posparto temprano tales como la acelerada movilización y oxidación lipídica, que se reflejaron en los valores plasmáticos de AGNE y β -OH butirato. Estos presentaron los valores más altos en el posparto temprano pudiendo haber afectado la actividad hepática dado que la actividad AST (indicador de actividad hepática) también presentó los valores más altos en el posparto temprano y se relacionó negativamente, aunque no significativamente, con la actividad PEPCK. Relaciones similares han sido encontradas por otros autores (19), los cuales reportaron que la actividad de la enzima PEPCK fue más baja en vacas con lipidosis hepática en la lactancia temprana.

Se observó una relación positiva entre el BUN y la actividad PEPCK que era de esperarse si se considera que en el ciclo de la urea se generan precursores gluconeogénicos (10). En vacas peri parturientas se ha podido establecer que la tasa de gluconeogénesis a partir de alanina es más del doble comparada con la tasa observadas en el preparto (14). La relación observada entre glicemia y BUN, BUN y actividad PEPCK sugiere que en el presente trabajo los aminoácidos fueron una importante fuente de carbonos para la formación de glucosa.

La relación positiva observada entre colesterol y actividad PEPCK se puede explicar en la necesidad de glucosa para la síntesis de colesterol lo que concuerda con Madsen (10) quien señala que la generación de glucosa en el posparto temprano depende principalmente de la tasa de gluconeogénesis.

Es de anotar que el metabolito que se relacionó de forma más significativa con el balance nutricional y metabólico fue el colesterol, lo que sugiere que los animales que presentaron mejores condiciones nutricionales y metabólicas también presentaron una mayor actividad gluconeogénica.

Aunque se presentó una relación positiva pero no significativa entre la glicemia y la actividad PEPCK y entre el balance de energía neta y la actividad PEPCK, varios autores (9, 18) han puesto en evidencia la relación estrecha y positiva entre el balance energético y la glicemia con los valores plasmáticos de IGF-1. Puesto que se espera que los animales con mayor actividad gluconeogénica también presenten valores más altos de glicemia, la relación entre actividad PEPCK e IGF-1 observada en el presente trabajo pudo ser debida a un efecto indirecto.

Agradecimientos

A la dirección de investigaciones de la Universidad Nacional, sede Medellín (DIME) y A la Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas por la financiación de esta investigación. Al profesor Guillermo Henao de la Universidad Nacional sede Medellín, y a laboratorios LABCO de Medellín, por su valiosa colaboración. Al personal administrativo y operativo del departamento de haciendas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia.

Aunque no se presentaron relaciones estadísticamente significativas entre amonio y la actividad PEPCK, recientemente se ha demostrado que *In vitro*, la adición de cloruro de amonio (NH_4Cl) a hepatocitos ovinos disminuye la tasa de gluconeogénesis (15). Las diferencias encontradas con los trabajos *in vitro* puede ser debida a que en estos no intervienen los mecanismos homeostáticos, por lo tanto *in Vitro*, los efectos de los excesos de amonio sobre la actividad gluconeogénica pueden ser más pronunciados.

Relaciones entre indicadores metabólicos y la reactivación ovárica

Como puede observarse en la figura 7 los valores de p4 disminuyeron conforme el balance energético negativo (BEN) se hacía más pronunciado. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Lucy *et al* (9), quienes afirman que el BEN ocasiona bajos niveles de progesterona los que, a su vez, se asocian con baja fertilidad. Se cree que la baja producción de progesterona es debida a la alteración en la capacidad esteroidogénica del cuerpo lúteo (9).

Otros autores (8), han observado que en vacas subalimentadas los efectos de la hormona FSH son bajos, y considerando la importancia de la FSH en la inducción y en el mantenimiento de la actividad de la aromatasas, se puede sugerir una influencia de la subnutrición sobre la capacidad esteroidogénica del cuerpo lúteo.

Cabe destacarse que los AGNE presentaron una asociación altamente significativa y negativa con EN_L , y como ya se explicó en el párrafo anterior los valores de p4 en esta y en otras investigaciones han sido relacionados con el BEN. Por lo tanto, la relación observada entre AGNE y p4 pudo ser debida a un efecto indirecto del BEN.

Summary

Metabolic alterations Influence on the PEPCK activity, plasmatic IGF-1 generation and ovarian reactivation in early-lactating cows

In order to assess the influence of the energetic and protein metabolism alterations on the activity of the enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), the generation of insulin, the insulin like growth factor-1 (IGF-1) and ovarian reactivation, ten Holstein cows were used obtain samples on the 12th prepartum and on the 12th, 24th, 35th and 100th postpartum days (lactation days, DEL) to determinate the balances of lactation net energy (EN_L), the concentrations of plasmatic urea (BUN), glucose, total cholesterol, ammonia, β -OH butyrate, non-esterified fatty acids (AGNE), insulin, IGF-1, and the transaminase oxaloacetate glutamate activity (AST). In addition to the before mentioned tests, the concentration of plasmatic progesterone (p4) was determined on the 12th, 16th, 20th, 24th, 28th, 32nd, 36th and 40th postpartum days. On the 12th prepartum and on the 12th and 24th postpartum days, liver biopsies were obtained to estimate the PEPCK level of activity. As a result, the glycemia and IGF-1 postpartum values were significantly lower. The average values of β -OH butyrate, BUN, ammonia, and plasmatic insulin did not show any significant variations between the two periods. Similarly, the AST values were significantly lower prepartum than postpartum. The lowest AGNE values arose, respectively, from the prepartum sample and the sample obtained on the 100th postpartum day. The PEPCK activity was significantly higher prepartum than postpartum. On the one hand, positive relations between PEPCK and BUN, as well as between EN_L and p4 were found. On the other hand, negative relations were arrived at between PEPCK and β -OH butyrate as well as between AGNE and p4. The relation between PEPCK and IGF-1, and the relations between AGNE and p4 could have occurred as an indirect effect of glycemia and EN_L . Only the cows with an EN_L higher than -10% of the requirements showed ovarian reactivation.

Key words: dairy cattle, fertility, metabolism, transition.

Referencias

- Castillo GH, Ruiz ZT, Olivera M, Jiménez C. Reactivación ovárica posparto en vacas Cebú Brahman con relación al peso y condición corporal. Rev. Col. Cienc. Pec. 1997;10: 12-18.
- Correa H. Programa de computador «LECHERIA» 2000. Hoja de cálculo para predecir requerimientos nutricionales y composición de suplementos concentrados en ganado lechero. 2000.
- Duff DA, and Snell K. Limitations of commonly used spectrophotometric assay methods for phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in crude extract of muscle. Biochem. J. 1982; 206:147-152.
- Gaviria BG, Gutiérrez HN, Molina SE, Ruiz MI, Tamayo PC, *et al.* Estudio de la infertilidad bovina en las zonas lecheras de Antioquia. U de A, Sec. Agric, ICA, Colanta. 1999. 100 p.
- Greenfield RB, Cecava MJ y Donkin SS. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. J. Dairy Sci. 2000; 83: 1228-36.
- Hartwell JR, Cecava MJ, Donkin SS. Rumen undegradable protein, rumen-protected choline and mRNA expression for enzymes in gluconeogenesis and ureagenesis in periparturient dairy cows. J. Dairy Sci. 2001; 84 :490-97.
- Heinrichs J, and Lammers B. Monitoring dairy heifer growth. Pennsylvania State University. 2001. <http://www.das.psu.edu/dcn/calfmg/growth/docs/measure.html>
- Jolly PD, McDougall S, Fitzpatrick LA, Macmillan KL, Entwistle KW. Physiological effects of undernutrition on postpartum anoestrus in cows. J. Reprod. Ferti. suppl. 1995; 49: 477-92.
- Lucy MC, Thatcher WW, Staples RC. Postpartum function: Nutritional and physiological interactions. En: Van Horn, Wilcox CJ (ed). Large Dairy Herd Management. First ed, Champaign, 1992; 135-45.
- Madsen A. Metabolism in liver cells. In: Riis PM. Dynamic Biochemistry of Animal Production. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1983. p. 53 - 74.

11. Mertens D R. Using neutral detergent fiber to formulate dairy rations and estimate the net energy content of forages, Animal and Dairy Science dept, University of Georgia, Athens, Proc. Cornell Nutr. Conf. 1983. 305p.
12. National Research Council. The nutrient requirements of dairy cattle. 6 edition; National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1989; 157p.
13. National Research Council. The nutrient requirements of dairy cattle, 7 ed, National Academy Press, Washington D, C, 2001; 230p.
14. Overton TR, Drakley JK, Douglas GN, Emert LS, Clark JH. Hepatic gluconeogenesis and whole body protein metabolism of periparturient dairy cows as affected by sources of energy and intake of the prepartum diet. J. Dairy Sc. 1998; 81(suppl 1): 295.
15. Overton TR, Drackley JK, Otteman CJ, Beaulieu AD, Clark JH et al. Substrate utilization for hepatic gluconeogenic is altered by increased glucose demand in ruminant. Journal of Animal Science. 1999; 77: 1940-1951.
16. Petrescu I, Bojan O, Saied M, Barzu O, Schmidt F, Kuhnle F. Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity with deoxyguanosine 5-diphosphate as nucleotide substrate. Analytical biochemistry. 1979; 96:279-81.
17. SAS/STAT User's Guide: Statistics, Versión 6. 4 edition. 1989. SAS Inst, Inc, Cary, NC.
18. Spicer LJ, Tucker WB, Adams GD. Insulin like growth factor-I in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. J. Dairy Sci. 1990; 73:929-37.
19. Theera R, Wensing T, Geelen MJ. Effect of fatty liver on hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows. J. of Dairy Sci. 1999; 82: 500-05.
20. Van den Top AM, Wensing TH, Geelen MJ, Wentink GH, Vant Klooster Ath and Beynen, AC. Time trends of plasma lipids and hepatic triacilglicerol synthesizing enzymes during postpartum fatty liver development in dairy cows with unlimited access to feed during dry period. Journal of dairy science. 1995; 78:2208-2220.
21. Van Soest PJ, and Robertson JB. Analysis of forrage and fibrous foods. A laboratory manual for animal science. Cornell University, 1985. 503p.
22. Van Soest, P. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Second Edition. Cornell University Press, Ithaca, New York. 476 p