

EVALUACION DEL EFECTO DE LOS FITOESTROGENOS SOBRE EL PERFIL HORMONAL EN VACAS HOLSTEIN

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FITOESTRÓGENOS PRESENTES EN ALFALFA (*medicago sativa l*) Y TRÉBOL ROJO (*trifolium pratense*) Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE EL PERFIL HORMONAL EN VACAS HOLSTEIN EN LA GRANJA TUNGUAVITA PAIPA-BOYACÁ.

CARLOS EDUARDO RODRÍGUEZ MOLANO

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELAS DE POSTGRADOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUNJA 2013

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FITOESTRÓGENOS PRESENTES EN ALFALFA (*medicago sativa l*) Y TRÉBOL ROJO (*trifolium pratense*) Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE EL PERFIL HORMONAL EN VACAS HOLSTEIN EN LA GRANJA TUNGUAVITA PAIPA-BOYACÁ.

CARLOS EDUARDO RODRÍGUEZ MOLANO

CODIGO 201023765

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar el título de Magister en
Ciencias Biológicas**

DIRECTOR: JOSÉ LUIS PORRAS VARGAS

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MSc. CIENCIAS VETERINARIAS

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELAS DE POSTGRADOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUNJA 2013

CONTENIDO

CONTENIDO	3
LISTA DE TABLAS.....	5
LISTA DE FIGURAS	6
INTRODUCCIÓN	10
1.1 FISILOGIA DEL CICLO ESTRAL Y DINAMICA FOLICULAR EN VACAS	13
1.1.1 Dinámica folicular	13
1.1.2 Anestro	15
1.2 HORMONAS EN VACAS LECHERAS	16
1.2.1 Hormonas esteroideas en vacas	18
1.2.2 Perfil Hormonal De Progesterona Y Estrógenos Durante El Ciclo Estral	19
1.2.2.1 Progesterona.	19
1.2.2 Hormonas Tiroideas En Vacas	21
1.2.2.1 Triyodotironina T3.....	22
1.2.2.2 Tiroxina T4.....	23
1.3 NUTRICION.....	24
1.3.1 Balance Energético En Vacas Lecheras.....	25
1.3.2 INSULINA	31
1.3.2.1 Control de la secreción de insulina	32
1.3.2.2 Regulación de la glucemia	33
1.3.3 HORMONAS EXÓGENAS	34
1.3.3.1 Genisteína.....	36
1.3.3.2 Daidzeina.....	36
1.3.3.3 Coumestrol	38
2. HIPÓTESIS	39
3. OBJETIVO GENERAL	40
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4.1 TIPO DE ESTUDIO.....	41
4.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	41
4.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	42
4.3.1 DISTRIBUCIÓN DE LOS ANIMALES EN EL EXPERIMENTO.....	42
4.4 MANEJO DEL MATERIAL VEGETAL DE TRÉBOL ROJO Y ALFALFA.....	43
4.4.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO	43
4.4.1.1 Materia Seca	44
4.4.1.2 Proteína Cruda	44
4.4.1.3 Extracto Etéreo	44

4.4.1.4 Cenizas	44
4.4.1.5 Fibra en Detergente Neutra FDN.....	45
4.4.1.6 Fibra en Detergente Acida FDA.....	45
4.5 ANÁLISIS EN LOS ANIMALES	45
4.5.1 SUPLEMENTACIÓN DE LOS ANIMALES	45
4.5.2 TOMA DE MUESTRAS	47
4.5.2.1 Prueba y procedimiento para determinación de Hormonas Tiroideas (TSH, T3 y T4).....	47
4.5.2.2 Prueba y procedimiento para determinación de Hormonas Esteroideas (LH,E2 y P4)).	48
4.5.2.3 Prueba y procedimiento para determinación de Glucosa, Insulina y BUN	49
4.5.2.4 Prueba y procedimiento para determinación de Triglicéridos.....	50
5. ANALISIS DE DATOS	51
6. RESULTADOS Y DISCUSION	52
6.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LOS MATERIALES DE ESTUDIO	52
6.2 NIVELES DE FITOESTRÓGENOS EN LA DIETA.....	53
6.3 PERFILES DE ESTRADIOL DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN	53
6.4 PERFILES DE HORMONA LUTEINIZANTE (LH) DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN.....	57
6.5 PERFIL DE PROGESTERONA (P4) DURANTE LA SUPLEMENTACION.....	59
6.6 PERFIL DE TRIGLICÉRIDOS DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN.....	61
6.7 PERFIL DE TIROXINA (T4) TOTAL DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN.....	63
6.8 PERFIL DE TRIYODOTIRONINA (T3) TOTAL DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN.....	66
6.10 PERFIL DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES (TSH) DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN	70
6.11 PERFIL DE GLUCOSA DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN.....	71
6.12 PERFILES DE BUN DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN	73
6.13 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN	75
6.13.1 CORRELACIÓN GLUCOSA, BUN, INSULINA.....	75
6.13.2 CORRELACIÓN T3 E INSULINA	78
6.13.3 CORRELACIÓN TSH E INSULINA	79
6.13.4 CORRELACIÓN T3 E INSULINA TIEMPO INICIAL.....	80
6.13.5 CORRELACIÓN T3 Y GLUCOSA TIEMPO INICIAL	81
6.13.6 CORRELACIÓN TSH Y GLUCOSA EN TIEMPO INICIAL	82
6.13.7 CORRELACIÓN TRIGLICÉRIDOS Y GLUCOSA EN TIEMPO FINAL	83
7.CONCLUSIONES	85
ANEXOS.....	96

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Cálculo de las cantidades de suplemento de alfalfa y trébol para cada unidad experimental.....	47
<i>Tabla 2.</i> Composición bromatológica de los forrajes en estudio	52
<i>Tabla 3.</i> Niveles de fitoestrógenos consumidos (promedios y desviación estándar)	53
<i>Tabla 4.</i> Perfiles De Estradiol Durante La Suplementación (promedios y desviación estándar)	55
<i>Tabla 5.</i> Perfiles de hormona luteinizante (LH) durante la suplementación (promedios y desviación estándar).....	57
<i>Tabla 6.</i> Perfiles de progesterona (P4) durante la suplementación (promedios y desviación estándar).....	59
<i>Tabla 7.</i> Perfil de Triglicéridos durante la suplementación (promedios y desviación estándar)	61
<i>Tabla 8.</i> Perfil de Tiroxina (T4) total durante la suplementación (promedios y desviación estándar)	63
<i>Tabla 9.</i> Perfil de Triyodotironina (T3) total durante la suplementación (promedios y desviación estándar).....	66
<i>Tabla 10.</i> Perfil de insulina durante la suplementación (promedios y desviación estándar)	68
<i>Tabla 11.</i> Perfil de la Hormona estimulante de la tiroides (TSH) durante la suplementación (promedios y desviación estándar).....	70
<i>Tabla 12.</i> Perfil de glucosa durante la suplementación (promedios y desviación estándar)	71
<i>Tabla 13.</i> Perfiles de BUN durante la suplementación.....	73

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Niveles de estradiol en el tiempo.....	55
<i>Figura 2.</i> Hormona Luteinizante (LH) en el tiempo	57
<i>Figura 3.</i> Progesterona en el tiempo	60
<i>Figura 4.</i> Triglicéridos en el tiempo	61
<i>Figura 5.</i> Tiroxina en el tiempo.....	64
<i>Figura 6.</i> Triyodotironina T3 en el tiempo	67
<i>Figura 7.</i> Insulina en el tiempo	69
<i>Figura 8.</i> Hormona estimulante de la tiroides TSH en el tiempo	71
<i>Figura 9.</i> Glucosa en el tiempo	72
<i>Figura 10.</i> Nitrógeno Ureico en sangre (BUN) en el tiempo	73
<i>Figura 11.</i> Curva de regresión entre insulina y glucosa para alfalfa en tiempo intermedio.....	77
<i>Figura 12.</i> Relación de Triyodotironina con alfalfa en tiempo inicial	79
<i>Figura 13.</i> Relación de TSH e insulina en alfalfa en tiempo final	80
<i>Figura 14.</i> Relación de T3 e insulina en control en tiempo inicial	81
<i>Figura 15.</i> Relación de T3 y Glucosa en control en tiempo inicial.....	82
<i>Figura 16.</i> Relación de TSH y Glucosa en trébol en tiempo inicial	83
<i>Figura 17.</i> Relación Triglicéridos y glucosa en trébol tiempo final	84

LISTA DE ANEXOS

<i>Anexo 1.</i> Niveles de fitoestrógenos consumidos	96
<i>Anexo 2.</i> Perfiles De Estradiol Durante La Suplementación.....	96
<i>Anexo 3.</i> Perfiles de hormona luteinizante (LH) durante la suplementación	97
<i>Anexo 4.</i> Perfil de Triglicéridos durante la suplementación.....	97
<i>Anexo 5.</i> Perfil de Tiroxina (T4) total durante la suplementación.....	97
<i>Anexo 6.</i> Perfil de insulina durante la suplementación.....	98
<i>Anexo 7.</i> Perfil de Triyodotironina (T3) total durante la suplementación.....	98
<i>Anexo 8.</i> Perfil de la Hormona estimulante de la tiroides (TSH) durante la suplementación.....	98
<i>Anexo 9.</i> Perfil de glucosa durante la suplementación.....	99
<i>Anexo 10.</i> Perfiles de BUN durante la suplementación.....	99
<i>Anexo 11.</i> ANOVA Table for Estradiol by Tratamiento.....	99
<i>Anexo 12.</i> ANOVA Table for Progesterona by Tratamiento	100
<i>Anexo 13.</i> ANOVA Table for LH by Tratamiento.....	100
<i>Anexo 14.</i> ANOVA Table for Trigliceridos by Tratamiento.....	100
<i>Anexo 15.</i> ANOVA Table for T4 by Tratamiento	100
<i>Anexo 16.</i> ANOVA Table for T3 by Tratamiento	101
<i>Anexo 17.</i> ANOVA Table for Insulina by Tratamiento	101
<i>Anexo 18.</i> ANOVA Table for TSH by Tratamiento.....	101
<i>Anexo 19.</i> ANOVA Table for Glucosa by Tratamiento	101
<i>Anexo 20.</i> ANOVA Table for BUN by Tratamiento.....	102
<i>Anexo 21.</i> Analysis of Variance Glucosa . insulina alfalfa intermedio	102
<i>Anexo 22.</i> Analysis of Variance. T3 y la insulina tiempo inicial	102
<i>Anexo 23.</i> Analysis of Variance. THS y la insulina tiempo inicial.....	102
<i>Anexo 24.</i> Analysis of Variance. T3 y la insulina en tiempo inicial.....	103
<i>Anexo 25.</i> Analysis of Variance. T3 y glucosa	103
<i>Anexo 26.</i> Analysis of Variance. THS glucosa Trebol rojo tiempo inicial	103
<i>Anexo 27.</i> Analysis of Variance. Trigliceridos y glucosa con trébol rojo en tiempo final	103

RESUMEN

La eficiencia reproductiva es parte fundamental en una producción lechera, y depende de muchos factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Uno de estos factores es la alimentación que consumen las vacas, la cual en muchas ocasiones contiene metabolitos secundarios que causan diversos efectos en el animal. Particularmente, los fitoestrógenos encontrados en algunos forrajes, presentan actividad estrogénica que puede inducir alteraciones en el sistema endocrino de los animales que los consumen. Por esta razón, en este estudio se buscó determinar los efectos de los fitoestrógenos presentes en la alfalfa (*Medicago sativa L*) y el trébol rojo (*Trifolium pratense*) sobre el perfil de algunas hormonas que intervienen en la regulación endocrina del crecimiento folicular en vacas Holsteín. El ensayo se llevó a cabo en la Granja Tunguavita de la UPTC, Paipa; se utilizaron 15 vacas Holsteín divididas en 3 grupos de 5 semovientes en condiciones similares aplicando un diseño completamente al azar, suministrando los siguientes tratamientos: T1: Harina de trébol rojo; T2: Harina de Alfalfa y T3: Control, sin suministro de ninguno de los ingredientes, se realizó un ANOVA y las diferencias estadísticas se analizaron mediante comparación de medias de Duncan, junto con un análisis de correlación entre cada una de las variables estudiadas. Se determinaron los contenidos de Fitoestrógenos en estos alimentos y luego se hicieron mediciones de las variables estradiol (E2), progesterona (P4) hormona luteinizante (LH), Triglicéridos, triyodotironina (T3), Tiroxina (T4), Insulina, hormona estimulante de la tiroides (TSH), glucosa y nitrógeno ureico en sangre (BUN), por un periodo de 60 días en vacas en el primer tercio de lactancia. Se tomaron muestras de sangre por venopunción coccígea antes de la suplementación, a los 30 días y al día 60, para la determinación de E2, LH y P4 se utilizó inmunoensayo enzimático, para T3 y T4 inmunoensayo competitivo, TSH inmunoensayo tipo sándwich, glucosa método spinreact utilizando eglucosa oxidasa-peroxidasa, insulina ELISA

de monobind ensayo monoenzimometrico, nitrógeno ureico en sangre (BUN) por reacción de Take y Schubert y triglicéridos por calorimetría enzimática.

Bajo la suplementación con trébol rojo se observó un aumento en los niveles de estradiol de $2,36 \pm 0,56$ pg/ml a $2,48 \pm 0,44$ pg/ml, LH de $2,67 \pm 0,57$ UI/ml a $3,7 \pm 0,57$ UI/ml, T4 de $88,8 \pm 24,63$ mmol/L a $97,8 \pm 4,79$ mmol/L, BUN de $17,4 \pm 2,7$ mg/dl hasta $25,4 \pm 2,8$ mg/ml, triglicéridos de $0,25 \pm 0,04$ mmol/L a $0,32 \pm 0,04$ mmol/L e insulina de $24,26 \pm 2,42$ UI/ml hasta $26,47 \pm 0,94$ UI/ml; los niveles de T3 mostro un comportamiento similar durante todo el experimento con valores promedio de $1,3 \pm 0,22$ mmol/l en tanto que para la TSH se observó una disminución de $2,76 \pm 0,23$ ng/ml a $2,5 \pm 0,77$ ng/ml al igual que P4 con valores de $1,768 \pm 0,04$ ng/ml a $0,988 \pm 0,3$ ng/ml.

Con respecto a la suplementación con alfalfa se presentó un aumento en los niveles de estradiol de $1,89 \pm 0,54$ pg/ml a $2,32 \pm 0,29$ pg/ml, LH de $3,47 \pm 1,07$ UI/ml hasta $3,94 \pm 0,67$ UI/ml, BUN de $20,6 \pm 3,2$ mg/ml hasta $25,8 \pm 1,3$ mg/dl y triglicéridos de $0,18 \pm 0,02$ mmol/L a $0,22 \pm 0,018$ mmol/L; por otro lado se observó una disminución de T4 con valores de $88,8 \pm 4,65$ mmol/l hasta $85,4 \pm 13,4$ mmol/l, T3 de $1,3 \pm 0,25$ mmol/L hasta $1,06 \pm 0,16$ mmol/L, TSH de $2,16 \pm 0,25$ ng/ml a $1,92 \pm 0,25$ ng/ml e insulina de $26,05 \pm 0,94$ UI/ml a $21,93 \pm 1,70$ UI/ml, en cuanto a P4 esta se mantuvo en rangos cercanos a $1,422 \pm 0,37$ ng/ml y $1,586 \pm 0,27$ ng/ml.

Acorde a esto, se pudo determinar que el contenido de fitoestrógenos en alfalfa y trébol influye negativamente en el comportamiento reproductivo bovino, debido a que están constituidas por moléculas que simulan la actividad estrogenica lo que conlleva a desórdenes fisiológicos clínicos o subclínicos.

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de leche estimada en el año 2008 alcanzó la cifra de 684 millones de toneladas, con un crecimiento anual del 2%, y una disponibilidad promedio de 85 kg/habitantes/año (Ponce, 2009). Los países desarrollados con sólo el 26 % de la población y el 32 % de los bovinos producen más del 75 % del volumen total y registran un consumo per cápita por encima de 250 kilogramos, a diferencia de los países subdesarrollados o en desarrollo, que apenas rebasan los 50 kilogramos. En la práctica, la mayor parte de los países en desarrollo son dependientes del mercado interno y/o no cubren los requerimientos de consumos establecidos por la FAO.

La dinámica en la producción primaria se da gracias a las innovaciones en los sistemas de alimentación y manejo del ganado, mejoramiento genético de los hatos, principalmente por compras y renovación de especies altamente productivas (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Federación Colombiana de Ganaderos, 2011) Por tanto, se sugiere que los ganaderos deben trabajar en estrecha colaboración con el profesional encargado del hato para desarrollar estrategias de manejo adecuados y analizar las intervenciones más convenientes cuando sea necesario, así como, hacer registros diarios individuales productivos y reproductivos (Llueu, 2008).

La eficiencia reproductiva constituye un conjunto de medidas, expresadas en parámetros reproductivos de beneficio rentable, mientras que la ineficiencia reproductiva comprende uno de los problemas más costosos que enfrenta la ganadería lechera (Gallegos de la Hoya, 2010). La baja fertilidad se adjudicaba sólo a las vacas repetidoras con más de tres servicios infértiles, sin embargo, actualmente se sabe que este problema es crítico desde el primer servicio, en el cual con frecuencia el porcentaje de concepción no supera el 30% (Morales, Hernandez, Rodriguez, & Peña, 2000).

Lo anterior denota que la reproducción en uno de los aspectos más importantes en un sistema de producción de leche, por lo que usualmente se lleva a cabo de manera asistida, buscando asegurar una adecuada producción de embriones para transferencia en hembras y una excelente calidad seminal en machos (Montes *et al.*, 2009). Muchas de las veces las causas de los problemas reproductivos son difíciles de detectar, sin embargo una posibilidad es que no se trate realmente de un problema asociado al manejo reproductivo u orgánico, sino que sea sólo el reflejo de la presencia de compuestos que simulan el efecto de las hormonas esteroides y que involuntariamente son administradas al ganado en el alimento, como es el caso de los fitoestrógenos, que son productos de origen vegetal con actividad natural bactericida y fungicida de patógenos vegetales (Pike, Brzozowski, Hubbard, & Bonn, 1999). Estos compuestos presentan una actividad similar a los estrógenos, a pesar de que la estructura química es bastante diferente. Existen tres grupos de estos compuestos: las isoflavonas, los coumestanos, y los lignanos, cuyos principales representantes son la genisteína (GEN), el coumestrol (COU) y la enterolactona, respectivamente (Whitten & Patisaul, 2001); (Whitten, Patisau, & Young, 2002)).

Tras esta reseña, la importancia de los fitoestrogenos radica principalmente en que pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos, ya que ejercen sus efectos tanto en el macho como en la hembra en tejidos donde existen receptores para estrógenos (RE) (Whitten & Patisaul, 2001). Los estrógenos favorecen la diferenciación celular y el crecimiento de las glándulas mamarias, el útero, la vagina, los ovarios, los testículos, el epidídimo, la próstata, el sistema vascular (Dubey, 2000) y el sistema nervioso (McGarvey & Cates., 2001), además de controlar un gran número de funciones corporales, por lo cual las moléculas que simulen estos efectos pueden conllevar a desórdenes fisiológicos clínicos o subclínicos.

El presente trabajo se realizó con el fin de determinar el efecto que puedan tener los fitoestrógenos tipo daidzeina y genisteína sobre los niveles séricos de algunas sustancia

como son: Estradiol (E2), Hormona Luteinizante (LH), Triglicéridos, Triyodotironina (T3), Tiroxina (T4), Insulina, Hormona Estimulante de la tiroides (TSH), Glucosa, Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN) como responsables de los procesos reproductivos en vacas productoras de leche.

1. REVISION DE LITERATURA

1.1 FISIOLOGIA DEL CICLO ESTRAL Y DINAMICA FOLICULAR EN VACAS

El ciclo estral está determinado por una serie de eventos fisiológicos que suceden en el periodo de tiempo comprendido entre un celo y otro. En las vacas el ciclo estral tiene una duración promedio de 21 días y puede ser más corto o más largo dependiendo del número de ondas foliculares que se presenten en el ovario del animal.

1.1.1 Dinámica folicular

La dinámica folicular constituye un proceso de continuo crecimiento y regresión folicular, que conduce finalmente al desarrollo del folículo ovárico de cada periodo interestrual. Este proceso dinámico, equilibrado y sincrónico, depende de un complejo sistema de relaciones inter e intraovaricas y de adecuada función hormonal (Perea, y otros, 1998).

Además se constituye como un proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio. Entre 1 y 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular ocurren durante un ciclo estral bovino, y el folículo preovulatorio deriva de la última. Para describir la dinámica folicular bovina es necesario definir conceptos de reclutamiento, selección y dominancia. (Anzola Vasquez, 2004)

- *Reclutamiento:* es el proceso por el cual una cohorte de folículos comienza a madurar en un medio con un aporte adecuado de gonadotrofinas que le permiten avanzar hacia la ovulación. (Anzola Vasquez, 2004)
- *Selección:* Es el proceso por el cual un folículo es elegido y evita la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación. (Anzola Vasquez, 2004)

➤ *Dominancia:* Es el proceso por el cual el folículo seleccionado domina ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos. Este folículo alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás, es responsable de la mayor secreción de estradiol y adquiere la capacidad de continuar su desarrollo en un medio hormonal adverso para el resto de los folículos. (Anzola Vasquez, 2004)

La causa por la cual se produce la regresión del folículo dominante de las primeras ondas (1 de 2 ondas y 2 de 3 ondas) sería la presencia de una baja frecuencia de los pulsos de LH debido a los altos niveles de progesterona, que provocarían una menor síntesis de andrógenos y en consecuencia una menor síntesis de estradiol que iniciarían la atresia folicular.

La selección del folículo dominante ocurre al final de la fase común de crecimiento. El folículo dominante continúa creciendo a una tasa constante y el resto de los folículos sufren atresia. La desviación folicular es un concepto relativamente nuevo y se refiere al inicio de una diferencia notoria en la tasa de crecimiento entre los dos folículos más grandes presentes en el ovario de hembras monotocas. Los mecanismos fisiológicos implicados en el proceso de desviación y selección no se han definido completamente, pero al parecer se relacionan con la adquisición de receptores para la hormona luteinizante en la granulosa del folículo dominante, un incremento en la producción de estradiol por este último y la disminución de las concentraciones de la hormona folículo-estimulante. Se encuentra implicado también el sistema a través de factores de crecimiento insulínicos (IGF-1 y -2), proteínas de unión (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 y -6) y proteasas específicas que degradan las IGFBPs. Se describen las relaciones endócrinas, parácrinas y autócrinas del crecimiento folicular, con énfasis en los factores fisiológicos señalados y que están envueltos en el proceso de desviación y selección (Espinoza, Perez, Espinosa, Mendez, & Flores, 2007).

1.1.2 Anestro

En las vacas en anestro, la LH se libera en una forma irregular y no se observa la onda en incremento como la actividad que conlleva a concentraciones altas de LH. En consecuencia, el desarrollo y ovulación de un folículo dominante no sucede, por tal razón el celo no se va a presentar solo hasta que las condiciones hormonales y las olas de GnRH y LH lo permitan.

➤ Tipos de anestro:

-Anestro Tipo I. Con folículos emergentes entre ~ 4 y 9mm de diámetro en fase de emergencia o reclutamiento, lo que corresponde al estado de ovarios inactivos o estáticos, conocida como atrofia ovárica (González-Stagnaro et al., 1999). Su presentación se asocia a subnutrición.

- Anestro Tipo II. Desviación folicular, con folículos alrededor de ~9mm de diámetro, que se corresponden a las estructuras foliculares entre ~10 y 15mm, consideradas un importante indicador de actividad ovárica (Bastidas et al., 1984; Domínguez et al., 2007; Díaz, 2008). Su presentación se asocia a alteraciones de las relaciones endocrinas de retroalimentación negativa estrógenos-GnRH/LH y se atribuye a efectos del amamantamiento.

-Anestro Tipo III. Muestra folículo dominante con diámetro entre 10 y 20 mm que se corresponde con estructuras foliculares entre 15mm y 25mm. Su presentación se asocia con alteraciones de la sensibilidad del hipotálamo en los pulsos GnRH/LH, que impiden la ovulación y se atribuyen a efectos de la alta producción lechera.

-Anestro Tipo IV. Con actividad lútea prolongada o persistente, correspondiendo con las estructuras foliculares quísticas ($F > 25\text{mm}$), sin mostrar ninfomanía, atribuible a alteraciones de la ovulación y, ovarios con CL sin reporte de celo previo. Calificado como anestro

funcional (Soto-Belloso y Portillo, 1992), se atribuye a los llamados celos u ovulaciones silentes, subestro y/o defectos de la detección de celos.

➤ Clases De Anestro

-Anestro verdadero. El anestro verdadero se presenta cuando la hembra post puberal no demuestra las clásicas características de celo como son: a) síntomas externos corporales, b) síntomas a nivel de mucosas, c) síntomas a nivel de ovarios estando vacía, pero no recién parida. (Schroeder, 2007)

-Anestro falso. También denominado celo silente, silencioso, débil, se caracteriza por que los síntomas externos del celo son muy débiles o en ocasiones no son observables, pero se mantienen los síntomas de celo a nivel de ovarios y mucosas.

1.2 HORMONAS EN VACAS LECHERAS

Hormona, se define como una sustancia que poseen los animales y los vegetales, que regula procesos corporales tales como el crecimiento, el metabolismo, la reproducción y el funcionamiento de distintos órganos. En los animales, las hormonas son secretadas por glándulas endocrinas, carentes de conductos, directamente al torrente sanguíneo. Se mantiene un estado de equilibrio dinámico entre las diferentes hormonas que producen sus efectos encontrándose a concentraciones muy pequeñas. Su distribución por el torrente sanguíneo da lugar a una respuesta que, aunque es más lenta que una reacción nerviosa, suele mantenerse durante un periodo más prolongado (Heitzmann, 1986).

Los procesos reproductivos de los mamíferos son regulados por una compleja y solo parcialmente conocida, cascada de actividades combinadas del sistema nervioso central (SNC), cierto número de tejidos secretores, tejidos diana u órgano blanco y diversas hormonas. El SNC recibe información del medio ambiente y del propio animal (señales externas: visuales, auditivas, olfativas, auditivas y táctiles) y la transmite, en la medida que es importante para la reproducción, a las gónadas a través del eje hipotálamo- hipófisis-gónada (Hafez, 2003). El hipotálamo y la hipófisis son estructuras que están estrechamente unidas a la parte ventral del cerebro. Ambas estructuras no se comportan solamente como productoras de hormonas, sino también como órganos blanco que crean un sistema de retroalimentación homeostático.

La mayoría de las hormonas regulan su propia tasa de secreción mediante un mecanismo de retroalimentación. En el hipotálamo, las neuronas endocrinas producen, como consecuencia de estímulos del SNC y del control hormonal interno, la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Clarke & Henry, 1999). Esta hormona es transportada a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario al lóbulo anterior de la hipófisis, donde estimula la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) por las células gonadotrópicas de la hipófisis (Vizcarra, Wettemann, Braden, Turzillo, & Nett, 1997). La FSH estimula el desarrollo de los folículos ováricos y la LH estimula la síntesis de androstenediona a partir del colesterol (Orisaka, Tajima, & Kotsuji, 2009). La androstenediona se convierte en testosterona, que se aromatiza en las células de la granulosa del folículo, bajo la influencia de la FSH a 17-estradiol (Roberts & Skinner, 1990).

El estradiol o estrógeno ejerce un efecto de retroalimentación positivo sobre el hipotálamo y la hipófisis aumentando la frecuencia de los pulsos de GnRH. Por encima de un cierto nivel umbral de estrógeno, el hipotálamo responde con una descarga de GnRH, la cual induce una liberación de LH que inicia la ovulación (Garverick & Smith, 1993). El otro efecto principal

del estrógeno es la inducción de síntomas de celo. El celo representa los síntomas físicos y de comportamiento que indican al macho que la hembra está en su fase fértil y de aceptación de la monta (Garverick & Smith, 1993).

1.2.1 Hormonas esteroideas en vacas

Las hormonas esteroideas son una familia de sustancias generadas básicamente en el sistema nervioso central, la corteza suprarrenal, el hígado, e incluso la piel de diversas especies animales. Estas hormonas están divididas en los siguientes grupos: Glucocorticoides, Mineralocorticoides y Esteroides sexuales, dentro de este último encontramos los andrógenos, estrógenos y progestágenos. Estas últimas son de relevancia en la reproducción animal, ya que forman parte fundamental de los procesos reproductivos de machos y hembras (Sanchez, y otros, 2011).

Los estrógenos son producidos en el ovario y se encuentran la 17-β-Estradiol, la estrona y el estradiol. Las principales funciones de los estrógenos son: desarrollo de características sexuales, estimulación de las manifestaciones de celo, estimulación del desarrollo de los conductos mamarios, estimulación del desarrollo de glándulas endometriales y anabolismo (Hafez, 2003). Tienen acciones sobre los distintos órganos blanco como son las trompas de Falopio, el útero, la vagina, la vulva y el sistema nervioso central, en el cual estimulan la conducta de celo y el hipotálamo donde ejercen un "feed back" negativo sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico (Browning, Robert, Lewis, Neuendorff, & RD., 1994).

Los progestágenos, particularmente la progesterona (P4) se producen en el cuerpo lúteo en la placenta y en el testículo. Sus funciones principales son: Disminución de contracciones

uterinas, manutención de la gestación, precursora de la síntesis de andrógenos, estimulación del instinto materno, preparación del útero para la implantación, estimulación de la secreción del útero fomentando la nutrición del embrión, sincronización de celo y aumenta lobulillos y alveolos de las ubres para prepararlos para la secreción de la leche (Hafez, 2003); (Schuster & Piacenza, 2008). Y a nivel hipotalámico ejerce un efecto feed back negativo sobre el centro tónico (Browning, Robert, Lewis, Neuendorff, & RD., 1994) .

1.2.2 Perfil Hormonal De Progesterona Y Estrógenos Durante El Ciclo Estral

1.2.2.1 Progesterona.

Para el análisis de la concentración de progesterona se ha usado leche descremada y suero sanguíneo de vacas, empleando kits de Radioinmunoanálisis (RIA de P4). Se ha establecido un límite mínimo de 0.5 y 1.0 ng/ml de P4 para identificar un cuerpo lúteo funcional en vacas y novillas, respectivamente (Perea, y otros, 1998).

Numerosas referencias indican que durante el periodo postparto los niveles de P4 se mantienen bajos ($1,0 \pm 0,3$ ng/ml), y se elevan ligeramente antes del celo por un breve lapso de tiempo. Este incremento en los niveles de P4 parece ser causado por folículos luteinizados y ser necesario para determinar una fase luteal normal al reinicio del primer ciclo estral ((Henao, Trujillo, Vasquez, & Rua, 2002); (Ruiz, y otros, 2010)). Así mismo, se reporta que las vacas que exhiben elevación transitoria de P4 experimentan ciclos estrales normales. Se han detectado niveles de P4 superiores a 0.5 ng/ml desde el día 7 al 17 y la máxima concentración de 1.1 ng/ml el día 15, y se ha determinado el promedio de P4 durante el diestro en 0.89 ng/ml (Perea, y otros, 1998). Otros estudios en vacas mestizas han reportado promedios muy superiores, con un pico de 8.3 ng/ml el día 13 del ciclo estral norma y una

concentración durante el diestro de 4.1 ng/ml ((Goicochea, Palomares, Ondis, Sandoval, Gonzalez, & Soto, 2005); (Ruiz, y otros, 2010)).

Consecuentemente, en la vaca gestante, la concentración de progesterona en sangre o leche se mantiene alta alrededor de los días 21 y 24 después de la ovulación y esta será basal en un animal no gestante. Por ello, se podría tomar muestras en este tiempo para usarla como diagnóstico de gestación (Folman, Rosenberg, Ascarelli, Kaim, & Herz, 1983).

Aproximadamente el 80-85% de los diagnósticos positivos entre los días 21 y 24 son exactos, es decir, el resultado final es el nacimiento de una cría. Un 15-20% de las vacas con niveles altos de progesterona no presentan una parición posterior, es decir, se convierten en falsos positivos. Por otro lado, el hallazgo de niveles bajos de progesterona entre los días 21 y 24 indica la ausencia de gestación en el 100% de los casos. Es decir, la prueba de progesterona utilizando el kit de RIA FAO/IAEA (Plaizier, 1993), el cual está basado en una técnica de RIA de fase sólida que emplea 125I-progesterona como marcador, es considerada una prueba altamente exacta para el diagnóstico de ausencia de gestación permitiendo un nuevo servicio en forma temprana (Matamoros, Gomez, & Andaur, 2002).

1.2.2.2 Estrógenos

La identificación de compuestos producidos por la placenta o el feto, y no por la madre, presenta ventajas en el diagnóstico de gestación y como indicador de la viabilidad fetal en animales domésticos. La estrona es producida por el embrión bovino (Matamoros, Gomez, & Andaur, 2002), y las concentraciones de Sulfato de estrona (E1S) aumentan en plasma maternal desde aproximadamente el día 70 de gestación (Peters & Ball, 1995).

Estudios analizaron los niveles de 17 b-estradiol, durante un ciclo estral normal completo, previamente determinado por los niveles de progesterona. Los resultados mostraron la

existencia del patrón de ondas foliculares, evidenciando ondas de crecimiento folicular previas a la ovulación, mas no muy claramente el incremento de estradiol de la fase folicular. 42.8% de las vacas presentaron 2 ondas foliculares previas a la ovulatoria; 42.8% 3 ondas previas a la onda ovulatoria, y 14.3% 1 onda previa a la onda ovulatoria. Apenas el 30.7% de las fases foliculares mostraron incremento en los niveles de estradiol. La duración del ciclo estral estuvo positivamente correlacionada con el número de ondas foliculares, conforme a lo descrito ((Rhodes, McDougall, Burke, Verkerk, & Macmillan, 2003); (Martinez, Aguirre, Martinez, & Torres, 2006)).De manera similar a lo reportado (Lopez, Satter, & Wiltbank, 2004) las concentraciones de E₂ en el día del estro estuvieron correlacionadas con la duración y la intensidad del estro (Baez, Grajales, & Perez, 2007)

1.2.2 Hormonas Tiroideas En Vacas

Las hormonas que secreta la glándula Tiroides son Tiroxina (T4), Triyodotironina (T3), y la Calcitonina. T3 y T4 se unen en la sangre a pre albúminas, albúminas y especialmente a la globulina transportadora de tiroxina, siendo liberadas al alcanzar las células tisulares. No todos los tejidos responden con igual intensidad a los estímulos tiroideos, esta variación está relacionada al número de receptores presentes en el DNA celular.

Un elemento mineral de importancia manifiesta en los procesos reproductivos y en el aumento de las tasas de concepción es el Yodo, pues una deficiencia de este mineral influye en gran porcentaje sobre el comportamiento sexual produciendo supresión o depresión de los niveles de estrógenos, provocando una disminución en las tasa de concepción por ausencia o presentación silente de celos, por tal razón del adecuado balance de este mineral tanto en el forraje como en los suplementos minerales depende en gran parte la mejoría en las tasas de concepción. El Yodo (Akar & Yildiz, 2005)se absorbe efectivamente en la circulación

sanguínea desde la cual pasa a la glándula tiroides o se elimina a través de la orina. La tiroides contiene gran cantidad de yodo en forma de tiroglobulina y a partir de las tironinas puede sintetizar la triyodotironina (T3) y la tiroxina (T4), las cuales participan en diversos procesos y cumplen bastantes funciones en el organismo, dentro de las cuales una de las más importantes es la intervención en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, además favorecen la calorigénesis y en la regulación del consumo de oxígeno por parte de las células, por esta razón procesos metabólicos en los cuales haya alto intercambio de oxígeno y alto compromiso de receptores neuronales requieren elevados niveles circulantes de las hormonas tiroideas.

La producción de T3 y la de su prohormona tiroxina (T4) es activada por la tirotropina (TRH), la cual es secretada por la glándula pituitaria. Esta vía se regula a través de un proceso de retroalimentación de bucle cerrado: las concentraciones elevadas de T3 y T4 en el plasma sanguíneo inhiben la producción de TSH en la pituitaria. Cuando las concentraciones de dichas hormonas disminuyen, la pituitaria incrementa la producción de TSH, y por estos procesos, se crea un sistema de control de retroalimentación negativa para regular la cantidad de hormonas tiroideas que hay en el torrente sanguíneo. Los efectos de la T3 en los tejidos son alrededor de cuatro veces más potente que la de su prohormona T4 (Vigia, 2008).

1.2.2.1 Triyodotironina T3

La triyodotironina, también conocida como T3, es una hormona tiroidea. Afecta a casi todos los procesos fisiológicos en el cuerpo, incluyendo crecimiento y desarrollo, metabolismo, temperatura corporal y ritmo cardíaco.² Su función es estimular el metabolismo de los

hidratos de carbono y grasas, activando el consumo de oxígeno, así como la degradación de proteínas dentro de las células.

Entre los efectos de T3, podemos encontrar que incrementa el metabolismo basal y, así, incrementa el uso de oxígeno y energía por el cuerpo. T3 actúa en la mayoría de los tejidos dentro del cuerpo, con algunas excepciones incluyendo el bazo y los testículos, estimula la producción de ARN Polimerasa I y II, así incrementando la tasa de síntesis proteica, al igual también incrementa la tasa de degradación proteica, y, en exceso, la tasa de degradación proteica sobrepasaría la síntesis proteica, además potencia los efectos de los receptores adrenérgicos en el metabolismo de la glucosa, por lo tanto, incrementa la tasa de desglose del glucógeno y la gluconeogénesis, al igual también potencia el efecto de la insulina, así como favorece el desglose del colesterol e incrementa el número de receptores LDL, así incrementando la tasa de lipólisis (Bowen, 2010).

1.2.2.2 Tiroxina T4

T4 se une a ellos de diez a veinte veces menos que T3, por ello a nivel celular la hormona tiroidea propiamente es la T3 (Contreras, Wittwer, & Ruiz, 1999). Las funciones de T4 son aumentar el metabolismo celular, el número de mitocondrias y la síntesis de ATP. En relación al metabolismo energético T3 y T4 promueven la absorción de glucosa, la glicólisis, la gluconeogénesis, la secreción de insulina y la lipólisis. Además estimulan y regulan la cantidad de receptores b-adrenérgicos (Contreras, Wittwer, & Ruiz, 1999).

En bovinos, se presenta dificultad analítica para medir T3, razón por la cual las concentraciones sanguíneas de T4 se han utilizado para evaluar la actividad tiroidea.

En humanos, bovinos y otras especies, durante el último tercio de la gestación, las hormonas tiroideas presentan concentraciones mayores a los valores habituales. Se ha señalado que las

hormonas tiroideas son galactopoyeticas, por ello diversos autores indican que al inicio de la lactancia en vacas, las concentraciones plasmáticas de T4 están disminuidas. También el balance energético negativo y la hipomagnesemia se asocian a disminución de las concentraciones de T4 y T3 (Contreras, Wittwer, & Ruiz, 1999). El rango de referencia de los niveles de hormonas tiroideas está estimado en 0.80 ó 1.90 nmol/l de T3 y 57-119 nmol/ de T4 (Matamoros, R; Contreras, P; Wittwer, F, Mayorga, M, 2003)

1.3 NUTRICION

La nutrición es uno de los aspectos más importantes a controlar en el ganado lechero, pues la gran demanda productiva a la que se somete a los animales hace que las raciones deban estar adecuadamente formuladas para evitar desequilibrios que podrían repercutir sobre la reproducción. En este sentido, se conoce que durante el periodo de transición, que abarca las 3-4 semanas posteriores al parto, la vaca modifica bruscamente su nivel productivo como consecuencia del inicio de la lactación y liberación de calostro, con lo cual sus mecanismos homeostáticos pueden verse afectados y producirse desequilibrios en los constituyentes bioquímicos sanguíneos (Van Saun, 1999) lo que podría alterar la función reproductiva. Sin embargo, son pocos los estudios que abordan la influencia de los componentes plasmáticos durante la fase temprana de gestación, periodo el que se produce el reconocimiento materno de la misma y en el que están involucrados numerosos factores hormonales, proteicos y, posiblemente, ciertos componentes metabólicos y bioquímicos presentes en la sangre (Rivas, Suarez, & Ramirez, 2011).

Las vacas altamente productoras, con dietas formuladas de un 17 a 19% de proteínas, presentan una disminución de la fertilidad. Lo que ha motivado a demostrar que las vacas alimentadas con estas raciones, tienen altas concentraciones de urea y amoniacó en sangre y

en los fluidos uterinos, lo cual afecta la viabilidad del óvulo y embrión (Butler, Pelton, & y Butler, 2004).

Alrededor del 90% de los ovocitos son fertilizados después de la monta o inseminación=sin embargo, una alta proporción de estas gestaciones se pierden (Hernandez, Zarco, & Lima, 1993) . La muerte de embriones antes del reconocimiento materno de la gestación (días 16 a 19) es considerada como muerte embrionaria temprana. La que ocurre entre el reconocimiento materno de la gestación y el momento en que se ha completado la organogénesis (alrededor del día 42), se denomina muerte embrionaria tardía, y la pérdida de la gestación posterior al día 42 se llama muerte fetal (Hernandez, Zarco, & Lima, 1993).

La muerte embrionaria temprana expresa pérdidas de gestaciones de 40 a 60%, la tardía de 10 a 15% y la muerte fetal con 5 a 15% (Hernandez, Zarco, & Lima, 1993). Las causas de la muerte embrionaria son diversas y están relacionadas con la alta producción láctea, intervalo de parto a la primera ovulación, balance energético negativo, problemas del puerperio, momento de la inseminación, técnica de inseminación, características de la dieta, estrés calórico, infecciones uterinas y factores genéticos (Lopez, Satter, & Wiltbank, 2004).

Se menciona que la tasa de concepción a los 28 - 32 días post inseminación artificial (IA) en vacas lecheras en lactancia varía del 40 al 47%, mientras que la tasa de concepción en vaquillas lecheras llegan a casi 75% (Rivas, Suarez, & Ramirez, 2011), de la misma manera, la pérdida de preñez en vacas lecheras en lactancia es mayor (20 %) que en vaquillas de explotaciones lecheras (5%) (Butler, Pelton, & y Butler, 2004)

1.3.1 Balance Energético En Vacas Lecheras

Todas las vacas sin excepción entran en un balance energético negativo de nutrientes durante el periodo posparto. Sin embargo, algunas llegan a fallar en este proceso, lo cual puede ser

debido a un bajo consumo de nutrientes provocados por problemas de salud, periodos secos prolongados o por complicaciones durante el parto.

Esto significa que la energía utilizada para su mantenimiento y producción de leche son mayores que la energía consumida, lo que obliga a utilizar sus propias reservas corporales, pudiendo llegar a su punto más bajo de balance energético negativo entre los días 10 y 20 posparto, y seguir así aproximadamente hasta el día 70 a 80 y en algunos casos (vacas de primer parto) hasta el día 100 posparto, (Ruiz, y otros, 2010).

Esta condición afecta algunos procesos reproductivos asociados con un retraso en la primera ovulación posparto y con una disminución de las concentraciones séricas de progesterona en el segundo y tercer ciclo posparto, lo que potencialmente puede afectar el desarrollo folicular, el potencial de los ovocitos y la supervivencia embrionaria como secuela de la pérdida de condición corporal de más de 1 punto (escala 1 a 5) durante las primeras cuatro semanas posparto. (Lluen, 2008). De otra parte, la glucosa es el principal sustrato energético para los animales, de manera que niveles bajos en sangre podrían indicar déficit en el balance energético del animal, y redundar en una disminución de los porcentajes de fertilidad.

Esta relación fue expuesta por (Butler, Pelton, & y Butler, 2004), quienes indicaron que cuando las vacas eran alimentadas con sólo una de sus necesidades energéticas durante las primeras 8 semanas después del parto se producía un retraso en la actividad ovárica, observando una correlación negativa entre los niveles de glucosa en plasma y el intervalo parto-ovulación. En los procesos metabólicos de degradación de los carbohidratos, el cobre y el magnesio participan en una gran cantidad de reacciones metabólicas y su déficit puede provocar anemia, la cual se relaciona con depresión de la función ovárica y retraso en la fertilidad después del parto o supresión de la respuesta inmune (Rivas, Suarez, & Ramirez, 2011); se ha observado mejoría y/o corrección de los problemas de fertilidad en el rebaño después de suplementar las dietas con cobre y magnesio, y se sugiere que la edad y la

producción de leche pueden alterar las concentraciones minerales requeridas en la dieta; por otro lado, (Sanchez J. , 2000) proponen que las infecciones uterinas postparto (relacionadas con celos repetidos) podrían producirse como resultado de una deficiencia en magnesio.

Se ha descrito que los niveles bajos de zinc presentes en vacas repetidoras pueden ocasionar un descenso de la progesterona eficaz (que se elimina por orina) y un incremento de la progesterona no eficaz (obtenida al restar progesterona eficaz de progesterona plasmática) ya que participa en su transporte por el torrente sanguíneo (Baez, Grajales, & Perez, 2007). Además, por otro lado, puede provocar un incremento de la insulina sérica al promover su cristalización y almacenamiento en los islotes de Langerhans, originando hipoglucemia y subsecuentes desórdenes metabólicos del tipo de muerte embrionaria y repetición de celos. Problemas renales pueden verse unidos a deficiencias de zinc en plasma, con las repercusiones reproductivas que se han descrito (Sanchez J. , 2000).

La disminución de la secreción de GnRH durante estadios de balance energético negativos está, en parte, inducida por la leptina. La leptina es una hormona secretada por el tejido adiposo que regula numerosas funciones metabólicas, entre las que destacan la ingestión y la reproducción. Una de las funciones de la leptina es mantener un adecuado balance energético, y por ello si su secreción aumenta (debido a un exceso de energía o excesivo contenido graso en el animal) la leptina disminuye la ingestión mediante la inhibición de la secreción de neuropéptido Y (potente estimulador de la ingestión) por parte del hipotálamo (Friedman & Halaas, 1998). La leptina participa en la regulación de la reproducción mediante la modulación de la cantidad de los aportes energéticos presentes en las reservas corporales que se dirigen hacia las funciones reproductivas (Hoggard & Hunter, 1997) y a través de la estimulación de la secreción de GnRH a nivel hipotalámico. En rumiantes, la secreción de leptina está correlacionada con los niveles de IGF-I (Houseknecht et al., 1998), siendo esta

hormona uno de los indicadores más claros del balance energético del animal. Al ser una hormona secretada por el tejido adiposo, la concentración de leptina en sangre es mayor cuanto mayor sea la proporción de grasa corporal, tanto en vacas; como en ovejas (Kumar & Francis, 1998). En un reciente estudio, se demostró que cuando el contenido de grasa corporal del vacuno desciende por debajo del 12,1% la actividad reproductiva cesa. Esta observación corrobora la importancia de la leptina en la regulación de la reproducción. Además, (Houseknecht, 1998) se ha demostrado que la leptina participa en el establecimiento de la pubertad. Por lo tanto, es muy importante que se apliquen programas nutricionales que aseguren que los niveles de grasa corporal durante el parto no sean elevados (pues deprimirán la ingestión) ni demasiado bajos (pues no se secretará suficiente leptina para permitir una buena función reproductiva).

Otro mecanismo por el que el balance energético negativo puede empeorar la eficiencia reproductiva es la baja concentración de insulina en sangre. La concentración de insulina en sangre durante la mitad de la lactación (con un balance energético positivo) es de alrededor de 2,5 ng/ml, mientras que al principio de la lactación es de unos 0,5 ng/ml. La insulina es una hormona, que además de mantener la glucemia, participa en 1) la estimulación de la secreción de FSH, 2) la secreción pulsátil de LH (Huber-Buchholz, 1999) y 3) la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo (Ladenheim, 1984). Por lo tanto, niveles bajos de insulina en sangre pueden resultar en bajas concentraciones de progesterona. La concentración baja de progesterona durante el principio de lactación es una de las causas más comunes del fallo reproductivo en el vacuno lechero. La concentración de progesterona en leche a los 5 días después de la inseminación está correlacionada con el índice de fertilidad, y puede ser usada para monitorizar la eficiencia reproductiva de los animales. Los niveles óptimos de progesterona en leche se encuentran entre los 3 ng/ml y 9 ng/ml. Las

concentraciones de progesterona en plasma aumentan con los tres primeros ciclos estrales del principio de la lactación, pero el aumento es reducido cuanto mayor sea el balance energético negativo que sufra la vaca y menor sea su concentración de insulina en sangre (Spicer L. J., 1993). La secreción de progesterona finaliza por la acción de la prostaglandina F₂ (PGF₂), en el caso de que no haya gestación, a los 18 días del ciclo. La secreción de PGF₂ por parte del endometrio es consecuencia de la estimulación de la oxitocina. Sólo en caso de gestación, el endometrio no responderá a la oxitocina debido a que el embrión secreta el interferón trofoblástico que evita la aparición de receptores de oxitocina a nivel endometrial. Bajos niveles de progesterona durante los inicios de la gestación resultan en embriones de menor tamaño, y por tanto con menor capacidad de secretar el interferón trofoblástico y poder evitar así la luteolisis y la interrupción de la gestación. Además, la insulina parece ser la principal responsable de la disminución de IGF-I durante el postparto (Grummer, 1995). El descenso de la IGF-I durante el postparto es probablemente el causante del aumento de la secreción de la hormona de crecimiento (bST) durante el principio de la lactación ya que la IGF-I es un potente inhibidor de la producción de bST en el hígado (Gluckman, 1996). La bST no es una hormona esencial para la reproducción, pues animales con mutaciones genéticas que carecen de receptores para la bST pueden reproducirse. Sin embargo, su eficiencia reproductiva es inferior. Ratones con esta mutación tenían un tamaño medio de camadas de 2,7 crías, mientras que ratones sin la mutación tenían un tamaño medio de camadas de 6,9 crías. Por otro lado, una deficiencia en la secreción de IGF-I o de sus receptores resulta en graves consecuencias reproductivas, que incluyen un desarrollo lento y anormal de los folículos, que nunca llegan a ovular. Sólo cuando se administran dosis muy elevadas de hormonas gonadotrópicas estos animales son capaces de ovular, aunque sus óvulos no llegan nunca a ser fertilizados con éxito (Baker, 1996). Por otro lado, la hipótesis de que la selección genética empeora la reproducción, puede tener su origen en que las vacas

de mayor producción lechera presentan niveles de bST en sangre superiores. La bST participa, a través de la estimulación de la IGF, en el reclutamiento de folículos. Con niveles elevados de bST la emergencia de la segunda (y si la hay tercera) ola folicular ocurre antes en el ciclo estral (lo normal es que la segunda ola folicular se inicie a los 10 días del ciclo), por lo que el folículo ovulatorio tiene una edad superior a lo normal. (Roche & Boland, 1991) demostraron que los folículos ovulatorios de mayor edad resultaban en índices de concepción inferiores a la media. Igualmente se ha encontrado que los animales en balance energético negativo se caracterizan por niveles sanguíneos elevados de hormona de crecimiento y ácidos grasos no esterificados, y niveles sanguíneos bajos del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), insulina, y glucosa (Canfield & Butler, 1991). En estas condiciones, los mecanismos de regulación homeorrética (acción de distribuir la energía disponible hacia las distintas funciones metabólicas) establecen la prioridad de utilización de nutrientes hacia la producción por encima de la función reproductiva (Bauman & Currie, 1980)). En un reciente estudio, Kirkland y Gordon (2001) secaron dos de las cuatro glándulas mamarias para estudiar los efectos del nivel de producción sobre la partición energética. Cuando la ingestión de energía se limitó por debajo de los requerimientos, las vacas con sólo dos glándulas activas dirigieron el 20% de la energía ingerida a la producción de leche, mientras que las vacas con las cuatro glándulas activas dirigieron el 43%. Esto sugiere la existencia de algún mecanismo endocrino que asegure que la producción de leche se mantenga. Por lo tanto, es de esperar que las vacas de mayor producción tengan un menor porcentaje de la energía disponible para funciones reproductivas en situaciones de balance energético negativo o próximo a la neutralidad, pues una mayor proporción de energía se dirigirá a la producción de leche. Eso implica que, con vacas muy productoras, un mínimo desajuste energético tendrá considerables repercusiones sobre la reproducción, pues una reducida

proporción de la escasa energía disponible podrá ser usada para mantener las funciones reproductivas.

1.3.2 INSULINA

La insulina es una hormona de origen proteico que ejerce determinados efectos sobre el transporte de los metabolitos. Por ejemplo, a nivel muscular y adiposo esta hormona aumenta la permeabilidad de la membrana para facilitar el ingreso de glucosa, aminoácidos, nucleósidos y fosfato a las células. No todos los tejidos responden sensiblemente a la presencia de insulina para que ésta desempeñe una función de "transporte" como sucede en el músculo, tejido adiposo y el corazón, sino que en el hígado y tejidos como el nervioso las membranas son permeables al ingreso de glucosa. A nivel de hidratos de carbono, la insulina, exceptuando los tejidos mencionados con anterioridad:

- Aumenta el transporte de glucosa al interior celular produciendo una disminución de los valores de glucosa en sangre
- Promueve la glucógenogénesis
- Aumenta el trabajo de algunas enzimas como la glucogenosintetasa, por lo que disminuye a su vez la glucógenolisis

A nivel de ácidos grasos, la insulina:

- Aumenta el almacenamiento de estos en el tejido adiposo
- Promueve la inhibición de la Lipasa hormona sensible presente en el adiposito, evitando la hidrólisis de los triglicéridos almacenados
- Disminuye la concentración de ácidos grasos libres en el plasma
- Promueve la activación lipoproteína lipasa presente en la membrana de los capilares
- Facilita el transporte de ácidos grasos a los tejidos, especialmente el adiposo

- Promueve el transporte de glucosa al adiposito para sintetizar a partir de ella, ácidos grasos.

La insulina también ejerce sus efectos sobre el metabolismo de las proteínas. De igual manera que la glucosa y los ácidos grasos, la insulina:

- Aumenta el transporte de aminoácidos al interior de la célula
- Disminuye la neoglucogénesis
- Aumenta la actividad ribosomal promoviendo la síntesis de nuevas proteínas
- Aumenta la transcripción del ADN celular, por lo que todos estos mecanismos
- Disminuyen el catabolismo de las proteínas.

Aparentemente la insulina y la STH actúan conjuntamente para promover el crecimiento; esto quizá podría deberse a que cada una de ellas promueve la captación de diferentes aminoácidos necesarios para promover el crecimiento.

1.3.2.1 Control de la secreción de insulina

Cuando las concentraciones de glucosa en sangre (70-110 mg por cada dl o 100 ml) aumentan más de dos a tres veces de lo normal, se incrementa diez veces la secreción de insulina en un plazo de tres a cinco minutos. Luego de quince minutos aproximadamente, la secreción de insulina aumenta aún más, no solamente por la descarga de insulina preformada, sino también nueva hormona sintetizada por algún sistema enzimático. Así como la insulina aumenta con gran rapidez frente al incremento de la glucemia, se comporta igualmente rápida en su descenso cuando los niveles de glucosa en sangre retornan a sus valores normales.

Los aminoácidos también ejercen estimulación sobre la secreción de insulina, pero de manera muy diferente a como lo hace la glucosa. Sin embargo, cuando se administra conjuntamente aminoácidos y glucosa, puede incrementarse aún más la secreción de la hormona. Existen también, otros factores que estimulan la secreción de insulina, tales como las hormonas gastrointestinales (gastrina, secretina, colecistocinina, péptido gástrico inhibitor), ya que mientras se van ingiriendo los alimentos, estas hormonas producen una descarga "anticipatoria" de insulina a manera de preparación para los nutrientes que van a ser absorbidos

1.3.2.2 Regulación de la glucemia

A partir de lo expuesto anteriormente, se puede decir, entonces, que el hígado constituye un "sistema amortiguador de la glucemia" ya que al aumentar los niveles de glucosa en sangre, esta se almacena inmediatamente por acción de la insulina, por lo que la glucemia disminuye. Posteriormente cuando los niveles de glucosa y de insulina se encuentran ya disminuidos, se produce un aumento en la liberación de glucosa hacia la sangre desde el hígado por la acción glucogénolítica del glucagón por lo que la glucemia retorna a sus valores normales.

Por otro lado, existen otras hormonas que pueden ser secretadas para contrarrestar el efecto de hipoglucemia como por ejemplo la adrenalina secretada por la médula suprarrenal, que promueve la glucogenólisis hepática incrementando los niveles de glucosa en sangre. Si la hipoglucemia se manifiesta en forma prolongada aumenta la secreción de STH y cortisol disminuyendo la utilización de glucosa por la mayoría de las células del organismo.

Los niveles de glucosa deben mantenerse constantes ya que la disminución de la glucemia afectaría particularmente al cerebro, la retina y el epitelio germinativo ya que estos utilizan la

glucosa como nutriente para abastecerse energéticamente. Por lo contrario, si los niveles de glucosa en sangre fueran muy altos (hiperglucemia), se produciría un incremento en la deshidratación celular por el efecto osmótico de la glucosa en la sangre; un aumento en la pérdida de glucosa por orina y a consecuencia de ello una disminución de los líquidos y electrolitos en el organismo por un mecanismo de diuresis osmótica provocada a nivel del riñón.

1.3.3 HORMONAS EXÓGENAS

De otra parte algunos vegetales contienen ciertas sustancias anti-nutricionales que pueden ejercer acciones protectoras sobre la salud humana y animal. Dentro de estos principios activos de origen vegetal, podemos encontrar los fitoestrógenos, sustancias con propiedades similares a los estrógenos. Se han identificado diferentes grupos de fitoestrógenos entre los que destacan las isoflavonas como la genisteína, los coumestanos como el coumestrol, y los lignanos representados por la enterolactona. Todos con peso molecular y estructuras parecidas al estradiol, la hormona femenina más importante. (Ludueña, Mastandrea, Chichizola, & Franconi, 2007). A nivel de plantas, los niveles de isoflavonas específicas presentes varían ampliamente, y con regularidad se acumulan sólo bajo condiciones específicas de estrés.

Los mecanismos por los cuales estos fitoestrógenos influyen sobre la producción hormonal, metabólica y acciones biológicas parecen depender de sus propiedades agonistas antagonistas estrogénicas. Se postula que estos químicos vegetales poseen dos acciones biológicas importantes: la unión a receptores de hormonas y a enzimas metabolizantes de hormonas. (Ludueña, Mastandrea, Chichizola, & Franconi, 2007)

Es decir estos compuestos actúan como agonistas o como antagonistas de las hormonas esteroidales dependiendo de la dosis que se utilice. Esta acción aparentemente contradictoria se debe a su capacidad para unirse como ligandos a los receptores estrogénicos alfa (ER α) del útero, glándula mamaria, sistema cardiovascular y hueso, y con mayor afinidad a los receptores estrogénicos beta (ER β) presentes en próstata, ovarios, testículos, tracto urinario, tejido linfoide y algunas regiones del cerebro como el hipotálamo. Se ha observado que a medida que se incrementa la dosis de genisteína y coumestrol, se inducen folículos hemorrágicos, abortos, síndrome estrogénico, y supresión de picos de hormona luteinizante (LH) en las hembras, mientras que en los machos se altera el desarrollo testicular y disminuye el recuento de espermatozoides. En esta revisión se presenta un panorama del estado actual de las investigaciones respecto a las implicaciones de los fitoestrógenos sobre la reproducción y sus perspectivas de estudio, poniendo énfasis en su importancia en los animales domésticos.

Los fitoestrógenos pueden inducir alteraciones en el sistema endocrino de los animales que los consumen, o en los animales a los que se les administran con fines experimentales. Desde el punto de vista clínico, en bovinos y ovinos estos productos pueden generar pérdidas económicas considerables debido a las alteraciones reproductivas que ocasionan. Si bien en la literatura se tienen documentados los efectos que tienen los fitoestrógenos en animales de laboratorio y, aunque de manera escasa en animales de importancia económica, es preocupante para el productor y el profesional encargado del hato, la detección de casos de alteración reproductiva cuya causa no pueda explicarse fácilmente. Una de las alternativas es a través de sustancias con actividad estrogénica proveniente del alimento que, como hemos mencionado, puede estar asociado a alguno de los grupos de fitoestrógenos (Pérez-Rivero, Aguilar-Setién, Martínez-Maya, Pérez-Martínez, & Serrano, 2007).

Si bien los fitoestrógenos pueden formar parte de los metabolitos secundarios o inducidos en los vegetales ante la presencia de patógenos, o como parte normal de su desarrollo, la evaluación al menos ocular de aspectos simples que estén asociados con la producción o acumulación de fitoestrógenos, como la floración del trébol rojo o la infestación de hongos en la alfalfa, permitirá un control que pueda reducir las pérdidas económicas ocasionadas por los fitoestrógenos.

1.3.3.1 Genisteína

La genisteína (4,5,7-trihidroxiisoflavona) es uno de los principios activos más importantes de la soja y el trébol rojo junto con otras isoflavonas tales como la daidzeina, biochanin A, formononetina, entre otras. En la planta se encuentra generalmente glicosilada como en el caso de la genisteína y otros glucósidos o en cantidades menores como aglucón.

Se han comprobado múltiples actividades in vitro que indicarían la posibilidad de su potencial uso terapéutico, entre otras, su acción antiestrogénica debido a su capacidad para ligarse a los receptores α y β estrogénicos, compitiendo con el estradiol aunque con una afinidad entre 100 y 1000 veces menor. Esta actividad les ha valido la denominación de α fitoestrógenos (Ludueña, Mastandrea, Chichizola, & Franconi, 2007) sus niveles pueden ser evaluados mediante espectrometría de masa o cromatografía de gases.

1.3.3.2 Daidzeina

La daidzeina, cuyo nombre sistemático es 4,7-dihidroxisoflavona, es un fitoestrógeno perteneciente al grupo de las isoflavonas, generalmente es de origen vegetal o puede ser derivado del metabolismo in vivo de precursores presentes en las plantas. En las plantas ayudan a regular el crecimiento y las protegen del estrés y de los efectos dañinos de la

radiación ultravioleta. La daidzeina tiene una estructura química muy similar a los estrógenos endógenos por tal razón se pueden ligar a los receptores de estrógeno y por esta razón se las considere fitoestrógenos. Sin embargo su acción en los receptores puede ser agonista o antagonista, por tal razón este parece ser un concepto de difícil comprensión. Lo complicado en esto es que los estrógenos tiene acciones no clásicas con respecto a sus acciones genómicas clásicas, y estos efectos influyen sobre tejidos específicos. Los receptores estrogénicos se denominan $ER\alpha$ y $ER\beta$ para diferenciar su acción en clásica y no-clásica respectivamente. (Burdette, y otros, 2002)

Esta diferenciación es la que permite explicar su acción en los distintos tejidos, comparada con el 17 β -estradiol, la daidzeina tiene relativamente poca afinidad para ligarse con el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) aunque su afinidad con el reciente descubierto receptor de estrógeno ($ER\beta$), es levemente menor. Sin embargo, incluso la menor afinidad con el $ER\beta$, sugiere que las poseen el potencial de ejercer efectos fisiológicos in vivo, ya que los niveles de isoflavonas en suero de las personas que consumen alimentos a fuentes de isoflavonas están en el rango micro molar mínimo, es decir aproximadamente 1000 veces mayor que los niveles endógenos de estrógenos (Burdette, y otros, 2002).

Si bien las isoflavonas se consideran fitoestrógenos (estrógenos vegetales) se podrían clasificar con mayor precisión como moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM). A diferencia de los estrógenos, los SERM son selectivos de ciertos tejidos, teniendo así efectos similares al estrógeno en algunos y ningún efecto en otros o bien actuando como antiestrogenicos. Las propiedades tipo SERM de las isoflavonas provienen al menos en parte, de su preferencia a ligarse con $ER\beta$ y a su mayor habilidad para disparar la actividad de transcripción cuando ligan a $ER\beta$ y no $ER\alpha$ (1,5,17) Sin embargo las isoflavonas también tiene efectos no hormonales que probablemente contribuyan a sus efectos fisiológicos.

(Burdette, y otros, 2002) sus niveles pueden ser evaluados mediante espectrometría de masa o cromatografía de gases.

1.3.3.3 Coumestrol

Coumestrol es un producto natural compuesto orgánico en la clase de fitoquímicos conocidos como cumestanos. Se ha ganado interés en la investigación debido a su actividad estrogénica y su prevalencia en algunos alimentos, como la soja, la alfalfa y otras leguminosas, fue identificado por primera vez en alfalfa por EM Bickoff en 1957. Desde entonces se puede encontrar en una variedad de legumbres, la soja, las coles de Bruselas y espinacas. Tréboles y soja tienen las concentraciones más altas. (Hong, Wang, Hsu, Lin, Kuo, & Huang, 2011)

Coumestrol es un fitoestrógeno, que imitan la actividad biológica de los estrógenos. La forma química del coumestrol sus dos grupos hidroxilo en la misma posición que los dos grupos hidroxilo en estradiol, lo que le permite inhibir la actividad de la aromatasa y hidroxisteroide deshidrogenasa. Estas enzimas están implicadas en la biosíntesis de esteroides hormonas, y la inhibición de estas enzimas resulta en la modulación de la producción de la hormona. (Hong, Wang, Hsu, Lin, Kuo, & Huang, 2011).

2. HIPÓTESIS

Ho: El consumo de fitoestrógenos contenidos en alfalfa (*Medicago sativa L*), y trébol rojo (*Trifolium pratense*) no afectan los valores Estradiol (E2), Hormona Luteinizante (LH), Triglicéridos, Triyodotironina (T3), Tiroxina (T4), Insulina, Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH), Glucosa, Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN) en Vacas Holsteín.

H₁: El consumo de fitoestrógenos contenidos en alfalfa (*Medicago sativa L*), y trébol rojo (*Trifolium pratense*) afectan los valores de Estradiol (E2), Hormona Luteinizante (LH), Triglicéridos, Triyodotironina (T3), Tiroxina (T4), Insulina, Hormona Estimulante de la tiroides (TSH), Glucosa, Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN) en Vacas Holsteín.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de fitoestrógenos presentes en alfalfa (*Medicago sativa L*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*) y evaluar su efecto sobre el perfil hormonal en vacas Holsteín.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer el valor nutricional y contenido de fitoestrogenos de la alfalfa (*Medicago sativa L*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*)
2. Determinar la influencia de estos fitoestrógenos sobre hormonas esteroides (estrógenos), hipofisarias (LH) triglicéridos, hormonas tiroideas (Tiroxina, triyodotironina, hormona estimulante de la tiroides) en vacas Holsteín.
3. Analizar la influencia de estos fitoestrógenos sobre los niveles de glucosa, nitrógeno ureico en sangre (BUN) e Insulina.
4. Hallar la relación entre hormonas esteroideas, hipofisarias, tiroideas, con los niveles de glucosa, BUN e insulina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio según su objeto corresponde a una investigación básica que contribuye a la ampliación del conocimiento científico generando aplicaciones prácticas mediante la determinación de perfiles hormonales relacionados con hormonas esteroideas (E2), hormonas hipofisarias (LH), hormonas tiroideas (T3, T4, TSH), triglicéridos, glucosa, BUN e insulina en la especie bovina; y un análisis desde el punto de vista fisiológico de estas variables, para integrar los resultados y obtener una información básica valiosa que conduzca a su aplicación posteriormente.

4.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El proyecto se desarrolló en La Granja Experimental Tinguavita de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), situada en el Municipio de Paipa en el Km 4 Vía *Paipa* ó Toca (Boyacá), vereda El Salitre, a una Altura de 2480 m.s.n.m., y en las coordenadas 0.5°45' de Latitud Norte y 73°45' longitud Oeste, con una temperatura promedio de 14,3 °C; precipitación anual de 737,9 mm/año y una humedad relativa de 78%. (Estación meteorológica del IDEAM, ubicada en las instalaciones de la granja)

4.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se utilizó una población conformada por 15 vacas Holsteín con su esquema de vacunación completa y libre de enfermedades reproductivas como Brucelosis, Rinotraqueitis bovina infecciosa IBR, Diarrea Viral Bovina DVB, Trichomoniasis, Leptospirosis, Vibriosis Genital Bovina, confirmadas mediante pruebas de sangre. Dichos semovientes se encontraban en el primer tercio de la lactancia con una condición corporal entre 3.5 y 3.75, con lo cual se garantiza mayor homogeneidad. Las vacas fueron seleccionadas y distribuidas al azar en tres subgrupos de 5 animales cada uno, y se procedió a la fase de campo, en donde recibieron una dieta en pastoreo a base de Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) con una edad de 45 días aproximadamente y un porcentaje de proteína del 9% acompañado de un suministro permanente de sal mineralizada (Somex® del 11%) y una ración de concentrado del 14% de proteína a razón de 3 Kgs/vaca/día.

La dieta suplemento (trébol rojo y alfalfa) se suministró por un periodo de 60 días, en recipientes individuales en cantidad suficiente para llenar los requerimientos del animal de acuerdo a los valores obtenidos al aplicar los parámetros establecidos para tal fin por el National Research Council (NRC) de 1989, según lo reportado (Elizondo, 2002)Tabla 1. Para suministrar el suplemento se realizaron preparaciones diarias e individuales de cada suplemento, adicionando agua-melaza con el fin de aumentar la palatabilidad y sobre todo homogenizar la mezcla, favoreciendo así su consumo total.

4.3.1 DISTRIBUCIÓN DE LOS ANIMALES EN EL EXPERIMENTO

Los tratamientos fueron distribuidos de la siguiente manera:

Grupo A1: 5 vacas a las cuales se les suministró un suplemento de trébol rojo de acuerdo a requerimientos.

Grupo A2: 5 vacas a las cuales se les suministró un suplemento de Alfalfa de acuerdo a requerimientos

Grupo A3: 5 vacas a las cuales no se les suministró ningún suplemento de trébol rojo o alfalfa.

4.4 MANEJO DEL MATERIAL VEGETAL DE TRÉBOL ROJO Y ALFALFA

El Trébol rojo (*Trifolium pratense*) y la Alfalfa (*Medicago sativa*) se obtuvieron de la granja Tinguavita recolectados de forma manual y secados en un invernadero (acondicionado previamente para este proceso). Este material completamente seco, se trituro en un molino eléctrico (Marca Cre-Masco®) para la obtención de la harina, la cual fue empacada en bultos de 50 kg y se suministró en cantidades de acuerdo a peso y contenido de isoflavonas, de tal manera que cada uno de los animales recibió la misma carga de dicho compuesto.

4.4.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

Este análisis bromatológico se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, mediante el método descrito por (Church & Pond, 2002) en *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de animales*, previo a la realización del estudio y sin posteriores repeticiones.

4.4.1.1 Materia Seca

Se colocó el material de estudio dentro de una estufa y se dejó por 8 horas a 105°C y por diferencia de peso se obtuvieron los valores de humedad y materia seca.

4.4.1.2 Proteína Cruda

Para determinar el valor de proteína cruda se utilizó el método de KJELDAHL. La muestra se digirió en H₂SO₄ concentrado, ácido que convierte el N en (NH₄)₂SO₄, posteriormente se enfrió esta mezcla, se diluyó con agua y se neutralizó con NaOH, que transforma al N en una forma de amoníaco ionizado. Después se destiló la muestra y el destilado que contiene el amoníaco se tituló con HCl 0.1N, este procedimiento se realizó con un Digestor y un destilador marca VELP UDK 6.

4.4.1.3 Extracto Etéreo

Para determinar el extracto etéreo, las muestras molidas se sometieron a extracción con éter dietílico por un periodo de cuatro horas. La principal razón para obtener el extracto etéreo es aislar una fracción de los forrajes que tiene un elevado valor calórico. La extracción se llevó a cabo en un Extractor Soxhlet Marca VELP.

4.4.1.4 Cenizas

Son el residuo que queda después que todo el material combustiona, la muestra se incinero en un horno a 500 °C y por diferencia de peso se obtuvo el valor de la fracción inorgánica y

por cálculo matemático se obtuvo el valor de la fracción orgánica. Este proceso se llevó a cabo en una mufla marca Memmert.

4.4.1.5 Fibra en Detergente Neutra FDN

Se determinó hirviendo una muestra en detergente neutro posteriormente se filtró, se secó, y por diferencia de peso se obtuvo el valor de la pared celular (FDN). Este proceso se llevó a cabo en un extractor de Fibra marca VELP.

4.4.1.6 Fibra en Detergente Acida FDA

Se determinó hirviendo una muestra en detergente ácido posteriormente se filtró, se secó, y por diferencia de peso se obtuvo el valor del complejo lignocelulósico (FDA). Este proceso se llevó a cabo en un extractor de Fibra marca VELP.

4.5 ANÁLISIS EN LOS ANIMALES

4.5.1 SUPLEMENTACIÓN DE LOS ANIMALES

Los animales objeto de estudio se seleccionaron y distribuyeron al azar y se procedió a la fase de campo, en donde se realizaron preparaciones diarias e individuales de cada suplemento, adicionando agua-melaza con el fin de aumentar la palatabilidad y sobre todo homogenizar la mezcla, favoreciendo así su consumo total.

La dieta suplemento (trébol rojo y alfalfa) se suministró por un periodo de 60 días, en recipientes individuales en cantidad suficiente para llenar los requerimientos del animal de

acuerdo a los valores obtenidos al aplicar los parámetros establecidos para tal fin por el National Research Council (NRC) de 1989, según lo reportado (Elizondo, 2002). Tabla 1.

UNIDAD EXPERIMENTAL	CONSUMO MS (Kg)	REQUERIMIENTOS DE PROTEINA (g)	APORTE PROTEINA PASTOREO (g)	DEFICIT DE PROTEINA (g)	CANTIDAD DE SUPLEMENTO DIA (g)	CANTIDAD DE SUPLEMENTO (Kg)
Vaca 1 alfalfa 460 Kg.	12,9	1748,4	1335,6	412,8	1965,8	4,97
Vaca 2 alfalfa 430 Kg.	12,0	1735,8	1335,6	400,2	1905,6	4,91
Vaca 3 alfalfa 520 Kg.	14,6	1773,7	1335,6	438,1	2086,3	5,09
Vaca 4 alfalfa 490 Kg.	13,7	1761,1	1335,6	425,5	2026,1	5,03
Vaca 5 alfalfa 470 Kg.	13,2	1752,6	1335,6	417,0	1985,9	4,99
Vaca 1 trébol 480 Kg.	13,4	1756,9	1335,6	421,3	2006,0	5,01
Vaca 2 trébol 510 Kg.	14,3	1769,5	1335,6	433,9	2066,2	5,07
Vaca 3 trébol 450 Kg.	12,6	1744,2	1335,6	408,6	1945,7	4,95
Vaca 4 trébol 520 Kg.	14,6	1773,7	1335,6	438,1	2086,3	5,09
Vaca 5 trébol 540 Kg.	15,1	1782,2	1335,6	446,6	2126,5	5,13
Vaca 1 control 480 Kg.	13,4	1756,9	1335,6	421,3	0,0	0,00
Vaca 2 control 550 Kg.	15,4	1786,4	1335,6	450,8	0,0	0,00
Vaca 3 control 470 Kg.	13,2	1752,6	1335,6	417,0	0,0	0,00
Vaca 4 control 490 Kg.	13,7	1761,1	1335,6	425,5	0,0	0,00
Vaca 5 control 460 Kg.	12,9	1748,4	1335,6	412,8	0,0	0,00

Tabla 1. Cálculo de las cantidades de suplemento de alfalfa y trébol para cada unidad experimental

4.5.2 TOMA DE MUESTRAS

Se realizó un muestreo antes de comenzar con la suplementación, posteriormente se realizaron 2 muestreos uno a los 30 días después de haber iniciado el trabajo de campo y otro a los 60 días, es decir al final del experimento.

4.5.2.1 Prueba y procedimiento para determinación de Hormonas Tiroideas (TSH, T3 y T4).

4.5.2.1.1 Hormona Estimulante de la tiroides (TSH)

Se midió la cantidad de la hormona estimulante de la tiroides en sangre, para lo cual se obtuvo por punción en la vena yugular una muestra de sangre, luego se centrifugó a 1500 rpm durante diez minutos, para su extracción a partir de suero, mediante la técnica automática TSH (ADVIA Centaur) q consiste en un inmunoensayo tipo sándwich de dos puntos que utiliza tecnología quimioluminométrica directa, y cantidades constantes de dos anticuerpos, el primer anticuerpo, en el reactivo lite, es un anticuerpo antióTSH monoclonal de ratón marcado con éster acridinio, el segundo anticuerpo, en la fase sólida, es un anticuerpo antióTSH policlonal de oveja que está acoplada de forma covalente a partículas paramagnéticas y finalmente los resultados de la TSH en el suero se reportan en ng/ml (Bayer, 2005).

4.5.2.1.2 Tiroxina (T4)

Se usó una prueba que mide la cantidad de T4 en la sangre, para lo cual se obtuvo por punción en la vena yugular una muestra de sangre, luego se centrifugó a 1500 rpm durante diez minutos, para su extracción a partir de suero, mediante la técnica automática T4 (ADVIA Centaur) que consiste en un inmunoensayo competitivo que utiliza una tecnología de quimioluminiscencia directa, la T4 en la muestra compite con la T4 que está acoplada de forma covalente a partículas paramagnéticas en la fase sólida, por una cantidad limitada de anticuerpo antiT4 monoclonal de ratón marcado con éster acridinio en el reactivo lite y finalmente los resultados de la T4 en el suero se reportan en mmol/L . (Bayer, 2005)

4.5.2.1.3 Triyodotironina (T3)

El método de medición de T3 fue similar al de T4, consiste en un inmunoensayo competitivo que utiliza una tecnología de quimioluminiscencia directa, la T3 en la muestra del paciente compite con una T3 análoga, que está acoplada de forma covalente con partículas paramagnéticas en la fase sólida por una cantidad limitada de anticuerpo antiT3 y finalmente los resultados de la T3 en el suero se reportan en mmol/L (Bayer, 2005).

4.5.2.2 Prueba y procedimiento para determinación de Hormonas Esteroideas (LH,E2 y P4)).

La cuantificación de, LH y E2 se realizó con la técnica de Inmunoensayo enzimático, utilizando kits de específicos para tal fin, lo que implica el uso de un análogo de esteroide, conjugado a un marcador. Los esteroides que son susceptibles de ser detectados por el

método y el kit incluía los patrones para estas hormonas. El método comprende los pasos de: a) incubación de una mezcla de una muestra problema de la que se sospeche que contenga un determinado esteroide, una fase sólida acoplada a un anticuerpo específico para dicho esteroide, y un conjugado de un análogo de dicho esteroide, para formar complejos esteroide / anticuerpo y complejos conjugado / anticuerpo sobre dicha fase sólida; b) separación de dicha fase sólida y dicha mezcla; c) medición de la cantidad de marcador presente en dicha mezcla o en dicha fase sólida; y d) determinación de la cantidad de esteroide en dicha muestra a partir de la cantidad de marcador. El kit contiene una fase sólida acoplada a un anticuerpo específico para un esteroide y un conjugado de un análogo de dicho esteroide (Williams, Brenner, & Venkatesh, 2002). Y la concentración de cada hormona se determinó mediante un espectrofotocolorímetro y finalmente los resultados de la Hormonas esteroideas en el suero se reportan pg/ml (Bayer, 2005) .

4.5.2.3 Prueba y procedimiento para determinación de Glucosa, Insulina y BUN

La Glucosa se determinó mediante el método Spinreact utilizando las enzimas Glucosa Oxidasa (GOD) ó peróxidasa (POD), en este método la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la D-Glucosa a ácido D-Glucónico con la formación de peróxido de hidrógeno. Este es utilizado por la peróxidasa para oxidar a la 4-aminofenazona y al fenol, dando lugar a una quinonaimina coloreada, en donde la intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa presente inicialmente.

La insulina se determinó por el método ELISA de monobind, que es un ensayo monoenzimométrico, que incluye anticuerpos de alta afinidad y especificidad, enzima conjugada e inmovilizada con epitopes de reconocimiento diferentes y antígeno nativo En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del pozo en el microplato durante la interacción de streptavidin cubierto sobre el pozo y agregado exógenamente anticuerpo de insulina monoclonal biotilado.

Una vez mezclado el anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo de enzima etiquetada y un suero que contiene el antígeno nativo, resulta una reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o sterio hidrance, para formar un complejo de sándwich soluble. La determinación de Nitrógeno ureico en suero utiliza la metodología basada en la reacción descrita por primera vez por Talke y Schubert, en donde la urea es hidrolizada por ureasa para producir amonio y dióxido de carbono. El Amonio liberado reacciona con Ketoglutarato en la presencia de NADH para producir glutamato. En este proceso, una cantidad equimolar de NADH, pasa por oxidación durante la reacción resultando en una disminución en absorbancia, la cual es directamente proporcional a la concentración de nitrógeno de urea en la muestra

4.5.2.4 Prueba y procedimiento para determinación de Triglicéridos

Se analizan por métodos calorimétricos tanto químicos como enzimáticos mediante un autoanalizador. Todos los métodos empleados implican 2 procesos:

- Hidrólisis de los triglicéridos para formar glicerol y ácidos grasos.
- Los triglicéridos son ésteres de glicerol con tres ácidos grasos y son los lípidos.

El método comprende una reacción enzimática utilizando glicerol36 fosfatoóxidasa (GPO), cuyo principio consta de la determinación de los triglicéridos después de la división enzimática con lipasa lipoproteína. El indicador es la quinoneimina la cual se genera a partir de la 46aminoantipirina y el 46clorofenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa.

Triglicéridos + LPL \rightarrow Glicerol + ácido graso
 Glicerol + ATP GK \rightarrow Glicerol36fosfato + ADP
 Glicerol36fosfato + O₂ GPO \rightarrow Dihidroxiacetona fosfato + H₂O + 22 H₂O₂ + Aminoantipirina + 46clorofenol
 POD \rightarrow Quinoneimina + HCl + 4 H₂O
 Medida del glicerol liberado (Rifa & Bachorik, 1998).

5. ANALISIS DE DATOS

Se realizó un análisis inferencial con la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA), para determinar si hay diferencia estadística entre los promedios de cada una de las variables a medir Estradiol (E2), Hormona Luteinizante (LH), Triglicéridos, Triyodotironina (T3), Tiroxina (T4), Insulina, Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH), Glucosa y Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN), entre cada uno de los tratamientos (Trébol (T1), Alfalfa (T2), Control (T3)), Se formularon las hipótesis para los tratamientos:

Hipótesis nula (H_0): los tratamientos presenta promedios de cada una de las variables estadísticamente iguales ($p > 0.05$)

Hipótesis alterna (H_a): por lo menos un tratamiento presenta un promedio de cada una de las variables diferente ($p < 0.05$); y, las hipótesis para los tiempos: H_0 : los promedios de cada una de las variables en los diferentes tiempos (inicial, intermedio y final) son estadísticamente iguales ($p > 0.05$); H_a : por lo menos en un tiempo (inicial, intermedio, final) se presenta un promedio de una de las variables diferente a los demás ($p < 0.05$). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba de comparación de medias de Duncan. Además se efectuó un análisis de correlación entre cada una de las variables estudiadas.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LOS MATERIALES DE ESTUDIO

La composición química de alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*) se presenta en la Tabla 2 donde se puede apreciar que la alfalfa presentó un contenido relativamente alto de proteína cruda pero muy similar en cuanto a los carbohidratos no estructurales (CNE). De otra parte el trébol rojo presentó una concentración mucho más alta tanto de Fibra en Detergente Neutro (FDN), como en Fibra Detergente acida (FDA) que la alfalfa. Con respecto al kikuyo se observan valores de proteína cruda más bajos del estándar establecido para tal gramínea de aproximadamente un -10% (valor normal para el kikuyo 19% según Leon & Mojica, 2007 en el altiplano cundiboyacense) probablemente por un déficit en la fertilización nitrogenada o edades de pastoreo muy avanzadas al igual que sus valores de extracto etéreo, por otro lado, el porcentaje de FDN y FDA posee un leve repunte que para Marais, (2001) representa un limitante en la digestión de la materia seca, y por ende de la energía disponible.

MATERIAL	HUMEDA D (%)	PROTEÍNA CRUDA (%)	EXTRACT O ETÉREO (%)	FDN (%)	FDA(%)	CENIZA S (%)	CNE (%)
ALFALFA	65,3±2,6	22,4±1,45	2,3±0,43	48,1±4,67	35,5±3,82	9,2±1,4	22,3±3,88
TRÉBOL ROJO	63,8±2,15	19,4±2,31	2,5±0,84	51,3±3,73	42,2±2,09	10,4±0,49	21,7±1,44
KIKUYO	68,7±0,80	9,3±1,43	1,7±0,26	58,9±2,72	46,8±1,87	12,3±2,09	16,8±1,75

Tabla 2. Composición bromatológica de los forrajes en estudio

6.2 NIVELES DE FITOESTRÓGENOS EN LA DIETA

Según Muñoz, Murillo, Perez, & A, (2002), encontró que las concentraciones de coumestrol en la alfalfa eran en promedio 68 mg/Kg, lo cual concuerda con lo observado por Benny, (1976) el cual determinó que para la alfalfa en fresco (38ppm) y procesada (harina, 49ppm) existe una diferencia en la concentración de dicha sustancia alrededor del 12%, sin embargo al evaluar 16 fuentes diferentes de harinas como de alfalfa en fresco no se encontraron variaciones en los rangos medios de coumestrol, siendo por ende constantes sus valores según la forma de suministro pero no en su estado (fresca o procesada), por otro lado Sivesind & Seguin, (2005) formulan que en promedio los niveles de fitoestrógenos totales en trébol es de 4,624 g/Kg, teniendo en cuenta estos valores se realizó el cálculo de la carga de fitoestrógenos aproximada recibida por las vacas del estudio, los cuales se presentan en la Tabla 3.

SUPLEMENTO	CONSUMO DE SUPLEMENTO (Kg/día)	CONSUMO DE COUMESTROL mg/día	CONSUMO DE DAIDZEINA Y GENISTEINA g/día
ALFALFA	5,00 ± 1,00	339,58 ± 2,05	0 ± 0
TREBOL	5,05 ± 0,03	0 ± 0	23,34 ± 0,14
CONTROL	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tabla 3. Niveles de fitoestrógenos consumidos (promedios y desviación estándar)

6.3 PERFILES DE ESTRADIOL DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN

Los resultados del presente estudio muestran como los niveles de Estradiol (E2) se encuentran por encima de los rangos normales, teniéndose como premisa que la concentración de tal hormona a nivel circulatorio es de 1pg/ml en proestro donde el estradiol se encuentra a la mitad de su concentración y 3pg/ml en estro y en diestro y metaestro valores menor a 1pg/ml (Gil, 1984) para vacas lecheras en el primer tercio de la lactancia, sin embargo las vacas que recibieron suplementación adicional con alfalfa o trébol mostraron

niveles más bajos de Estradiol (E2), que las vacas que no recibieron suplementación, sin embargo si consideramos como premisa el hecho de que el 80% del ciclo estral representa la fase luteal donde la estructura ovárica dominante es el cuerpo lúteo y la hormona dominante es la progesterona y el dominio del estradiol solo se da en un 20% del ciclo estral (fase folicular), es posible establecer que los niveles de estradiol encontrados se encuentran dentro de la fase luteal donde sus niveles no superan 1pg/ml, es así que se observa para las respectivas dietas una respuesta hiperestrogenica (valores superiores a 1pg/ml) (Tabla 4).

Una posible causa de estos bajos niveles de estrógenos es la presentación del síndrome hiperestrogénico, que puede deberse entre otras causas al consumo de grandes cantidades de fitoestrógenos del tipo de las cumarinas y las isoflavonas, provenientes de materiales vegetales como la alfalfa, los tréboles, la soya y muchas otras plantas ricas en este tipo de sustancias, las cuales tienen la capacidad de unirse a los receptores endógenos de los estrógenos provocando en los animales que los consumen en grandes cantidades alteraciones reproductivas por hiperestrogenización, tales como cuadros de ninfomanía, hiperemia vulvar, quistes ováricos, hiperplasia de mamas y útero, prolapsos de vagina, relajación de ligamentos pelvianos y esterilidad en casos avanzados de consumo exagerado de materiales que los contengan. El coumestrol es el fitoestrógeno que se encuentra en mayor cantidad en la alfalfa, el cual puede llegar a ser de 30 a 100 veces más potente que otros fitoestrógenos como las isoflavonas.

La diferencia de los estrógenos endógenos como el 17-beta estradiol o la estrona con los fitoestrógenos como la daidzeina, genisteína o el coumestrol, es que los estrógenos endógenos se eliminan a través de la orina, las heces ó se desactivan biológicamente y no se almacenan como lo hacen los fitoestrógenos.

El posible efecto directo de los fitoestrógenos sobre los problemas reproductivos es el bloqueo de los receptores para los estrógenos naturales por inhibición competitiva, perdiendo así una fuente de estímulo para el desarrollo de todos los procesos relacionados con el ciclo de la reproducción de los animales que consumen este tipo de materiales.

ESTRADIOL (ELISA INDIRECTA 1 HORA DE INCUBACION) Pg/ml VALOR DE REFERENCIA 0-5,12									
	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
Media ± SD	2,37 ±0,25	2,48 ± 0,19	2,25 ± 0,67	1,89 ± 0,24	2,42 ± 0,22	2,32 ± 0,12	1,80 ± 0,18	2,83 ± 0,18	4,24 ±0,31

Tabla 4. Perfiles De Estradiol Durante La Suplementación (promedios y desviación estándar)

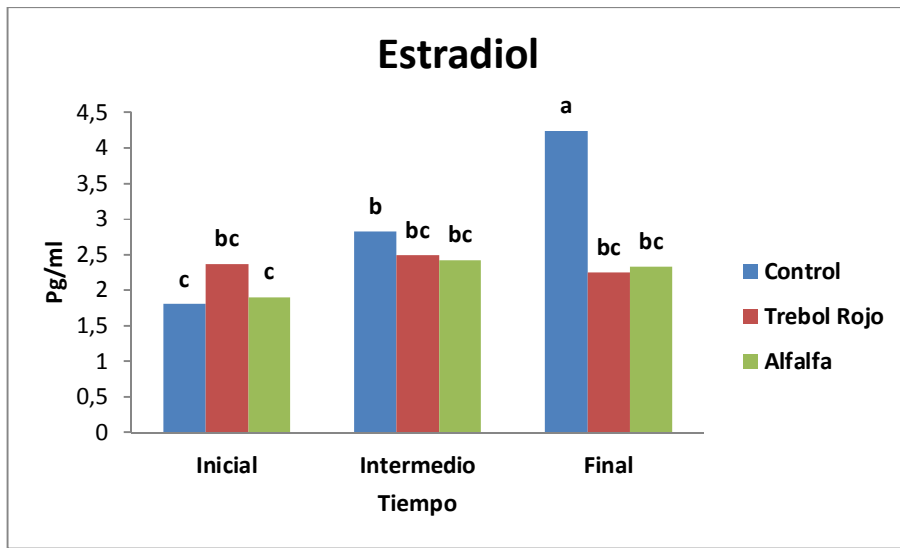


Figura 1. Niveles de estradiol en el tiempo

En la Figura 1 se observa el valor p del anova (Anexo 11; $p=0, p < 0.05$) donde se aprecia que por lo menos hay un promedio diferente, es así que, el estradiol en el control inicia en concentración baja (letra c), seguida de alfalfa (c) y trébol rojo (bc) son estadísticamente iguales; sin embargo en el intermedio el control aumenta (b), mientras que con alfalfa aumenta (bc), y con trébol rojo se mantiene (bc) con valores promedio más altos que en

tiempo inicial; al final, en el control se aumenta la concentración (a), mientras que con alfalfa y trébol rojo se mantienen (bc).

Los valores de estradiol con alfalfa y trébol rojo tienden a permanecer entre 1,9 pg/ml y 2,5pg/ml a lo largo del tiempo, mientras el control aumenta de 1,8 a 2,8 y final a 4,2. Esto coincide con lo expresado por (Baez Sandoval, 2010), que reporta que los niveles de secreción de estradiol mostraron un incremento a lo largo del posparto, desde $2,64 \pm 0,5$ pg/ml en la segunda semana después del parto, hasta $4,3 \pm 0,65$ pg/ml en el momento de la primera ovulación; posterior a esta, los niveles promedio de estradiol tendieron a estabilizarse.

Igualmente Cuoto, 1989 y; Lookhart y Finney, 1978 , citados por (Muñoz, Murillo, Perez, & A, 2002) manifiestan que la ingestión de alfalfa con altas concentraciones de cumestrol (20-50 mg kg/MS) produce alteraciones en el aparato reproductor del ganado lechero, tales cambios afectan principalmente al oviducto, útero, cérvix y vagina, así como un desequilibrio hormonal por la acción antigonadotrópica, es decir, que inhibe la producción de FSH y LHö.

De otra parte (Lenis Sanin, Gutierrez Gomez, & Tarazona Morales, 2010) concluyeron que el consumo de plantas que contienen fitoestrógenos favorece la actividad farmacológica endógena cuyo efecto depende básicamente del tipo, la cantidad y de la especie que lo consuma. Los fitoestrógenos están ampliamente contenidos en gran variedad de plantas y forrajes, destinados al consumo humano y animal, teniendo variabilidad de efectos adversos principalmente en el tracto reproductivo en la mayoría de especies animales. Debido a que muchos fitoestrógenos tienen la posibilidad de ser agonistas o antagonistas estrogénicos, los efectos varían desde la infertilidad hasta una sobre-respuesta estrogénica, aumentando así las secreciones del tracto reproductivo y alterando el comportamiento animal.

6.4 PERFILES DE HORMONA LUTEINIZANTE (LH) DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN

LH (ELISA) UI/ml VALOR DE REFERENCIA 0-20									
	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
Media ± SD	2,67 ± 0,26	3,65 ± 0,27	3,7 ± 0,26	3,47 ± 0,48	3,94 ± 0,30	3,82 ± 0,22	2,87 ± 0,39	5,46 ± 0,38	6,66 ± 0,39

Tabla 5. Perfiles de hormona luteinizante (LH) durante la suplementación (promedios y desviación estándar)

El valor p del anova (Anexo 12; p=0, p<0.05) indica que por lo menos hay un promedio diferente. La LH en el control inicia en concentración baja (cd), por debajo trébol rojo (d) y por encima alfalfa (cd); en el intermedio el control aumenta (b), mientras que con alfalfa aumenta un poco (cd), y con trébol rojo también (c); al final, en el control se aumenta la concentración (a), mientras que con alfalfa (c) y trébol rojo (cd) son menores. Los valores de LH con alfalfa y trébol tienden a permanecer entre 2,6 y 3,9 a lo largo del tiempo, mientras el control aumenta de 2,87 a 5,46 y final a 6,65 (Tabla 5).

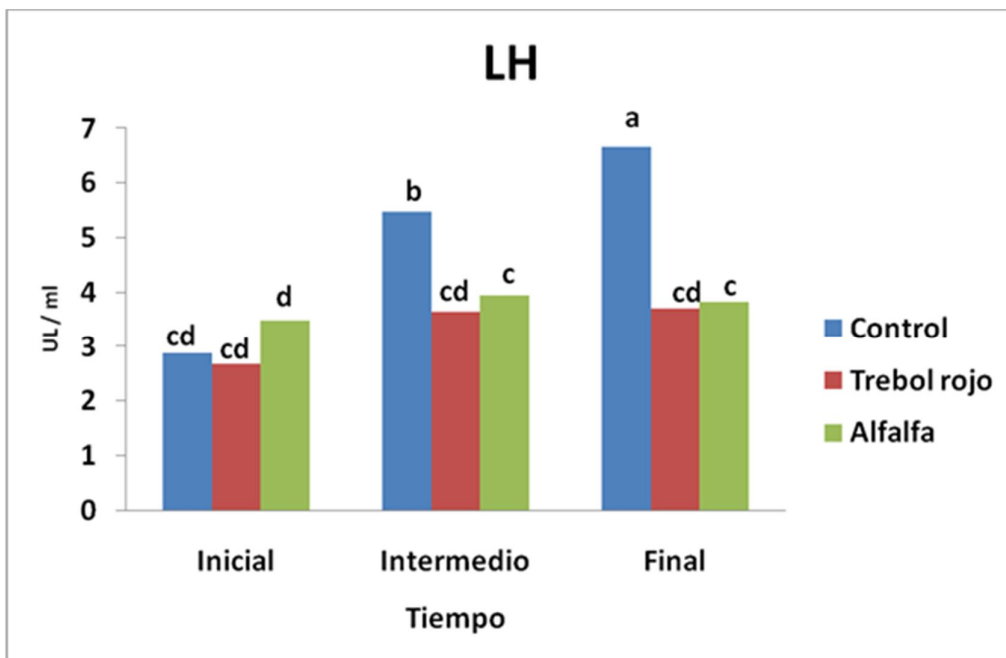


Figura 2. Hormona Luteinizante (LH) en el tiempo

En la Figura 2 los resultados del presente estudio muestran como los niveles de hormona luteinizante (LH) se encuentran dentro de los rangos normales para vacas lecheras en el primer tercio de la lactancia, sin embargo las vacas que recibieron suplementación adicional con alfalfa o trébol mostraron niveles más bajos de LH, que las vacas que no recibieron suplementación.

Lo anterior concuerda con lo manifestado por McGarvey et al., 2001, citado por (Lenis Sanin, Gutierrez Gomez, & Tarazona Morales, 2010), quienes atribuyen principalmente al fitoestrógeno COU la capacidad de suprimir los picos preovulatorios de la hormona luteinizante (LH) en ratas y que además la presencia de los ER α y ER β en las neuronas secretoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) abre la posibilidad de que los fitoestrógenos actúen directamente sobre ellas, afectando la secreción, de la misma manera igual que lo manifestado por Jacob et al., 2001 citado por los mismos autores quienes manifiestan que el comportamiento es similar en ovejas. Esto concuerda por lo expresado por (López, Satter, & Wiltbank, 2004), quienes concluyen que las vacas altas productoras tienen menores concentraciones séricas de estradiol, lo que se ha asociado con una disminución en la intensidad de la conducta estral.

6.5 PERFIL DE PROGESTERONA (P4) DURANTE LA SUPLEMENTACION

PROGESTERONA ng/ml (VALOR DE REFERENCIA 0,2-6 y 14)								
	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
Media ± SD	1,09±0,25	0,988±0,3	1,422±0,37	1,414±0,16	1,586±0,27	2,832±0,57	2,84±0,12	2,82±0,34

Tabla 6. Perfiles de progesterona (P4) durante la suplementación (promedios y desviación estándar)

El valor p del Anova ($p=0$, $p\leq 0.05$) indica que por lo menos hay un promedio diferente. La P4 en el control inicia en concentración alta (c), por encima del trébol rojo (a) y por encima alfalfa (b); en el intermedio el control disminuye levemente (a), mientras que con alfalfa aumenta un poco (b), y con trébol rojo se observa depleción de sus niveles (a); al final, en el control mantiene sus valores promedio (c), mientras que con alfalfa aumenta (b) y trébol rojo (a) decrece. Los valores de P4 con alfalfa tienden aumentar sin mayor significancia ($p > 0.05$) pero se presenta una menor concentración comparada con el grupo control ($p \leq 0.05$); por otro lado con el trébol rojo encontramos una caída en los niveles de P4 en el tiempo siendo menor su concentración con respecto al grupo control y alfalfa ($p \leq 0.05$) (Tabla 6).

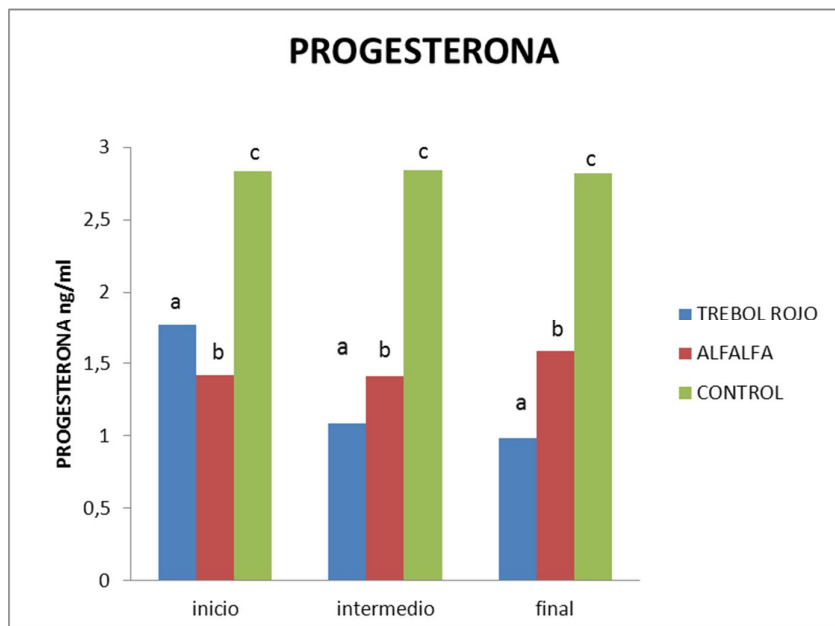


Figura 3. Progesterona en el tiempo

En la Figura 3 los resultados del presente estudio muestran como los niveles de progesterona (P4) se encuentran dentro de los rangos normales para vacas lecheras en el primer tercio de la lactancia, sin embargo las vacas que recibieron suplementación adicional con alfalfa o trébol mostraron niveles más bajos de P4, que las vacas que no recibieron suplementación.

Acorde a esto podemos inferir mediante la concentración de progesterona el estado reproductivo del animal, por ende con valores comprendidos entre 0.2 y 1ng/ml dentro de un ciclo estral normal se observa un aumento de estradiol (12ng/ml) que correspondería a la fase folicular del ciclo y por ende picos preovulatorios de E2, LH y FSH; por otro lado al hallar rangos de progesterona entre 1 y 6ng/ml nos encontramos con la fase lútea del ciclo donde la estructura dominante es el cuerpo lúteo, en este sentido hallamos valores de estradiol por debajo de 4ng/ml; es así que el efecto de los fitoestrogenos radica no solo en el efecto agonista sobre los receptores de estradiol sino también una depleción de GNRH y progesterona debido a que la relación existente entre P4 y E2 es inversamente proporcional, lo cual se manifiesta a partir de los primeros días de acostumbamiento.

La función lútea se ha asociado con la baja fertilidad, algunos estudios muestran que las vacas subfértiles tienen afectada la función del cuerpo lúteo. Se ha observado en las vacas altas productoras o bien con inclusión e isoflavonas, menores concentraciones séricas de progesterona, lo cual se asocia con la baja fertilidad (Mann y Lamming, 1999).

6.6 PERFIL DE TRIGLICÉRIDOS DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN

TRIGLICERIDOS mmol/L (VALOR DE REFERENCIA 0-0,2 mmol/L)									
	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
Media ± SD	0,25 ± 0,04	0,30 ± 0,04	0,32 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,018	0,32 ± 0,06	0,39 ± 0,04	0,39 ± 0,04

Tabla 7. Perfil de Triglicéridos durante la suplementación (promedios y desviación estándar)

El valor p del anova (Anexo 13; $p=0.0019$, $p < 0.05$) indica que por lo menos hay un promedio diferente. Los triglicéridos en el control inicial tienen concentración alta (ab), el trébol rojo (bc) está por debajo del control y alfalfa (c) menor de todos; en el tiempo intermedio y final permanecen en el mismo orden; la alfalfa y trébol aumentan con el tiempo, el control aumenta solo de tiempo inicial a intermedio, y de intermedio a final es constante (Figura 3). Los valores de triglicéridos aumentan con el tiempo en el control, con alfalfa y trébol; en los tres tiempos de medición el valor de triglicéridos es menor con alfalfa, un poco más alto con trébol rojo y la más alta concentración en el control (Tabla 6).

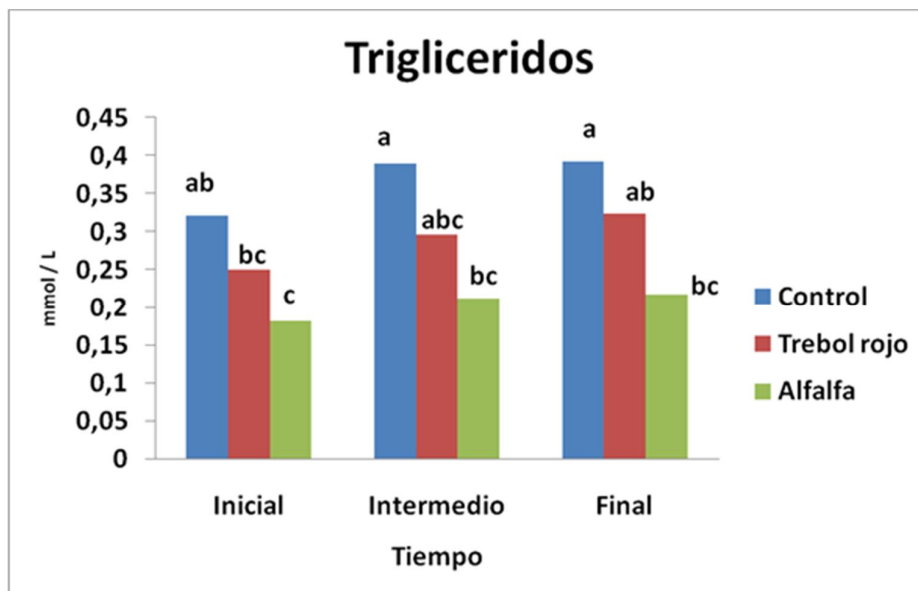


Figura 4. Triglicéridos en el tiempo

En la figura 3 los resultados del presente estudio muestran como los niveles de triglicéridos se encuentran por encima de los rangos normales para vacas lecheras en el primer tercio de la lactancia, sin embargo las vacas que recibieron suplementación adicional con alfalfa o trébol mostraron niveles más bajos de triglicéridos, que las vacas que no recibieron suplementación.

Los triglicéridos así como el colesterol son muy buenos indicadores del consumo energético del animal y por ende de su balance energético, tal es así que los resultados obtenidos demuestran que al inicio de la lactancia cuando los niveles de producción de leche son más altos, la concentración tanto de triglicéridos como de colesterol presenta valores bajos y se incrementa con el avance de la lactancia y la subsiguiente reducción en la producción de leche.

Dentro del aspecto nutricional este es uno de los factores que tiene gran importancia debido a la deficiencia en la dieta de energía, llevando a un Balance Energético Negativo (BEN), ya que el animal se ve obligado a movilizar reservas (Contreras P. , 1998). Estos cambios metabólicos pueden causar estrés en el animal, lo cual se ve reflejado en problemas reproductivos como la retención de placenta que está dada por las alteraciones que conllevan a que no se desprenda el cotiledón de las criptas carunculares, por baja respuesta del endometrio que en los procesos de contracción produce isquemia temporal en la carúncula. Otra razón asociada es que cuando se tiene una baja en el consumo de energía también se baja la producción de glucosa, a mediano plazo no se sintetiza colesterol y por ende se baja la producción de estrógenos, ya que no habrá excedentes energéticos que pueden sintetizar el precursor de la hormona esteroidea, que la misma placenta segrega ocurriendo una atonía uterina donde no habrá contractilidad del útero a la hora del parto llevando a la retención de placenta, como secuela inmediata al estrés del parto bajo severo BEN (Campos Gaona & Hernandez, 2008).

De otra parte Aranda, Brave, & Casagrande, 2002, refieren que que vacas con patologías como metritis, afecciones podales y problemas reproductivos presentan un porcentaje de grasa en leche superior al de vacas sanas. Esta diferencia es significativa en vacas con problemas reproductivos. También se observó que la concentración de colesterol en sangre es menor en vacas con las patologías nombradas que en vacas sanas. Los bajos niveles de colesterol en vacas con menor producción, problemas reproductivos y de salud coincidieron con los resultados reportados por (Rayssiguier, Gueux, & Cseh, 1993). De otra parte (Diaz-Yamal & Munevar-Vega, 2009) reportan que en 38 estudios controlados se encontró de manera significativa la reducción de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de triglicéridos, así como el aumento de las lipoproteínas de alta densidad

6.7 PERFIL DE TIROXINA (T4) TOTAL DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN

T4 TOTAL mmol/L VALOR DE REFERENCIA 57-119									
	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
Media ± SD	88,8 ± 11,02	89,8 ± 7,07	97,8 ± 4,79	88,8 ± 2,08	85,4 ± 5,99	80,8 ± 5,04	68,6 ± 16,92	88,6 ± 10,86	85 ± 4,14

Tabla 8. Perfil de Tiroxina (T4) total durante la suplementación (promedios y desviación estándar)

El valor p del anova (Anexo 14; $p=0,576$; $p < 0,05$) indica que no hay diferencias significativas entre los promedios. Los valores de T4 en los tres tiempos son estadísticamente iguales, pero, en tiempo inicial alfalfa y trébol rojo son más altos que control, y al final es más alto con trébol y más bajo con alfalfa, (Tabla 7).

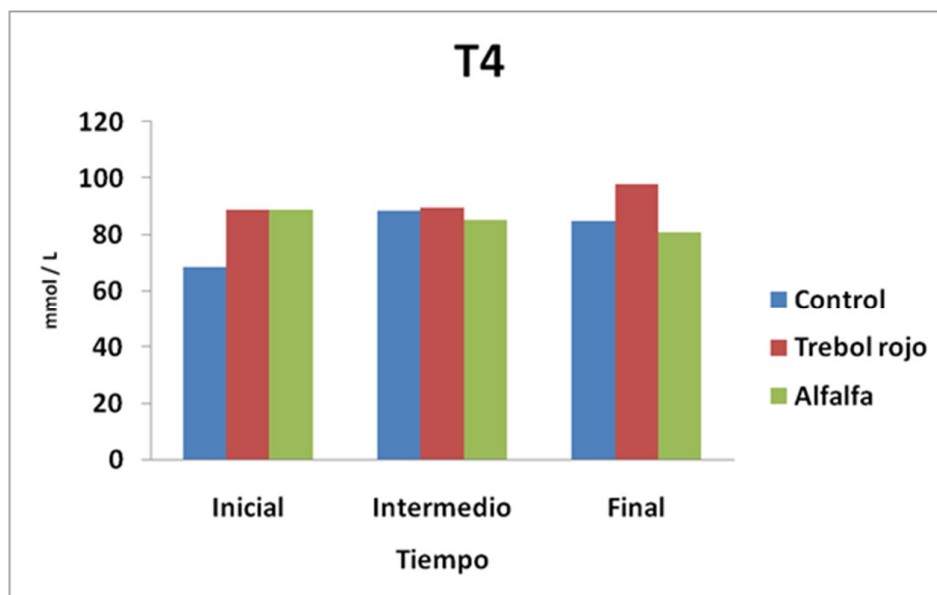


Figura 5. Tiroxina en el tiempo

Los resultados del presente estudio (Figura 4) muestran como los niveles de la hormona tiroxina T4 Total se encuentran dentro de los rangos normales para vacas lecheras en el primer tercio de la lactancia, sin embargo las vacas que recibieron suplementación adicional con alfalfa o trébol mostraron niveles más bajos de Tiroxina T4, que las vacas que no recibieron suplementación, esto concuerda con lo reportado por (Matamoros, R; Contreras, P; Wittwer, F, Mayorga, M, 2003), quienes reportan que las concentraciones sanguíneas de T4 en bovinos se encuentran entre los rangos de 57 ó 119 mmol/l, además sostienen que muchos procesos fisiológicos en rumiantes requieren de la normal actividad de la glándula tiroides, tales como: el crecimiento, la función reproductiva, el crecimiento de pelo y lana, por lo tanto, cuando las concentraciones plasmáticas de las hormonas de la tiroides se encuentran en niveles fisiológicos bajos, como ocurre en rumiantes tiroidectomizados o en las deficiencias de selenio o yodo en la ración, es necesario administrar tiroxina para recuperar la fisiología normal del animal.

Además según Jacobs et al 2001, citados por (Pérez-Rivero, Aguilar-Setién, Martínez-Maya, Pérez-Martínez, & Serrano, 2007) existen otros tejidos considerados ño clásicos, en los que

la presencia de ER es relativamente menor, pero que contienen cantidades significativamente mayores de ER. Entre estos últimos se incluyen próstata, ovarios, testículos, glándula pineal, glándula tiroidea, paratiroides, suprarrenales y páncreas, vesícula biliar, piel, tracto urinario, tejido linfoide, tejido eritroide, pulmón, epitelio intestinal, y algunas regiones del cerebro, como el hipotálamo, cerebelo y lóbulo olfatorio.

Al respecto, (Espinosa, Soto, Denes, & Hernandez, 2008) reportan que se ha obtenido información valiosa en modelos animales de ratones en los que se encuentra suprimida la expresión de uno u otro receptor. Gracias a ello, se ha determinado, por ejemplo, que el RE es probablemente el responsable de la acción protectora de los estrógenos en el sistema cardiovascular, y que las acciones atribuidas a los fitoestrógenos -como la protección contra algunos tipos de cáncer- están mediadas a través del REβ, con el que tienen contacto en el tracto gastrointestinal. En otros casos se ha comprobado que el REβ puede suplir las funciones del RE, como ocurre con los efectos estrogénicos observados en el ratón carente del RE.

Sin embargo, la faceta más interesante de la acción estrogénica a través de los receptores a estrógenos es quizá la expresión conjunta de ambas proteínas en distintos tejidos. En efecto, en la mayoría de los casos se observa una tendencia del REβ a atenuar o inhibir las acciones del RE, es decir, se ha encontrado un efecto antagonista del REβ sobre las acciones mediadas por el RE en diversos estudios con organismos completos o con cultivos celulares. En las células de hueso, por ejemplo, el REβ inhibe el efecto de crecimiento celular mediado por el RE, con lo que limita el crecimiento longitudinal y radial de los huesos. En ratones con supresión del REβ se observan focos de proliferación celular exagerada (un tipo de hiperplasia) en la próstata, mientras que en el hígado hay un aumento de la transcripción mediada por RE, aparentemente porque se carece del efecto inhibitorio mediado por el REβ

en ratones normales. Por otra parte, el RE β parece mediar la reducción de la proliferación en el útero y en el tejido graso, los que son efectos contrarios a los que se atribuyen al RE α .

El mecanismo molecular sobre el que estos efectos descansan no está del todo claro. Sin embargo, es probable que haya diferencias no en la interacción de uno u otro receptor con el ADN sino en la que ambos puedan desplegar con otras proteínas que funcionan como coactivadores, y que sean estas moléculas las responsables de mediar, en ciertos contextos genéticos, los efectos diferenciales observados. Además (Spicer, Alonso, & Chamberlain, 2001), reportaron que la T4 puede ejercer un impacto positivo leve sobre la producción de progesterona, inducida por FSH en células de la granulosa, mientras que T3 y T4 pueden ejercer un mayor impacto positivo sobre la producción de androstenediona en las células de la teca, lo cual podría resultar en un incremento neto de la producción de estrógenos por los folículos.

6.8 PERFIL DE TRIYODOTIRONINA (T3) TOTAL DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN

T3 TOTAL mmol/L VALOR DE REFERENCIA 0,8-1,8									
	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
Media	1,3 ±	1,14 ±		1,3 ±	1,08 ±	1,06 ±	1,3 ±	1,36 ±	1,36 ±
± SD	0,13	0,10	1,3 ± 0,1	0,11	0,08	0,07	0,13	0,11	0,07

Tabla 9. Perfil de Triyodotironina (T3) total durante la suplementación (promedios y desviación estándar)

El valor p del anova (Anexo 15; p=0.2793; p<0.05) indica que no hay diferencias significativas entre los promedios. Los valores de T3 en los tres tiempos son estadísticamente iguales, pero, en tiempo inicial en control, con alfalfa y con trébol rojo son de igual valor; T3

en tiempo intermedio en el control es más alto que trébol rojo y alfalfa, y, trébol rojo disminuye y alfalfa disminuye más; T3 en tiempo final en el control es más alto que con trébol rojo y que con alfalfa, y, con trébol rojo tiende a aumentar, mientras que con alfalfa tiene la tendencia a disminuir (Tabla 8).

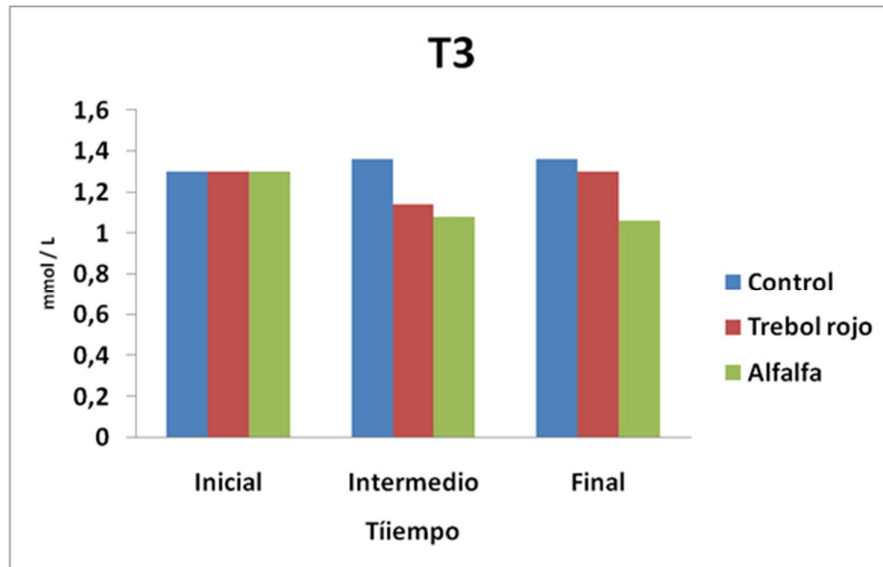


Figura 6. Triyodotironina T3 en el tiempo

Los resultados del presente estudio (Figura 5) muestran como los niveles de la hormona triyodotironina (T3) total, se encuentran dentro de los rangos normales para vacas lecheras en el primer tercio de la lactancia, sin embargo las vacas que recibieron suplementación adicional con alfalfa o trébol mostraron niveles más bajos de T3, que las vacas que no recibieron suplementación, esto concuerda con lo reportado por (Matamoros, R; Contreras, P; Wittwer, F, Mayorga, M, 2003), quienes manifiestan que las concentraciones sanguíneas de T3 en bovinos se encuentran entre los rangos de 0.8 - 1.9 nmol/l y sostienen que dentro de los factores que afectan las concentraciones de las hormonas tiroideas en animales, no se encuentran las variaciones circadianas en la secreción de estas hormonas, por tal razón, el momento del día en que se toma la muestra de sangre no influye en la determinación de las concentraciones hormonales. Sin embargo, existen varios factores que influyen en las concentraciones sanguíneas de estas hormonas dentro de los cuales esta el Balance

Energetico Negativo (BEN), el cual provoca la disminución de las concentraciones de hormonas tiroideas como un mecanismo de protección del organismo, estando la severidad del déficit altamente correlacionada con la intensidad de la disminución de T4.

Lo mismo reportan los autores antes mencionados con respecto al Nivel de producción láctea y etapa de la lactancia, pues a mayor producción y al inicio de la lactancia, menor es la concentración sanguínea de T3 y T4.

De otra parte las hormonas tiroideas facilita la β - oxidación de ácidos grasos, tal es así que la T4 disminuye las concentraciones plasmáticas de colesterol y triacilgliceridos, además, aumenta la sensibilidad de la lipasa hormona-sensible, en respuesta a las catecolaminas (epinefrina), y disminuye la sensibilidad de esta enzima a la acción antilipolítica de la insulina, adicionalmente T4, al igual que los estrógenos y la insulina, ayuda a mantener la síntesis del receptor hepático a lipoproteínas de baja densidad (LDL), ayudando así a la remoción del colesterol circulante.

6.9 PERFIL DE INSULINA DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN

INSULINA (ELISA INDIRECTA 1 HORA DE INCUBACION) UI/ml VALOR DE REFERENCIA 0-200									
	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
Media \pm SD	24,268 \pm 2,42	26,09 \pm 0,79	26,47 \pm 2,12	26,05 \pm 0,94	23,24 \pm 0,55	25,3 \pm 0,90	21,93 \pm 1,70	24,06 \pm 1,65	24,05 \pm 1,35

Tabla 10. Perfil de insulina durante la suplementación (promedios y desviación estándar)

El valor p del anova (Anexo 16; $p=0.4585$; $p \times 0.05$) indica que no hay diferencias significativas entre promedios. Los valores de insulina son estadísticamente iguales en los tres tiempos para control, con trébol rojo y con alfalfa. El valor de la insulina en control inicia bajo, trébol rojo más alto y alfalfa el más alto; en tiempo intermedio alfalfa hace disminuir

insulina, pero, al final tiende a aumentar; el trébol tiene el mismo comportamiento o tendencia que el control, pero, el primero tiene valores de insulina más altos que el control. La tendencia al final de trébol rojo y alfalfa es aumento de insulina, mayor con trébol rojo (Tabla 9).

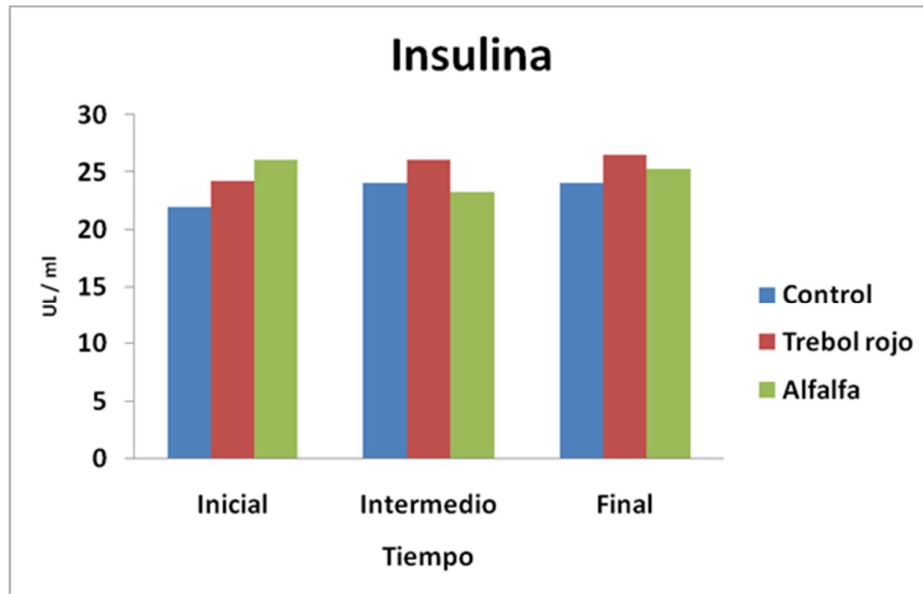


Figura 7. Insulina en el tiempo

Los resultados del presente estudio muestran como los niveles de la hormona Insulina, se encuentran dentro de los rangos normales para vacas lecheras en el primer tercio de la lactancia, sin embargo las vacas que recibieron suplementación adicional con alfalfa o trébol mostraron niveles un poco más bajos de insulina, que las vacas que no recibieron suplementación (Figura 6).

Los valores de insulina disminuyen a medida que aumenta la producción de leche, lo cual podría explicarse por el direccionamiento de los nutrientes hacia los tejidos extramamarios, lo cual refleja una relación inversa entre la insulina y la producción de leche, tal como lo reporta (Fernandez Idrogo, 2009), citando a Galvis 2003, quien manifiesta que con respecto a los valores de insulina estos disminuyen conforme aumenta la producción de leche que se explica

por el direccionamiento de nutrientes hacia tejidos extramamarios mediado por la insulina, lo que se debe ver reflejado como una relación negativa entre insulina y producción lechera .

De otra parte (Diaz-Yamal & Munevar-Vega, 2009) reportan consumos de 54 g/día de genisteína con resultados positivos en la disminución de glucosa sérica, insulina sérica y en la resistencia a la insulina.

Sin embargo lo anterior contradice a (Zárate, Vinay, Carballo, Hernández, & Villagómez, 2011) quienes reportan que niveles altos de grasa en la dieta deprimen los valores de insulina sérica de manera significativa, mejorando el comportamiento reproductivo y que esta condición podría deberse a una disminución de glucosa en la sangre al obtener el aporte energético de la fracción lipídica en las dietas que tienen una mayor digestibilidad intestinal aumentando el cociente lipogénico/ glucogénico.

6.10 PERFIL DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES (TSH)

DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN

TSH (ELISA INDIRECTA 4 HORAS DE INCUBACION) ng/ml VALOR DE REFERENCIA 0-80									
	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
Media	2,76 ±	2,33 ±	2,5 ±	2,16 ±	1,42 ±	1,92 ±	1,91 ±	2,50 ±	5,32 ±
± SD	0,23	0,28	0,17	0,25	0,13	0,28	0,25	0,35	0,17

Tabla 11. Perfil de la Hormona estimulante de la tiroides (TSH) durante la suplementación (promedios y desviación estándar)

El valor p del anova (Anexo 17; $p=0$, $p<0.05$) indica que si hay un promedio diferente. El control aumenta los valores de TSH con el tiempo. Los valores de TSH con trébol rojo son mayores que alfalfa en los tres tiempos; en el tiempo inicial en control el valor de TSH es el más bajo seguido de alfalfa y trébol; en el tiempo intermedio disminuyen los valores de TSH con trébol rojo y alfalfa, siendo ambos más bajos que el control, y, alfalfa más bajo que trébol rojo; en el tiempo final el control es más alto, seguido de trébol y de alfalfa (Tabla 10).

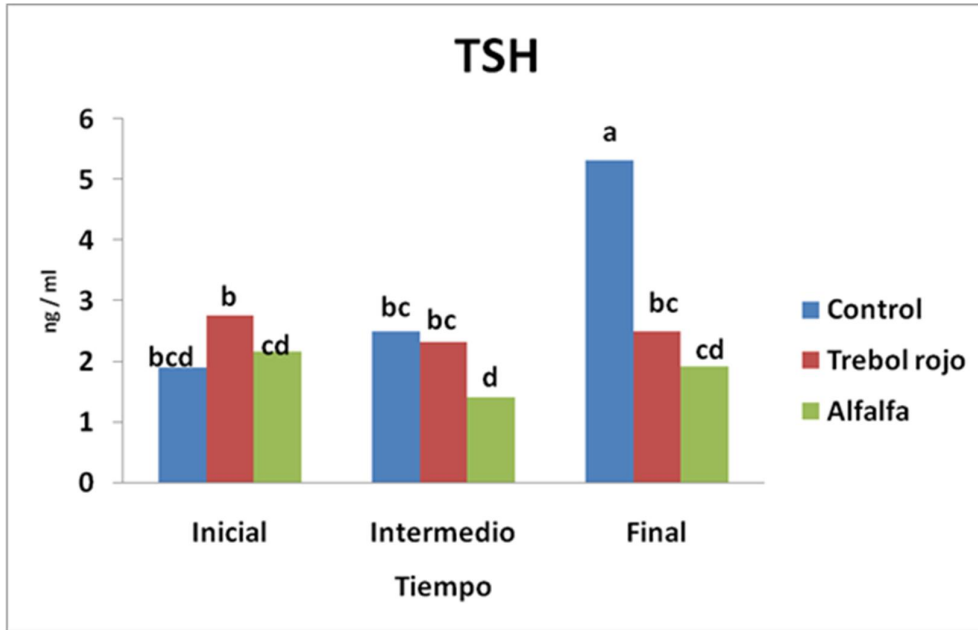


Figura 8. Hormona estimulante de la tiroides TSH en el tiempo

Los resultados del presente estudio muestran como los niveles de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), se encuentran dentro de los rangos normales para vacas lecheras en el primer tercio de la lactancia, sin embargo las vacas que recibieron suplementación adicional con alfalfa o trébol mostraron niveles más bajos de TSH, que las vacas que no recibieron suplementación (Figura 7).

6.11 PERFIL DE GLUCOSA DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN

GLUCOSA mg/ml VALOR DE REFERENCIA 45-75									
	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
Media ± SD	45,24 ± 2,14	49,34 ± 1,21	47,84 ± 0,99	50,48 ± 2,07	45,44 ± 0,77	43,02 ± 1,03	44,12 ± 4,46	50,44 ± 3,11	53,16 ± 3,19

Tabla 12. Perfil de glucosa durante la suplementación (promedios y desviación estándar)

El valor p del anova (Anexo 18; p=0.0747; p<0.05) indica que no hay diferencias significativas entre promedios. Los valores de glucosa son estadísticamente iguales en los tres

tiempos para control, trébol rojo y alfalfa. El control inicia con valor bajo de glucosa, seguido de trébol rojo, y más alto alfalfa; en el tiempo intermedio la glucosa es baja con alfalfa seguida de trébol rojo, es decir, estos dos están por debajo del control; en tiempo final la glucosa tiende a disminuir más con alfalfa que con trébol rojo, y los dos son menores que el control (Tabla 11).

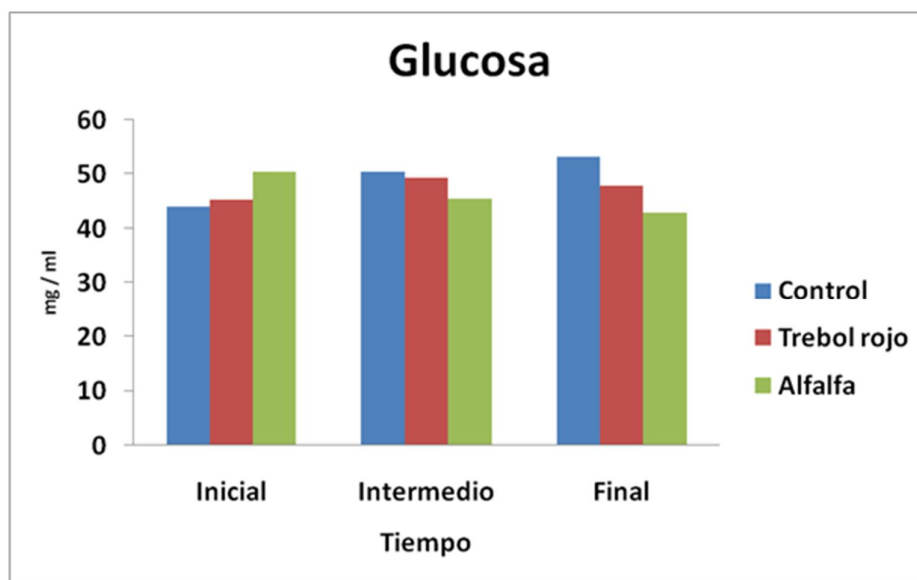


Figura 9. Glucosa en el tiempo

Los resultados del presente estudio muestran como los niveles de glucosa (Figura 8), se encuentran dentro de los rangos normales para vacas lecheras en el primer tercio de la lactancia, sin embargo las vacas que recibieron suplementación adicional con alfalfa o trébol mostraron niveles similares de glucosa, que las vacas que no recibieron suplementación, resultados que no concuerdan con lo expresado por (Campos Gaona & Hernandez, 2008)., quien manifiesta que cuando se tiene una baja en el consumo de energía también se baja la producción de glucosa, a mediano plazo no se sintetiza colesterol y por ende se baja la producción de estrógenos, ya que no habrá excedentes energéticos que pueden sintetizar el precursor de la hormona esteroidea.

6.12 PERFILES DE BUN DURANTE LA SUPLEMENTACIÓN

BUN mg/ml VALOR DE REFERENCIA 45-75									
	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
Media	17,4 ±	25 ±	25,4 ±	20,6 ±	25,8 ±	24,4 ±	22,2 ±	22,6 ±	22,8 ±
± SD	1,21	0,55	1,29	1,44	0,58	0,51	3,18	1,96	1,16

Tabla 13. Perfiles de BUN durante la suplementación

El valor p del anova (Anexo 19; $p=0.0107$, $p\leq 0.05$) indica que si hay un promedio diferente. En el tiempo inicial el valor de BUN es menor con trébol rojo que con alfalfa, es decir, el control es más alto; en el tiempo intermedio el valor de BUN es menor en el control, aumenta con alfalfa y trébol, pero, es mayor con alfalfa; en el tiempo final el valor del BUN es menor en el control, aumenta con trébol rojo y disminuye con alfalfa (Tabla 12).

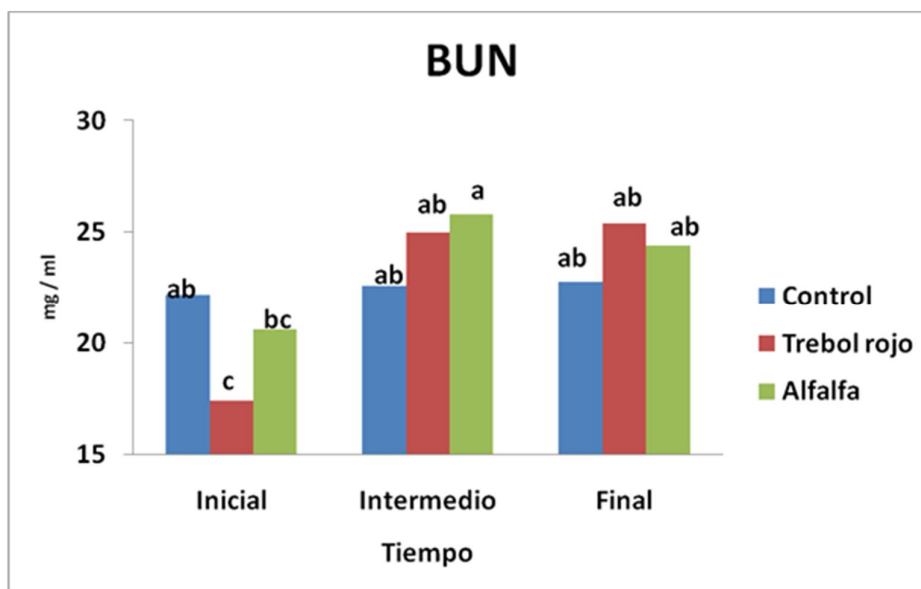


Figura 10. Nitrógeno Ureico en sangre (BUN) en el tiempo

Los resultados del presente estudio muestran como los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) se encuentran dentro de los rangos normales para vacas lecheras, sin embargo las

vacas que recibieron suplementación adicional con alfalfa o trébol mostraron niveles más altos de BUN, que las vacas que no recibieron suplementación (Figura 9).

Muchos estudios han demostrado que los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN), cuyos valores tienen una alta correlación con los niveles de nitrógeno Ureico en leche (MUN) están muchas de las veces relacionados con problemas de baja fertilidad, sin embargo los efectos que pueden causar las dietas altas en proteína sobre la fertilidad no son muy consistentes, aunque en muchas investigaciones las concentraciones plasmáticas bajas de progesterona plasmática en los primeros días de la lactancia se le atribuyen a dietas altas en proteína y tienen una correlación negativa con los niveles de BUN Y MUN (Butler, Pelton, & y Butler, 2004). Otro estudio más detallado que muestra la asociación entre los niveles altos de proteína en la dieta y bajos niveles de fertilidad, permite un dilucidación más cercana de las posibles causas de este fenómeno, en el cual se demostró que vacas alimentadas con niveles más altos de proteína degradable en rumen (PDR), tuvieron un menor desarrollo folicular y un intervalo de días mayor medido hasta la primera actividad luteal (25,2 vs 38,6), al igual que se encontró una menor cantidad de tejido luteal acumulado y menos niveles de progesterona plasmática, en comparación con vacas que recibieron menor cantidad de PDR . (Anzola Vasquez, 2004)

6.13 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

6.13.1 CORRELACIÓN GLUCOSA, BUN, INSULINA

Se realizaron análisis de correlación para determinar si los pares de variables glucosa e insulina, glucosa y BUN, y, BUN e insulina, tienen alguna relación en alguno de los tiempos, en control, trébol rojo o alfalfa. Se plantean las hipótesis: hipótesis nula (H_0): no hay relación entre las dos variables ($p \geq 0.05$); hipótesis alterna (H_a): si hay relación entre las dos variables ($p < 0.05$). Solo se encontró relación entre glucosa y la insulina en alfalfa en el tiempo intermedio; el valor p del anova (Anexo 10; $p = 0.0448$; $p < 0.05$) para correlación indica que si hay relación entre la glucosa y la insulina en el tiempo intermedio. El coeficiente de correlación es moderado ($r = -0.8870$), lo cual indica que es una correlación negativa, donde una variable aumenta y la otra disminuye. El coeficiente de determinación ($r^2 = 78.68\%$) indica que los valores de insulina están explicados en un 78.68% de acuerdo a una relación lineal con los valores de glucosa. De acuerdo a la ecuación de regresión para alfalfa en el tiempo intermedio: $\text{Insulina} = 52.443 - 0.6426 * \text{Glucosa}$, se establece la relación entre las dos variables; el coeficiente de regresión indica que la insulina disminuye en 0.6426 UL/ml por cada unidad de glucosa (mg/ml) (Figura 10). Lo anterior está de acuerdo con lo reportado por (Ruiz, Uribe, & Osorio, 2011), quienes manifiestan que el balance energético es el resultado de la diferencia energética entre las necesidades del animal y los aportes alimentario y que durante las 2-4 últimas semanas de gestación se produce un aumento sustancial de las necesidades energéticas, debido al desarrollo fetal y a las necesidades de síntesis de calostro, situación que se acompaña de una disminución en el consumo de materia seca. Además reportan que estas dos circunstancias son, con frecuencia, responsables del desarrollo de un balance energético negativo que se inicia unas semanas antes del parto, lo que conlleva a niveles bajos de insulina y glucosa en sangre.

De otra parte publican que hay una creciente evidencia del efecto de la nutrición en el desarrollo de folículos y que la dieta también se ha correlacionado positivamente con la tasa de crecimiento y el tamaño del folículo ovulatorio, y durante la lactancia la medida del déficit del balance de energía negativo es un factor importante para controlar el crecimiento del folículo, además, estudios recientes también han puesto presente la relación entre la ingesta alimentaria y la competencia en el desarrollo del ovocito y que factores extraováricos, como las hormonas metabólicas y la producción local de factores de crecimiento, están involucrados en la mediación de estos cambios inducidos por la nutrición en la dinámica folicular y la calidad del ovocito

Lo anterior concuerda con lo reportado por Bach, 2004, que señaló que un balance energético negativo se caracteriza por niveles sanguíneos elevados de hormonas de crecimiento y ácidos grasos no esterificados y niveles sanguíneos bajos del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), insulina y glucosa. Bajo estas condiciones, los mecanismos de regulación homeorrética (acción de distribuir la energía disponible hacia las distintas funciones metabólicas) establecen la prioridad de utilización de nutrientes hacia la producción láctea por encima de la función reproductiva.

Sin embargo (Razz & Clavero, 2004) encontraron que la suplementación afectó significativamente ($P < 0,05$) el contenido de urea en sangre y reportaron que los máximos valores se obtuvieron cuando los animales se suplementaron con solo leucaena y con leucaena y 1kg. de concentrado, no existiendo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellos pero si con respecto al consumo de 2 kg de concentrado. Respuestas similares fueron obtenidas por (Hussain & Cheeke, 1995), quienes observaron una disminución significativa en la concentración de urea en sangre a medida que incrementaron los niveles de concentrado en la dieta cuando utilizaron harina de soya como suplemento proteico y además (Rajala-Schultz, Saville, Frazer, Wittum, & T.E., 2001) reportan que disminuciones de los niveles de

urea están asociadas a una mayor tasa de preñez y a menores pérdidas embriónicas tempranas antes del reconocimiento de la preñez.

De otra parte (Hess, Flórez, González, & Avila, 1999), indicaron que uno de los factores que determinan los niveles de urea en la sangre es la dieta que se le suministra al animal y el grado de degradabilidad de la proteína a nivel ruminal. Asimismo, sugieren que el contenido de urea en sangre es un buen indicador del estado de nutrición de los animales y sirve como herramienta para ajustar el suministro de proteína y energía en la dieta de vacas en pastoreo, además (Arias & Nesti de Alonso, 1999), manifestaron que el nivel de nitrógeno no protéico circulante tiene significancia por su consecuente efecto sobre el comportamiento reproductivo y la integridad de los tejidos hepático y mamario, y que dichos valores ofrecen una herramienta simple para evaluar la eficiencia de la utilización de la proteína de la dieta.

Hay muchos factores que pueden influir sobre los niveles de insulina y glucosa, sin embargo (Razz & Clavero, 2004) encontraron que existió un incremento de los niveles de ambas variables producto de la suplementación, debido a una mayor suplencia de carbohidratos no estructurales o solubles a través del suplemento.

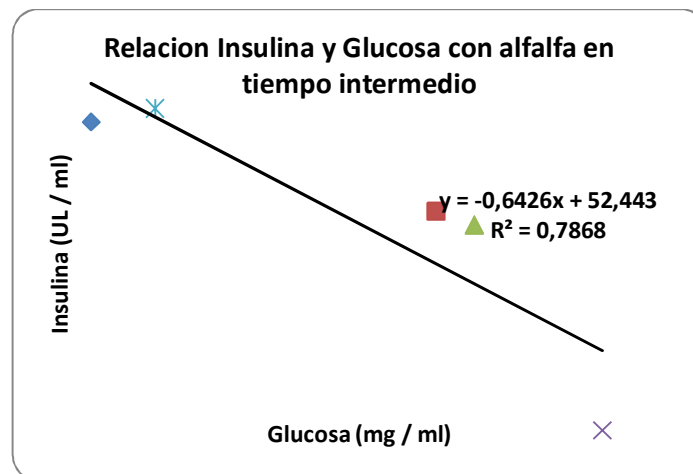


Figura 11. Curva de regresión entre insulina y glucosa para alfalfa en tiempo intermedio

Además se realizó un análisis de correlación para determinar si BUN, insulina o glucosa están relacionadas cada una con estradiol, LH, Triglicéridos, T4, T3, o TSH, con control, alfalfa y trébol rojo.

6.13.2 CORRELACIÓN T3 E INSULINA

Se encontró relación entre T3 y la insulina con alfalfa en el tiempo inicial; el valor p del anova (Anexo 21; $p=0.0103$; $p<0.05$) indica que si hay relación. El coeficiente de correlación es alto ($r = 0.9579$), lo cual indica una relación positiva, donde T3 y la insulina aumentan. El coeficiente de determinación ($r^2 = 91.77\%$) indica que los valores de T3 están explicados en un 91.77% de acuerdo a una relación lineal con los valores de insulina. De acuerdo a la ecuación de regresión: $T3 = -1.726 + 0.116 * \text{Insulina}$, se establece que la T3 aumenta en 0.116 (mmol / L) por cada unidad de insulina (UI / ml) (Figura 11).

Esta relación concuerda con lo publicado por (Morales & Rodriguez, 2005), citando lo reportado por Ekpe y Christophersen en 2000, según lo cual manifiestan que "Los rumiantes muestran respuestas fisiológicas adaptativas cuando son expuestos al frío y a la restricción alimentaria. La exposición al frío, reduce las temperaturas rectales e incrementa los niveles plasmáticos de cortisol, aumenta la tasa metabólica, e incrementa la insulina y la T3, cuando los animales tienen una adecuada ingesta de energía. La restricción alimenticia incrementa los niveles plasmáticos de cortisol, pero reduce la ganancia diaria promedio de peso, la tasa metabólica, el balance energético, la temperatura rectal y los niveles de insulina y T3. Las alteraciones en las respuestas endocrinas pueden estar relacionadas con la provisión de sustratos para usar en la termogénesis, o en la liberación de energía para el mantenimiento. La reducción de la tasa metabólica en los grupos con alimentación restringida, puede ser una adaptación al bajo nivel de energía. La combinación de nutrientes insuficientes con exposición

al frío, puede restringir la productividad de los rumiantes, como se ha demostrado por la reducción del peso de las canales, y hace más susceptibles a los corderos a la hipotermia

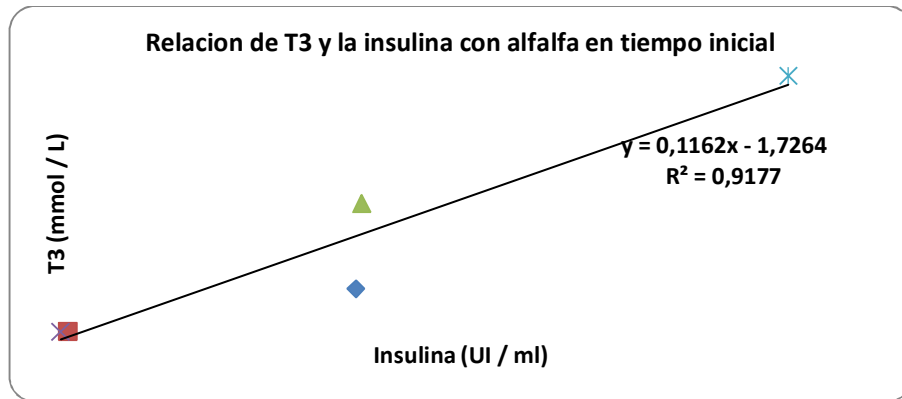


Figura 12. Relación de Triiodotironina con alfalfa en tiempo inicial

6.13.3 CORRELACIÓN TSH E INSULINA

Se encontró relación entre TSH y la insulina con alfalfa en el tiempo final; el valor p del anova (Anexo 22; $p=0.0064$; $p<0.05$) indica que si hay relación. El coeficiente de correlación es alto ($r = 0.9634$), lo cual indica una relación positiva, donde TSH y la insulina aumentan. El coeficiente de determinación ($r^2 = 93.96\%$) indica que los valores de TSH están explicados en un 93.96% de acuerdo a una relación lineal con los valores de insulina. De acuerdo a la ecuación de regresión: $TSH = -5.616 + 0.297 \cdot Insulina$, se establece que la TSH aumenta en 0.297 (ng / ml) por cada unidad de insulina (UI / ml) (Figura 12). Este resultado tiene mucha relación con lo reportado por (Cunningham, 2003), quien manifiesta que las Hormonas tiroideas afectan el metabolismo de los hidratos de carbono de varias formas, entre ellas, el aumento de la absorción de glucosa y su consecuente incremento en el plasma sanguíneo y su movilización hacia la grasa y el músculo. También facilitan la captación celular de glucosa mediada por insulina, en tanto que la formación de glucógeno se facilita

por pequeñas cantidades de Hormonas tiroideas, en tanto que grandes dosis de estas hormonas producen un aumento de la glucogenólisis.

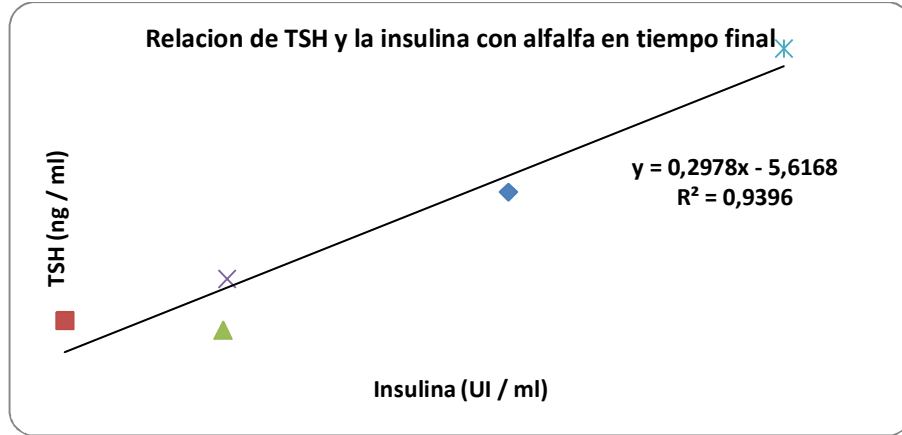


Figura 13. Relación de TSH e insulina en alfalfa en tiempo final

6.13.4 CORRELACIÓN T3 E INSULINA TIEMPO INICIAL

Se encontró relación entre T3 y la insulina en control en el tiempo inicial; el valor p del anova (Anexo 23; $p=0.0212$; $p<0.05$) indica que si hay relación. El coeficiente de correlación es alto ($r = -0.9317$), lo cual indica una relación negativa, donde la insulina aumenta y T3 disminuye. El coeficiente de determinación ($r^2 = 86.80\%$) indica que los valores de T3 están explicados en un 86.8% de acuerdo a una relación lineal con los valores de insulina. De acuerdo a la ecuación de regresión: $T3 = 2.863 - 0.071 \cdot \text{Insulina}$, se establece que la T3 disminuye en 0.071 (mmol/L) por cada unidad de insulina (UI / ml) que aumenta (Figura 13), esto concuerda con lo reportado por (Achmadi & Terashima, 1995) quienes manifiestan que a pesar de que los mecanismos a través de los cuales las hormonas tiroideas influyen en el metabolismo de la energía y proteína, y por consiguiente en el crecimiento y la producción de leche, son complejos y probablemente involucran interacciones con otras hormonas y varias enzimas deiodinasas, se sabe que una reducción en las concentraciones de T3 puede aumentar

la secreción de insulina en los rumiantes y con ello, puede redistribuir los nutrientes, favoreciendo la formación de tejido sobre la producción de leche. Sin embargo, el conocimiento de las acciones de estas hormonas en los rumiantes es difícil, ya que la composición de la dieta puede afectar no sólo a los perfiles de insulina sino también a la actividad de la deiodinasa en el hígado.

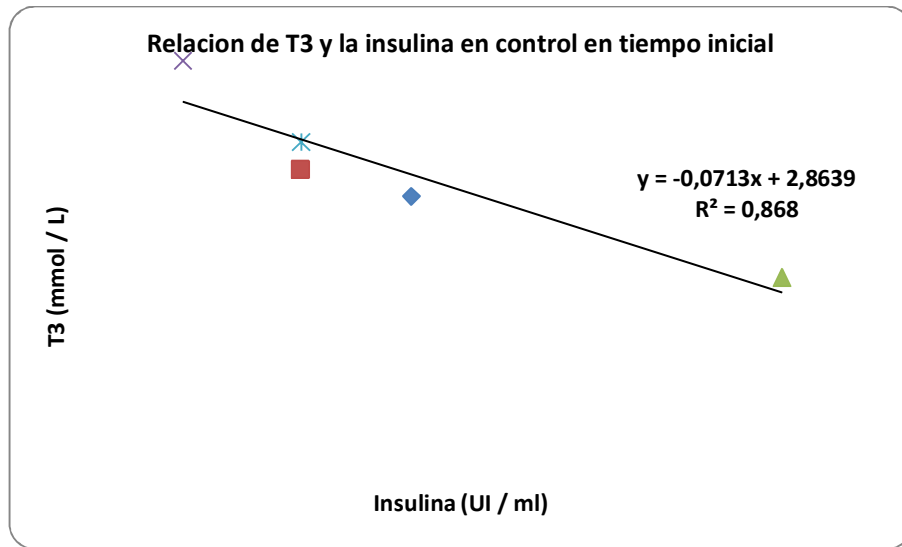


Figura 14. Relación de T3 e insulina en control en tiempo inicial

6.13.5 CORRELACIÓN T3 Y GLUCOSA TIEMPO INICIAL

Se encontró relación entre T3 y la glucosa en control en el tiempo inicial; el valor p del anova (Anexo 24; $p=0.0307$; $p<0.05$) indica que si hay relación. El coeficiente de correlación es alto ($r = 0.9124$), lo cual indica una relación positiva, donde la glucosa aumenta y T3 también. El coeficiente de determinación ($r^2 = 83.25\%$) indica que los valores de T3 están explicados en un 83.25% de acuerdo a una relación lineal con los valores de glucosa. De acuerdo a la ecuación de regresión: $T3 = 2.478 - 0.026 \cdot \text{Glucosa}$, se establece que la T3 disminuye en 0.026 (mmol/L) por cada unidad de glucosa (mg / ml) que aumenta (Figura 14), estos resultados concuerdan con lo reportado por (Contreras, Wittwer, & Ruiz, 1999), quienes

encontraron altos valores de T3 en el período seco, con una caída en los días posteriores al parto, para luego aumentar levemente, lo que sería debido al déficit energético que se presenta al inicio de la lactancia y al paso de hormonas a la glándula mamaria.

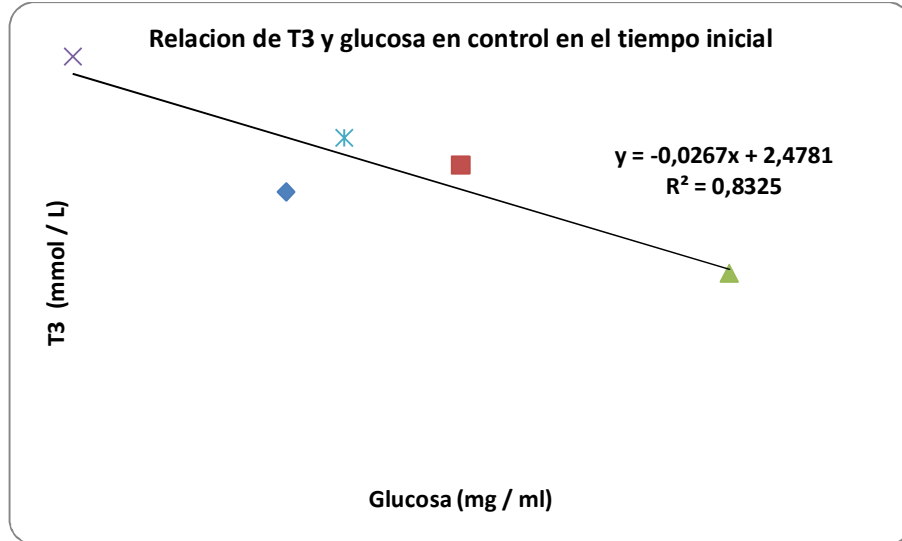


Figura15. Relación de T3 y Glucosa en control en tiempo inicial

6.13.6 CORRELACIÓN TSH Y GLUCOSA EN TIEMPO INICIAL

Se encontró relación entre TSH y glucosa con trébol rojo en el tiempo inicial; el valor p del anova (Anexo 25; $p=0.0138$; $p<0.05$) indica que si hay relación. El coeficiente de correlación es alto ($r = 0.9489$), lo cual indica una relación positiva, donde la glucosa aumenta y TSH también. El coeficiente de determinación ($r^2 = 90.05\%$) indica que los valores de TSH están explicados en un 90.05% de acuerdo a una relación lineal con los valores de glucosa. De acuerdo a la ecuación de regresión: $TSH = - 1.805 + 0.101 * glucosa$, se establece que la TSH aumenta en 0.101 (ng/ml) por cada unidad de glucosa (mg / ml) que aumenta (Figura 15). Este hallazgo concuerda con lo expresado por (Alvarez Calvo, 2008), que sostiene que existe una estrecha relación entre los cambios endocrinos, ya que se observa un incremento

sustancial en la secreción de glucagon, epinefrina, nor-adrenalina, ACTH, TSH, GH y el 3'5 AMP cíclico relacionado siempre con una disminución de los niveles de insulina, además reporta que esta relación puede reducir considerablemente la secreción de gonadotrofinas implicadas directamente en el control de la actividad sexual, pues las hembras pueden presentar con frecuencia trastornos reproductivos, generalmente representados por endometritis, retención placentaria, repeticiones en el número de servicios por concepción, celos silenciosos y anestro posparto.

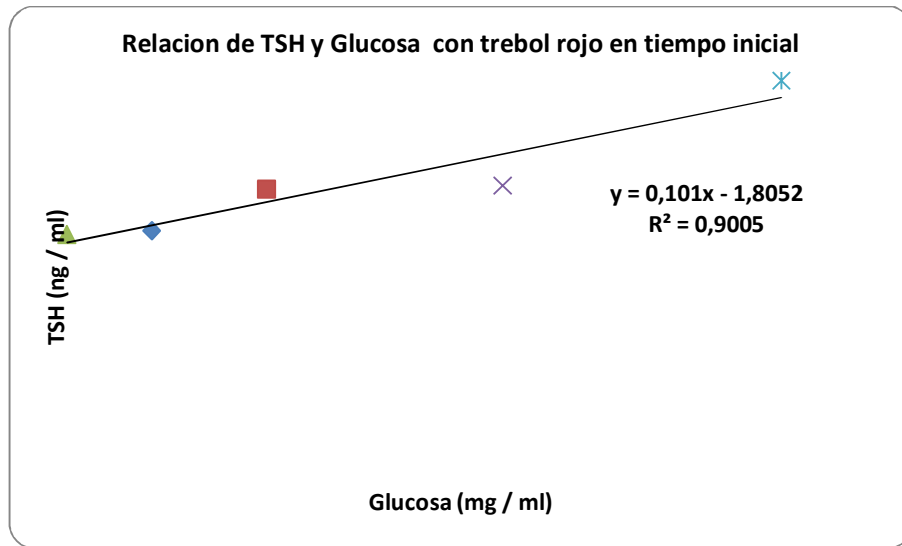


Figura 16. Relación de TSH y Glucosa en trebol en tiempo inicial

6.13.7 CORRELACIÓN TRIGLICÉRIDOS Y GLUCOSA EN TIEMPO FINAL

Se encontró relación entre Triglicéridos y glucosa con trébol rojo en el tiempo final; el valor p del anova (Anexo 26; $p=0.0477$; $p<0.05$) indica que si hay relación. El coeficiente de correlación es moderado ($r = 0.8821$), lo cual indica una relación positiva, donde la glucosa aumenta y triglicéridos también. El coeficiente de determinación ($r^2 = 77.82\%$) indica que los valores de Triglicéridos están explicados en un 77.82% de acuerdo a una relación lineal con

los valores de glucosa. De acuerdo a la ecuación de regresión: Triglicéridos = - 2.979 + 0.089*glucosa, se establece que la Triglicéridos aumenta en 0.089 (mmol/ml) por cada unidad de glucosa (mg / ml) que aumenta (Figura 16), esto concuerda con lo reportado por (Proano, 1989), quien sostiene que la interrupción de la lipogénesis al inicio de la lactancia, aumenta implícitamente la oferta de glucosa, acetato y triglicéridos para la síntesis de leche por la glándula mamaria, esta lipomovilización excesiva puede llevar fácilmente a alteraciones metabólicas patológicas tales como esteatosis, acetonemia y muy seguramente a trastornos reproductivos.

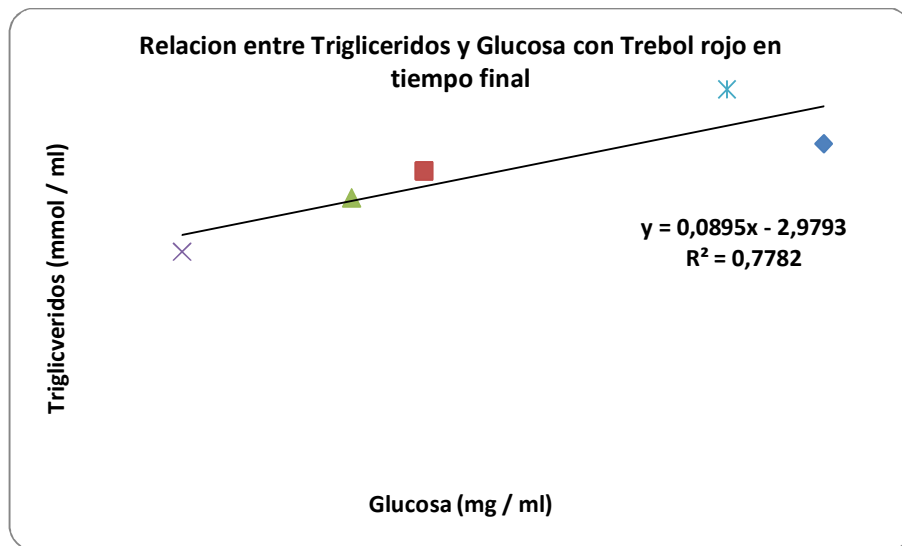


Figura 17. Relación Triglicéridos y glucosa en trébol tiempo final

7. CONCLUSIONES

La reproducción es uno de los aspectos más importantes en una producción de leche y puede estar afectada por muchos factores tanto endógenos como externos al animal, lograr mantener buenos índices reproductivos en dichas explotaciones es verdaderamente difícil, de tal forma que si es posible mejorar el desempeño reproductivo y a su vez productivo, los productores tendrían un gran beneficio pues el control de cualquiera de esos factores se constituiría en una alternativa viable ante una problemática latente. Además de esto, revisar cada uno de los alimentos que consumen los animales como posibles factores que afectan la reproducción es una alternativa supremamente importante, pues los forrajes y los alimentos que reciben a diario las vacas contienen compuestos secundarios que pueden tener algún tipo de efecto positivo o negativo sobre la reproducción.

Además, este proyecto se constituye en el inicio de otros trabajos de investigación donde la nutrición y la reproducción animal verdaderamente están involucradas en pro de alcanzar la eficiencia dentro de los sistemas de producción pecuaria.

Es así como el perfil metabólico sanguíneo aporta gran cantidad de información relacionada con la nutrición y sanidad animal, además permite determinar factores de riesgo, tales como desbalances nutricionales, que pudieran incidir en el desempeño productivo y reproductivo de las vacas productoras, por ende, para el presente estudio se pudo determinar que el contenido de fitoestrogenos en alfalfa y trébol influyen negativamente en el comportamiento reproductivo bovino, debido a que están constituidas por moléculas que simulan la actividad estrogénica lo que conlleva a desórdenes fisiológicos clínicos o subclínicos.

Los niveles de secreción de estradiol en las vacas suplementadas con trébol rojo mostraron un

leve aumento con valores promedio de $2,36 \pm 0,56$ pg/ml y $2,48 \pm 0,44$ pg/ml con un leve descenso hasta $2,25 \pm 0,14$ pg/ml p valor = 0; lo que puede ser indicativo de un efecto asociado con el consumo de trébol rojo.

Por otra parte los niveles de secreción de estradiol en las vacas suplementadas con alfalfa mostraron un leve aumento pasando de $1,89 \pm 0,54$ pg/ml a $2,32 \pm 0,29$ pg/ml que puede ser indicativo de un efecto asociado con el consumo de alfalfa, sin embargo el comportamiento con respecto al consumo de trébol rojo es diferente.

A diferencia de los dos tratamientos experimentales los niveles de secreción de estradiol en las vacas no suplementadas mostraron un aumento considerable a lo largo del experimento iniciando con valores promedios de $1,80 \pm 0,41$ pg/ml hasta alcanzar un pico de $2,83 \pm 0,41$ pg/ml p valor = 0; lo que puede considerarse como un comportamiento relativamente normal de acuerdo a lo reportado por muchos autores mencionados anteriormente.

La identificación de estos patrones fisiológicos, es una base de información importante que sirve como un aporte importante para nuevas investigaciones que permitan ampliar el conocimiento de los factores que afectan la actividad ovárica posparto en las vacas lecheras.

Los niveles de secreción de Hormona Luteinizante (LH) en las vacas suplementadas con trébol rojo mostraron un leve aumento con valores promedio de $2,67 \pm 0,57$ UI/ml, $3,65 \pm 0,60$ UI/ml hasta $3,7 \pm 0,57$ UI/ml p valor = 0; sin embargo no se alcanzaron picos más elevados que representaran una actividad ovárica importante.

Por otra parte los niveles de secreción de LH en las vacas suplementadas con alfalfa también

se observa un aumento que va de $3,47 \pm 1,07$ UI/ml hasta $3,94 \pm 0,67$ UI/ml p valor = 0; sin embargo el comportamiento con respecto al consumo de trébol rojo fue muy similar.

A diferencia de los dos tratamientos experimentales los niveles de secreción de LH en las vacas no suplementadas mostraron un comportamiento similar presentando un aumento considerable a lo largo del experimento iniciando con valores promedios de $2,87 \pm 0,87$ hasta $6,65 \pm 0,87$ UI/ml; sin embargo a pesar del comportamiento más o menos normal de acuerdo a lo reportado por muchos autores mencionados anteriormente, la tendencia fue similar a la de los tratamientos experimentales.

Con respecto al valor de triglicéridos en sangre el comportamiento fue muy similar entre los tratamientos y el control, sin embargo los valores reportados para las vacas que no recibieron ningún tipo de suplementación estuvieron muy por encima de los valores de referencia para este tipo de animales, en tanto que los que recibieron suplementación con alfalfa tuvieron valores muy cercanos a los valores de referencia y los animales suplementados con trébol rojo tuvieron un valor intermedio, lo que nos puede indicar que seguramente la suplementación no tuvo un efecto muy marcado en los valores de triglicéridos a pesar de que los valores del tratamiento control fueron superiores a los valores de los tratamientos experimentales.

Los niveles de secreción de Tiroxina (T4) en las vacas suplementadas con trébol rojo mostraron un leve aumento con valores promedio de $88,8 \pm 24,63$ mmol/l alcanzando valores máximos de $97,8 \pm 10,7$ mmol/l p valor = 0; lo que puede ser indicativo de un efecto asociado con el consumo de trébol rojo.

Por otra parte los niveles de secreción de T4 en las vacas suplementadas con alfalfa mostraron un leve descenso a lo largo del experimento, desde $88,8 \pm 4,65$ mmol/l hasta

85,4±13,4 mmol/l pvalor = 0; lo que puede ser indicativo de un efecto asociado con el consumo de alfalfa, sin embargo el comportamiento con respecto al consumo de trébol rojo fue diferente, lo que nos permite concluir que la presencia de algunos compuestos como el coumestrol en la alfalfa puede provocar una disminución en los valores de T4 en vacas lecheras, sin embargo el comportamiento fue similar con respecto a las vacas que no recibieron suplementación cuyos niveles de T4 mostraron valores similares a lo largo del experimento presentando valores promedios de 68,6±37,8 mmol/l hasta 85±9,24 mmol/l que puede considerarse como un comportamiento más o menos normal de acuerdo a lo reportado por muchos autores mencionados anteriormente.

Los niveles de secreción de Triyodotironina (T3) en las vacas suplementadas con trébol rojo mostro un comportamiento similar durante todo el experimento con valores promedio de 1,3±0,22 mmol/l pvalor = 0; lo que al parecer nos indica que la suplementación no tuvo ningún efecto sobre los niveles de T3.

Por otra parte los niveles de secreción de T3 en las vacas suplementadas con alfalfa mostraron un leve descenso a lo largo del experimento, desde 1,3±0,25 mmol/l hasta 1,06±0,16 mmol/l; lo que puede ser indicativo de un efecto asociado con el consumo de alfalfa, observándose que el comportamiento con respecto al consumo de trébol rojo fue diferente, lo que nos permite concluir que la presencia de algunos compuestos como el coumestrol en la alfalfa puede provocar una disminución en los valores de T3 en vacas lecheras, igualmente el comportamiento fue también diferente con respecto a las vacas que no recibieron suplementación cuyos niveles de T3 mostraron valores similares a lo largo del experimento observándose valores de 1,3±0,29 mmol/l, 1,36±0,16 mmol/l y 1,36±0,24 mmol/l pvalor = 0. Lo que nos puede indicar que los valores de T3 solo tuvieron variaciones con el consumo de alfalfa.

En cuanto a los valores de insulina y glucosa en las vacas que recibieron suplementación con trébol rojo y las que no recibieron suplementación tuvieron un comportamiento muy similar con valores muy parecidos, sin embargo las vacas que recibieron una suplementación con alfalfa tuvieron una leve disminución con valores de insulina de $26,05 \pm 2,10$ UI/l hasta promediar valores en el experimento de $23,24 \pm 1,24$ UI/l, lo cual se asemeja al comportamiento de los valores para la glucosa, observándose que pasaron de $50,48 \pm 4,6$ mg/dl hasta $43,02 \pm 2,3$ mg/dl a, lo cual nos puede indicar que la suplementación con alfalfa tuvo un efecto sobre estos valores y seguramente sobre su comportamiento reproductivo pues ninguna de las vacas que consumieron alfalfa mostro signos evidentes de celo en los primeros 60 días post parto, en tanto que 4 de las 5 vacas del grupo que no recibieron suplementación presentaron un primer celo hacia los 45 días post-parto, y solo una de las suplementadas con trébol rojo mostro signos de celo.

En cuanto a los niveles de Nitrógeno ureico en sangre, las vacas que no recibieron suplementación presentaron niveles muy similares durante la fase experimental de $22,2 \pm 7,12$ mg/dl, $22,6 \pm 4,3$ mg/dl y $22,8 \pm 2,5$ mg/dl, en tanto que las vacas que recibieron suplementación con trébol o alfalfa tuvieron niveles que aumentaron durante la fase experimental desde $17,4 \pm 2,7$ mg/dl hasta $25,4 \pm 2,8$ mg/dl para las vacas suplementadas con trébol rojo y de $20,6 \pm 3,2$ mg/dl hasta $25,8 \pm 1,3$ mg/dl en las vacas que recibieron suplementación con alfalfa lo que nos deja ver que la suplementación si afecto estos valores los cuales terminaron muy por encima de lo normal para vacas en producción lo que podría explicar en parte el comportamiento reproductivo de estos 2 grupos de vacas.

BIBLIOGRAFÍA

- Achmadi, J., & Terashima, Y. (1995). The effect of propylthiouracil-induced low thyroid function on secretion response and action of insulin in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 12, 157-166.
- Akar, Y., & Yildiz, H. (2005). Concentrations of Some Minerals in Cows with Retained Placenta and Abortion. *J Vet Anim Sc*, 1157-1162.
- Alvarez Calvo, J. (2008). *Bioquímica Nutricional y metabólica del bovino en el tropico*. Medellín, Antioquia: Universidad de Antioquia.
- Anzola Vasquez, H. J. (2004). La Biotecnología en la reproducción animal. *ICA Informa*.
- Aranda, M., Brave, N., & Casagrande, R. (2002). www.produccion-animal.com.ar. Recuperado el 3 de abril de 2013, de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/26-colesterol_en_bovinos.pdf
- Arias, J., & Nesti de Alonso, A. (1999). Importancia de los niveles de Nitrogeno ureico en leche y sangre en el ganado lechero. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia*, 553-561.
- Bach, A. (08 de 06 de 2004). *a reproducción del vacuno lechero: nutrición y fisiología. XVII Curso de Especialización FEDNA. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. (online)*. Recuperado el 15 de 11 de 2012, de www.fedna.com: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/2001CAPV.pdf>. 2001
- Baez Sandoval, G. M. (Diciembre de 2010). Relaciones hormonales y dinámica folicular durante el periodo postparto en vacas sanmartinero. *Tesis maestría*. Bogota.
- Baez, G., Grajales, H., & Perez, J. (Septiembre de 2007). Caracterización del ciclo estral mediante perfiles de esteroides (progesterona, 17 β -estradiol) en la raza Costeño con cuernos (*Bos taurus*) en el trópico Colombiano. *Livestock Research for Rural Development*, 19(9).
- Baker, J. (1996). Effects of IGF1 gene null mutation on mouse reproduction. *Molecular Endocrinology*, 9036918.
- Bauman, D., & Currie. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, 151461529.
- Bayer, H. C. (2005). *Manuales de ensayos de ADVIA centaur*. Mumbai: Bayer Cropscience.
- Benny, E. K. (1976). Coumestrol content of fractions obtained during wet processing of alfalfa. *Agricultural research service*, 1177-1180.
- Bowen, R. (2010). Mechanism of Action and Physiologic Effects of Thyroid Hormones. *vivo colostated edu*, 1-7.
- Browning, R. J., Robert, B., Lewis, A., Neuendorff, D., & RD., R. (1994). Effects of postpartum nutrition and once-daily suckling on reproductive efficiency and preweaning calf performance in fall-calving Brahman (*Bos indicus*) cows. *Journal of Animal Science*, 72, 984-989.
- Burdette, J. E., Liu, J., Lantvit, D., Lim, E., Booth, N., Bath, K., y otros. (2002). Trifolium pratense (Red Clover) Exhibits Estrogenic Effects In Vivo in Ovariectomized Sprague-Dawley Rats. *Journal of nutrition*, 132, 27-30.
- Butler, S., Pelton, S., & y Butler, W. (2004). Insulin increases 17 β estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction*, 27, 537-545.

- Campos Gaona, R., & Hernandez, E. (2008). Relación Nutrición fertilidad en bovinos, un enfoque Bioquímico y fisiológico. *Un enfoque hacia el entendimiento de los mecanismos fisiológicos, nutricionales y bioquímicos de las limitantes reproductivas de origen nutricional*. (pág. 57). Palmira: Universidad Nacional.
- Canfield, R., & Butler, W. (1991). Energy balance first ovulation and the effects of naloxone on LH secretion in early postpartum dairy cows. *J. Anim. Sci*, 740-760.
- Carrão-Panizzi, M. C., Favoni, S., & Kikuchi, A. (2002). Extraction time for soybean isoflavone determination. *Extraction ti Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4), 515-518.
- Church, D., & Pond, W. (2002). *Fundamentos de Nutricion Animal*. Wiley.
- Clarke, I. J., & Henry, B. (1999). Leptin and reproduction. *Revista de Reproducción*, 4, 48-55.
- Contreras, P. (1998). Síndrome de movilización grasa en vacas lecheras al inicio de la lactancia y sus efectos en salud y producción de los rebaños. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 30(2).
- Contreras, P., Wittwer, F., & Ruiz, V. (1999). Valores sanguíneos de triyodotironina y tiroxina en vacas frisón negro a pastoreo. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 205-210.
- Cravero, B., Pardini, C., Mina, R., Carrizo Bosio, M., Rodriguez, V., Misiunas, S., y otros. (5 de 10 de 2011). *Efecto del suministro de sales aniónicas en el parto de vacas lecheras en pastoreo de alfalfa*. Recuperado el 12 de abril de 2012, de <http://www.archives.mx/espanol/-vaca.agro.uncor.edu>
- Cunningham, J. (2003). *Fisiologia Veterinaria*. Madrid: Madrid: Elsevier Saunders.
- Diaz-Yamal, I., & Munevar-Vega, L. (2009). Fitoestrogenos: Revisión de tema. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecologia*, 60(3), 274-280.
- Dubey, R. (2000). Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of estradiol on vascular smooth muscle cells via estrogen receptor-independent mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27-33.
- Elizondo, J. (2002). Estimación lineal de los requerimientos nutricionales del NRC para ganado de leche. *Agronomia Mesoamericana*, 13(1), 41-44.
- Espinosa, J., Soto, A., Denes, J., & Hernandez, M. (2008). Receptores a estrógenos α y β en células normales y cancerígenas. (U. Veracruzana, Ed.) *La Ciencia y el Hombre*, XXI(1), 39-44.
- Espinoza, J. L., Perez, R. O., Espinosa, A. P., Mendez, J. V., & Flores, C. F. (Febrero de 2007). *Ovarian follicular growth in domestic animals: a review/Crecimiento folicular ovarico en animales domesticos: una revision/Crescimento folicular ovariano em animais domesticos*. Recuperado el 12 de abril de 2012, de HighBeam Research: <http://www.highbeam.com/doc/1G1-160811056.html>
- Fernandez Idrogo, G. (12 de 9 de 2009). *El periodo de transición en la vaca lechera*. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca.
- Folman, Y., Rosenberg, M., Ascarelli, I., Kaim, M., & Herz, Z. (19 de 07 de 1983). The effect of dietary and climatic factors on fertility, and on plasma progesterone and oestradiol-17 beta levels in dairy cows. *Journal of Steroid Biochemistry*, 19(1), 863-868.
- Friedman, J., & Halaas, J. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 763-770.
- Gallegos de la Hoya, M. (21 de 09 de 2010). *Engormix*. Recuperado el 12 de Abril de 2012, de <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/genetica/articulos/causas-infertilidad-bovinos-lecheros-t3136/103-p0.htm>
- Garverick, H., & Smith, M. (1993). Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. *Veterinarian Clinic North American Food Animal Practice*, 9, 223-247.

- Gil, L. (1984). Actividad fito-estrogénica del trébol blanco in vitro e in vivo y su fluctuación en relación a variables climáticas, estado metabólico y fermentación ruminal. *Turrialba*, 147-156.
- Gluckman, P. (1996). Fetal insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II are regulated differently by glucose or insulin in the sheep fetus. *Reproduction, Fertility and Development*, 167 - 172.
- Goicochea, J., Palomares, R., Ondis, A., Sandoval, J., Gonzalez, D., & Soto, E. (2005). Efecto de dos protocolos hormonales a base de progesterona sobre la tasa de ovulación y ocurrencia de celos anovulatorios en vacas mestizas tropicales. *Revista científica- FCV-Luz*, XV(3), 242-251.
- Grummer, R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci*, 2820-2833.
- Hafez, E. (2003). *Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales*. Mexico D.F., Mexico, D:F., Mexico: Interamericana, McGraw-Hill.
- Heitzmann, R. (1986). Agentes anabólicos en animales domesticos. En J. Bogan, P. Lees, & A. Yoxall, *Bases Farmacologicas de medicina en grandes especies* (págs. 317-336). Mexico: PLM.
- Henao, G., Trujillo, L., Vasquez, J., & Rua, L. (2002). Actividad Ovárica durante el postpartotemprano de vacas cebu en amamantamiento. *Revista Facultad Nacional Agropecuaria Medellin*, 55(1), 1441-1445.
- Hernandez, J., Zarco, A., & Lima, V. (1993). Incidence of delayed ovulation in Holstein heifers and its effects on fertility and early luteal function. *Theriogenology*, 40, 1073-1081.
- Hess, H., Flórez, H., González, E., & Avila, M. (1999). Efecto del nivel de nitrógeno amoniacal en el rumen sobre el consumo voluntario y la digestibilidad in situ de forrajes tropicales. *Pasturas tropicales*, 21(1), 43-49.
- Hoggard, N., & Hunter, L. (1997). Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 11073-11078.
- Hong, Y., Wang, S., Hsu, C., Lin, B., Kuo, Y., & Huang, C. (2011). Phytoestrogenic compounds in alfalfa sprout (*Medicago sativa*) beyond coumestrol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 131(7), 1021-1029.
- Houseknecht, K. (1998). The biology of leptin: a review. *Journal of animal science*, 1405-1420.
- Huber-Buchholz. (1999). Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 147061474.
- Hussain, I., & Cheeke, P. (1995). Yucca extract and rumen nitrogen. *Enclosure code SC3.3. Alltech Inc.*
- Kumar, B., & Francis, S. (1998). Expression of obese mRNA in genetically lean and fat selection lines of sheep. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 5436548.
- Ladenheim, R. G. (1984). Insulin action and characterization of insulin receptors in rat luteal cells. *Endocrinology*, 115-752.
- Lenis Sanin, Y. Y., Gutierrez Gomez, M. T., & Tarazona Morales, A. M. (2010). Efectos de los Fitoestrógenos en la Reproducción Animal. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5555-5565.
- Leon, J., & Mojica, J. (2007). Balance de nitrógeno y fósforo de vacas lecheras en pastoreo con diferentes ofertas de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y suplementadas con ensilaje de avena (*Avena sativa*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 615-616.

- Lluen, B. (10 de 12 de 2008). *UPG Veterinaria*. Recuperado el 2 de 4 de 2012, de http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/infertilidad_lluen.pdf
- Lopez, H., Satter, L., & Wiltbank, M. (2004). Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, *81*, 209 - 223.
- Ludueña, B., Mastandrea, C., Chichizola, C., & Franconi, M. C. (2007). Isoflavonas en soja, contenido de daidzeina y genisteina y su importancia biológica. *Bioquímica y Patología Clínica*, *71*(1), 55-66.
- Mann, G. E., & Lamming, G. (2009). The Influence of Progesterone During Early Pregnancy in Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, *34*(3-4), 269-274.
- Marais, J. (2001). Factors affecting the nutritive value of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*). *Tropical grasslands*, 65-84.
- Martinez, P., Aguirre, M., Martinez, P., & Torres, H. (2006). Comportamiento productivo y reproductivo de tres genotipos bovinos en la región del soconusco. *Zootecnia Tropical*, *24*(2), 109-120.
- Matamoros, R., Gomez, C., & Andaur, M. (2002). Hormonas de utilidad diagnóstica en Medicina Veterinaria. Archivos de Medicina Veterinaria. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *XXXIV*, 167-182.
- Matamoros, R; Contreras, P; Wittwer, F, Mayorga, M. (2003). Hipotiroidismo en rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 1-11.
- McGarvey, C., & Cates., A. (2001). Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology*, 1202-1208.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Federacion Colombiana de Ganaderos. (5 de Enero de 2011). *Proexport Colombia*. Recuperado el 12 de marzo de 2012, de http://www.botschaft-kolumbien.de/descargas_proexport/berlin_2011/espanol/inversion/agroindustria/perfil_lacteo.pdf
- Morales, C., & Rodriguez, N. (2005). Hormonas tiroideas en la reproducción y en la producción láctea del ganado lechero: revisión de literatura. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 136-148.
- Morales, S., Hernandez, J., Rodriguez, G., & Peña, R. (2000). Comparación del porcentaje de Concepción y la función lútea en vacas de primer servicio, vacas repetidoras y vaquillas Holsteín. *Veterinaria Mexico*, *31*(3), 11-18.
- Muñoz, R., Murillo, A., Perez, J., & A, C. (2002). Parámetros reproductivos en vacas Holsteín alimentadas con alfalfa altas en coumestrol. *Archivos de Zootecnia*, *51*, 373-376.
- Orisaka, M., Tajima, K. B., & Kotsuji, F. (2009). Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research*, *2*(9), 4-7.
- Perea, F., Gonzalez, R., Cruz, R., Soto, E., Rincon, E., Gonzalez, C., y otros. (1998). Evaluación Ultrasonográfica de la dinámica folicular en vacas y novillas mestizas. *Revista Científica, FCV- Luz*, *VIII*(1), 14-24.
- Pérez, J. R., & Aguilar, Á. S. (2007). los fitoestrógenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas de animales domésticos. *Agricultura Técnica*, 325-331.
- Pérez-Rivero, j., Aguilar-Setién, A., Martínez-Maya, J., Pérez-Martínez, M., & Serrano, H. (Septiembre de 2007). Los Fitoestrógenos y el Efecto de su Consumo en Diferentes Órganos y Sistemas de Animales Domésticos. *Agricultura Técnica*, *67*(3), 325-331.
- Peters, A., & Ball, P. (1995). Reproduction in cattle. *Blackwell Science, Oxford*, 106-126.

- Pike, A., Brzozowski, A., Hubbard, R., & Bonn, T. (1999). Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *The EMBO Journal*, 18 (17), 4608-4618.
- Plaizier, J. (1993). Validation of the FAO/IAEA RIA Kit for the measurement of progesterone in skim milk and blood plasma. En A. Programmes organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. IAEA. Viena, *FAO/IAEA/DGIS Co-ordinated Research*. Viena Austria: FAO.
- Ponce, P. (mayo - agosto de 2009). *Un enfoque critico de la lecheria Internacional y cubana*. Recuperado el 12 de marzo de 2012, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2009000200002&script=sci_arttext
- Proano, D. (1989). *Effecto de la suplementación energética en vacas frisonas bajo pastoreo rotacional*. Zaragoza: INPA.
- Rajala-Schultz, P., Saville, W., Frazer, G., Wittum, & T.E. (February de 2001). Association Between Milk Urea Nitrogen and Fertility in Ohio Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 84(2), 482-489.
- Rayssiguier, Y., Gueux, E., & Cseh, S. (1993). Efecto de la hipomagnesemia sobre la fluidez de las membranas. *Archivos de Medicina Veterinaria*, XXV(1), 31-37.
- Razz, R., & Clavero, T. (2004). Niveles de Urea, Fosforo, Glucosa e Insulina de vacas en ordeño suplementadas con concentrado en un sistema de Panicum maximum y Leucaena Leucocephala. *Revista Científica, FCV-LUZ, XIV(4)*, 365-369.
- Rhodes, F., McDougall, S., Burke, C., Verkerk, G., & Macmillan, K. (2003). treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *Journal of dairy Science*, 86, 1876-1918.
- Rifa, i. N., & Bachorik, P. (1998). *lipoproteins and apolipoproteins*. California: Ashwood ER.
- Rivas, P., Suarez, A., & Ramirez, E. (2011). *Revista de Medicina Veterinaria (online)*. Recuperado el 13 de 03 de 2013, de <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542011000100012&lng=en&nrm=iso>
- Roberts, A., & Skinner, M. (1990). Estrogen regulation of thecal cell steroidogenesis and differentiation: thecal cell-granulosa cell interactions. *Endocrinology*, 127, 2918 - 2929.
- Roche, J., & Boland, M. (1991). Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive status. *Theriogenology*, 81-90.
- Ruiz, A., Dominguez, C., Martinez, N. P.-S., Drescher, K., Perez, R., Rojas, J., y otros. (2010). Efecto de la condición corporal y nivel de alimentación sobre la actividad ovarica, involución uterina y expresión de IGF-1 en vacas mestizas durante el postparto. *Interciencia*, 35(10), 752-758.
- Ruiz, J., Uribe, L., & Osorio, J. (2011). Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina. *Veterinaria Zootecnia*, 5(2), 68-81.
- Sanchez, J. (2000). Nutrición Energetica del Ganado lechero. *Nutrición Animal Tropical*, 97-127.
- Sanchez, M., Gonzalez, C., Castañeda, R., Pulido, A., Guaqueta, H., Aranda, M., y otros. (2011). Evaluación citológica y microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos (estudio preliminar). *Revista MVZ Córdoba*, 16(3), 2711-2720.
- Sangsrivavog, S., Combs, D., Sartori, R., & Armentano, L. W. (2002). High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 a in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85, 2831-2842.

- Schuster, G., & Piacenza, M. (2008). <http://agro.unc.edu.ar/nutri/pdf>. Recuperado el 13 de abril de 2012, de unc: <http://agro.unc.edu.ar/nutri/pdf>
- Sivesind, E., & Seguin, P. (2005). Effects of the Environment, Cultivar, Maturity, and Preservation Method on Red Clover Isoflavone Concentration. *Journal of Agricultural and Food Science*, 53(16), 6397-6402.
- Spicer, L. J. (1993). Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *Journal of animal science*, 1232-1241.
- Spicer, L., Alonso, J., & Chamberlain, C. (Mayo de 2001). Effects of Thyroid Hormones on Bovine Granulosa and Thecal Cell Function In Vitro: Dependence on Insulin and Gonadotropins. *Journal of Dairy Science*, 84(5), 1069-1076.
- Van Saun, R. (1999). Dry cow nutrition: key to improving fresh cow performance. *Dairy Nutrition Management. Veterinarian Clinical North American Food Anim Practice*, 599.
- Vigia. (Mayo de 12 de 2008). *Nutricion Animal, Nutricion Y Fertilidad De Los Rumiantes*. Recuperado el 6 de Abril de 2013, de nutrición_y_fertilidad_de_los_rumiantes: <http://www.eprofesional.com.ar/losreyunos/vigia/>
- Vizcarra, J., Wettemann, R., Braden, T., Turzillo, A., & Nett, T. (1997). Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, GnRH receptors, and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in cows. *Endocrinology*, 138(2), 594-601.
- Whitten, P. L., & Patisaul, H. (2001). Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environmental Health Perspectives*, 109(S1), 5-20.
- Whitten, P., Patisaul, H., & Young, L. (2002). Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(1), 47-54.
- Williams, H., Brenner, S., & Venkatesh, B. (2002). Identification and analysis of additional copies of the platelet-derived growth factor receptor and colony stimulating factor 1 receptor genes in fugu. *Gene*, 295(2), 255-264.
- Zárate, J. P., Vinay, J. C., Carballo, O. C., Hernández, V. D., & Villagómez, E. (2011). Efecto de la alimentación con grasas protegidas en vacas de doble propósito. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 359-366.

	1 (Trébol rojo inicial)	(Trébol rojo intermedio)	(Trébol rojo final)	(alfalfa inicial)	(alfalfa intermedio)	2 (alfalfa final)	(Control Inicial)	(Control Intermedio)	o 3 (Control final)
1	2,33	3,23	3,22	2,25	3,29	3,32	4,22	6,22	7,23
2	2,18	3,17	3,28	2,34	3,18	3,23	2,21	4,19	5,29
3	3,24	4,28	4,33	4,19	4,72	4,19	2,24	5,31	6,26
4	2,27	3,23	3,35	4,27	4,26	4,21	3,3	6,29	7,2
5	3,35	4,34	4,32	4,32	4,25	4,17	2,4	5,3	7,3

Anexo 3. Perfiles de hormona luteinizante (LH) durante la suplementación

TRIGLICERIDOS mmol/L (VALOR DE REFERENCIA 0-0,2 mmol/L)									
Vaca No.	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
1	0,19	0,25	0,23	0,11	0,15	0,16	0,3	0,4	0,41
2	0,25	0,34	0,36	0,16	0,17	0,2	0,21	0,35	0,33
3	0,2	0,21	0,26	0,21	0,27	0,25	0,4	0,37	0,35
4	0,41	0,45	0,48	0,24	0,24	0,26	0,2	0,3	0,33
5	0,2	0,23	0,29	0,19	0,23	0,22	0,5	0,53	0,54

Anexo 4. Perfil de Triglicéridos durante la suplementación

T4 TOTAL mmol/L VALOR DE REFERENCIA 57-119									
Vaca No.	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
1	68	69	85	88	94	91	80	71	91
2	123	110	90	85	70	75	64	97	91
3	103	93	110	95	99	66	11	65	80
4	86	80	97	84	92	93	72	84	71
5	64	97	107	92	72	79	116	126	92

Anexo 5. Perfil de Tiroxina (T4) total durante la suplementación

INSULINA (ELISA INDIRECTA 1 HORA DE INCUBACION) UI/ml VALOR DE REFERENCIA 0-200									
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Vaca No.	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
1	23,25	24,33	25,2	26,26	24,18	26,34	22,19	25,33	25,26
2	19,28	24,26	20,32	24,22	23,32	23,2	20,35	19,3	20,29
3	33,34	26,35	24,3	26,3	23,19	24,32	28,31	29,2	28,23
4	24,18	27,32	31,18	24,17	21,21	24,35	18,42	22,19	22,26
5	21,24	28,19	31,34	29,32	24,31	28,29	20,37	24,26	24,2

Anexo 6. Perfil de insulina durante la suplementación

T3 TOTAL mmol/L VALOR DE REFERENCIA 0,8-1,8									
Vaca No.	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
1	1,7	1,1	1,4	1,2	0,9	1,1	1,2	1,3	1,1
2	1,2	0,9	1,3	1,1	1,2	1,1	1,3	1,1	1,5
3	1,4	1,5	1,2	1,4	0,9	0,9	0,9	1,5	1,4
4	1,3	1,2	1	1,1	1,1	0,9	1,7	1,7	1,5
5	0,9	1	1,6	1,7	1,3	1,3	1,4	1,2	1,3

Anexo 7. Perfil de Triyodotironina (T3) total durante la suplementación

TSH (ELISA INDIRECTA 4 HORAS DE INCUBACION) ng/ml VALOR DE REFERENCIA 0-80									
Vaca No.	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
1	2,38	2,44	2,32	2,38	1,38	2,14	1,98	2,22	5,16
2	2,72	1,42	2,58	2,34	1,91	1,46	2,2	1,9	5,54
3	2,35	2,22	1,99	1,82	1,33	1,41	1,84	3,35	5,51
4	2,75	3,14	3,05	1,41	1,19	1,68	2,52	1,74	5,67
5	3,61	2,45	2,56	2,86	1,27	2,9	1	3,31	4,74

Anexo 8. Perfil de la Hormona estimulante de la tiroides (TSH) durante la suplementación

GLUCOSA mg/ml VALOR DE REFERENCIA 45-75									
Vaca No.	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
1	41,9	48,3	50,5	51,3	43,4	41,8	40,3	60,8	64,1
2	43,8	47,7	47,2	56,8	46,1	43,4	47,5	43,9	48,5
3	40,5	46,4	46,6	46,3	46,4	46,9	58,6	48,9	56,2
4	47,7	51,4	45,2	45,6	47,4	41,4	31,5	44,9	46,3
5	52,3	52,9	49,7	52,4	43,9	41,6	42,7	53,7	50,7

Anexo 9. Perfil de glucosa durante la suplementación

BUN mg/ml VALOR DE REFERENCIA 20-30									
Vaca No.	Tratamiento 1 (Trébol rojo inicial)	Tratamiento 1 (Trébol rojo intermedio)	Tratamiento 1 (Trébol rojo final)	Tratamiento 2 (alfalfa inicial)	Tratamiento 2 (alfalfa intermedio)	Tratamiento 2 (alfalfa final)	Tratamiento 3 (Control Inicial)	Tratamiento 3 (Control Intermedio)	Tratamiento 3 (Control final)
1	16	25	24	19	27	24	18	20	21
2	14	23	21	18	26	24	17	19	22
3	17	26	28	18	25	23	17	21	20
4	19	26	27	25	27	26	33	30	25
5	21	25	27	23	24	25	26	23	26

Anexo 10. Perfiles de BUN durante la suplementación

Source	Sum of squares	Df	Mean square	F-ratio	P-value
Between groups	204,547	8	25,5684	1,153	0
Within groups	79,8065	36	2,21685		
Total (Corr.)	284,354	44			

Anexo 11. ANOVA Table for Estradiol by Tratamiento

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,748832788	2	0,37441639	6,94	0,0499
With ingroups	3,905490768	4	0,97637269		
Total (Corr.)	4,654323556	6			

Anexo 12. ANOVA Table for Progesterona by Tratamiento

source	sum of squares	df	mean square	f-ratio	p-value
Between groups	63,6726	8	7,95907	13,92	0
With ingroups	20,5835	36	0,571763		
Total (Corr.)	84,2561	44			

Anexo 13. ANOVA Table for LH by Tratamiento

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,23544	8	0,02943	3,97	0,0019
With ingroups	0,26704	36	0,00741778		
Total (Corr.)	0,50248	44			

Anexo 14. ANOVA Table for Trigliceridos by Tratamiento

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2536,31	8	317,039	0,84	0,576
With ingroups	13625,6	36	378,489		
Total (Corr.)	16161,9	44			

Anexo 15. ANOVA Table for T4 by Tratamiento

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,555111	8	0,0693889	1,29	0,2793
With ingroups	1,936	36	0,0537778		
Total (Corr.)	2,49111	44			

Anexo 16. ANOVA Table for T3 by Tratamiento

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	90,0739	8	11,2592	0,99	0,4585
With ingroups	408,561	36	11,3489		
Total (Corr.)	498,635	44			

Anexo 17. ANOVA Table for Insulina by Tratamiento

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	50,1886	8	6,27358	21,44	0
With ingroups	10,534	36	0,292611		
Total (Corr.)	60,7226	44			

Anexo 18. ANOVA Table for TSH by Tratamiento

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	468,147	8	58,5184	2	0,0747
With ingroups	1053,54	36	29,2649		
Total (Corr.)	1521,68	44			

Anexo 19. ANOVA Table for Glucosa by Tratamiento

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	287,244	8	35,9056	3,02	0,0107
Within groups	428,4	36	11,9		
Total (Corr.)	715,644	44			

Anexo 20. ANOVA Table for BUN by Tratamiento

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	4,84509	1	4,84509	11,07	0,0448
Residual	1,31319	3	0,437731		
Total (Corr.)	6,15828	4			

Anexo 21. Analysis of Variance Glucosa . insulina alfalfa intermedio

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0,23859	1	0,23859	33,43	0,0103
Residual	0,0214102	3	0,00713675		
Total	0,26	4			

Anexo 22. Analysis of Variance. T3 y la insulina tiempo inicial

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1,44524	1	1,44524	46,7	0,0064
Residual	0,0928363	3	0,0309454		
Total (Corr.)	1,53808	4			

Anexo 23. Analysis of Variance. THS y la insulina tiempo inicial

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0,295113	1	0,295113	19,72	0,0212
Residual	0,0448874	3	0,0149625		
Total (Corr.)	0,34	4			

Anexo 24. Analysis of Variance. T3 y la insulina en tiempo inicial

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0,283045	1	0,283045	14,91	0,0307
Residual	0,0569545	3	0,0189848		
Total (Corr.)	0,34	4			

Anexo 25. Analysis of Variance. T3 y glucosa

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0,933483	1	0,933483	27,14	0,0138
Residual	0,103197	3	0,0343989		
Total (Corr.)	1,03668	4			

Anexo 26. Analysis of Variance. THS glucosa Trebol rojo tiempo inicial

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0,155645	1	0,155645	10,53	0,0477
Residual	0,0443553	3	0,0147851		
Total (Corr.)	0,2	4			

Anexo 27. Analysis of Variance. Trigliceridos y glucosa con trébol rojo en tiempo final