

**A. Fernández-Foren, J.A. Abecia, M.I. Vázquez, F. Forcada, I. Sartore,
M. Carriquiry, A. Meikle y C. Sosa**

**RESTRICCIÓN ALIMENTICIA EN OVINOS: RESPUESTA ENDOCRINO-
METABÓLICA DEPENDIENTE DE LAS RESERVAS CORPORALES**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **107** N.º 4 (257-271), 2011

Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales

A. Fernández-Foren*, J.A. Abecia**, M.I. Vázquez**, F. Forcada**, I. Sartore*, M. Carriquiry***, A. Meikle* y C. Sosa**¹

¹ Autor para correspondencia: Cecilia Sosa. E-mail: cecis@unizar.es

* Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, UdelaR, C/ Lasplacas 1550, Montevideo 11600, Uruguay

** Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, España

*** Producción Animal, Facultad de Agronomía, UdelaR, Av. Garzón 780, Montevideo 12900, Uruguay

Resumen

Las respuestas metabólicas a los cambios en el estado corporal podrían depender de la historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático), concepto denominado "memoria metabólica". El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta endocrino-metabólica a una restricción alimenticia en ovejas con diferente condición corporal (CC) al inicio del experimento. Durante la estación reproductiva, 36 ovejas Rasa Aragonesa fueron separadas en 2 grupos con diferente CC: CC > 2,75 (moderadamente alta, A, $2,9 \pm 0,04$) y CC < 2,25 (moderadamente baja, B, $2,1 \pm 0,04$). Durante 20 días, ambos grupos recibieron una dieta para cubrir los requerimientos de mantenimiento de energía y proteína, tras lo cual se asignaron al azar a dos tratamientos nutricionales: 1,5 (control, C) o 0,5 (subnutrición, S) veces los requerimientos de mantenimiento diario, estableciéndose cuatro grupos: altas control (AC, n = 9), altas subnutridas (AS, n = 10), bajas control (BC, n = 9) y bajas subnutridas (BS, n = 8). Se determinó el peso vivo (PV) y los niveles plasmáticos de glucosa, ácidos grasos no esterificados (AGNE), β -hidroxibutirato (BHB), insulina, leptina y factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I). Los grupos BS y AS perdieron peso, el grupo BC lo ganó y las ovejas AC lo mantuvieron. La concentración plasmática de glucosa fue mayor y los AGNE menor en las ovejas controles. Las ovejas de alta CC presentaron mayores concentraciones de insulina y de IGF-I, y la leptina tendió a ser mayor en estos animales. A su vez, la insulina fue mayor en los animales controles, mientras que las otras hormonas no fueron afectadas por el tratamiento. Los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I estuvieron afectados por la CC inicial y el tratamiento nutricional, como así lo demuestra la interacción significativa entre estos factores y días. Se evidenció un aumento en el momento del celo de las concentraciones de los metabolitos (glucosa y BHB) y de las hormonas metabólicas (insulina e IGF-I). En conclusión, en este estudio se encontró que los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I varían de forma diferente frente a una restricción alimenticia en función del grado de reservas corporales de las ovejas en el momento de iniciarse la restricción alimenticia.

Palabras clave: condición corporal, subnutrición, metabolitos, hormonas, ovejas.

Abstract

Food restriction in sheep: endocrine-metabolic response according to the level of body reserves

The metabolic responses to changes in metabolic status could depend on recent (feeding level) or more ancient (body reserves) metabolic history, a concept termed "metabolic memory". The aim of this work was to study the metabolic response to food restriction in ewes with different body condition score at the

beginning of the experiment (CCi). During the breeding season, 36 Rasa Aragonesa ewes were divided into 2 groups with different BCS: BCS > 2.75 (fat ewes, A, mean \pm standard error: 2.9 ± 0.04) and BCS < 2.25 (lean ewes, B, 2.1 ± 0.04). During 20 days, both groups received a diet to supply energy and protein maintain requirements, each group was divided into 2 groups and were fed to provide either 1.5 or 0.5 times the daily maintenance requirements; therefore, the 4 groups were: fat control (AC, n = 9), fat undernourished (AS, n = 10), lean control (BC, n = 9) and lean undernourished (BS, n = 8) ewes. Body weight (BW), glucose, non-esterified fatty acids (NEFA), β -hydroxybutyrate (BHB), insulin, leptin, and insulin-like growth factor (IGF-I) were determined. BS and AS groups lost weight, BC group gained weight, and AC ewes maintained their BW. Plasma glucose concentration and insulin were higher and NEFA was lower in control ewes. Ewes with high BCS had higher concentrations of insulin and IGF-I, and leptin tended to be higher in these animals. Insulin concentrations were higher in control ewes, while other hormones remained unchanged. Glucose, BHB, insulin and IGF-I profiles were affected by initial BCS and nutritional treatment, as is demonstrated by the significant interaction between these factors and days. Metabolites (glucose and BHB) and metabolic hormones (insulin and IGF-I) concentrations showed a peak at estrus time. In conclusion, it was found that glucose, BHB, insulin and IGF-I profiles respond to undernutrition according to the level of body reserves of the animals at the onset of the nutritional restriction.

Key words: body reserves, undernutrition, metabolites, hormones, sheep.

Introducción

La nutrición es uno de los factores más importantes que afectan el ciclo reproductivo de los rumiantes, por lo que es clave cubrir los requerimientos de los animales a los efectos de optimizar su rendimiento productivo (Martin *et al.*, 2004). En países de clima templado, donde los animales pastorean pastos naturales durante todo el año, las variaciones estacionales en la cantidad y calidad de los pastos modifican las ganancias de peso a lo largo del año (Quintans, 2008) lo que se ha asociado a la eficiencia reproductiva global (Quintans y Roing, 2008).

Para lograr mantener el equilibrio del medio interno y las funciones vitales durante una subnutrición, se dan numerosos cambios en las concentraciones hormonales y en su sensibilidad tisular (Chilliard *et al.*, 1998). Los períodos de balance energético negativo (BEN) están caracterizados por la movilización grasa que se refleja en un aumento de la concentración circulante de ácidos grasos no esterificados (AGNE) (Pedron *et al.*, 1993; Ingvarsen y Andersen, 2000; Burke y Roche,

2007), que a menudo se acompaña con el incremento en la producción de cuerpos cetónicos, como el β -hidroxibutirato (BHB) (Whitaker *et al.*, 1999). También, durante el BEN, ocurre una redistribución y utilización diferencial de nutrientes, por lo que los tejidos periféricos pueden utilizar otros nutrientes en lugar de la glucosa, permitiendo así una mayor disponibilidad de glucosa en los tejidos periféricos para otras funciones vitales (Bell y Bauman, 1997).

La hormona del crecimiento (GH), juega un papel clave en la subnutrición regulando la utilización de glucosa (Renaville *et al.*, 2002; Flint *et al.*, 2003). Muchos de los efectos somatogénicos de esta hormona están mediados por el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) (Breier, 1999; Renaville *et al.*, 2002). El IGF-I es secretado por el hígado en respuesta a la GH y ejerce a su vez un control negativo a nivel hipotálamo-hipófisis para la secreción de GH. En períodos de subnutrición, existe un desacoplamiento hepático en el eje GH-IGF-I, es decir, el hígado es menos sensible a la GH (menor contenido del receptor de GH), resultando en

una reducción de la concentración circulante de IGF-I (Thissen *et al.*, 1994; Chilliard *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999). Esto repercute en varios órganos y tejidos, ya que el IGF-I es anabólico y estimula el crecimiento, pero se destaca además que la falta de retroalimentación negativa sobre la GH, promueve una mayor concentración circulante de esta hormona y por lo tanto, una mayor acción teleofórica (Meikle *et al.*, 2010).

Si bien se considera que el desacoplamiento del eje somatotropo en períodos de subnutrición es una estrategia del rumiante para enfrentar la crisis energética, existen otras señales hormonales que tienen un papel clave. La insulina, secretada por el páncreas, tiene múltiples efectos en el metabolismo; entre los más importantes está el facilitar la entrada de glucosa a las células desde la circulación general y estimular el almacenamiento de lípidos (Bell, 1995; Etherton, 2004). En períodos de subnutrición la concentración de insulina disminuye, y por lo tanto, la estimulación del anabolismo está disminuida. Simultáneamente, la GH aumenta la lipólisis y disminuye los eventos regulados por la insulina, como son el transporte de la glucosa y la lipogénesis (Flint *et al.*, 2003).

Hace aproximadamente una década, se modificó el concepto de que el tejido adiposo es meramente un depósito de reservas y un receptor de señales hormonales que regulan su función. La detección por primera vez en rumiantes de la leptina, hormona proteica secretada principalmente por el tejido adiposo (Delavaud *et al.*, 2000), puso de manifiesto el importante papel endocrino de este tejido. La leptina es uno de los principales agentes que informan sobre el nivel de almacenamiento de energía periférica a regiones cerebrales que controlan el apetito, el metabolismo y la función endocrina para mantener la homeostasis (Chilliard *et al.*, 1998). La subnutrición disminuye la concen-

tración circulante de leptina (Sosa *et al.*, 2006; 2009), y frente a una sobrealimentación en el ganado vacuno y ovino, ésta aumenta en sangre (Chilliard *et al.*, 2000), lo que sugiere que es una señal para las adaptaciones endocrinas, metabólicas y de comportamiento dirigidas a restaurar la homeostasis (Chilliard *et al.*, 2000; 2001). También se ha sugerido que la leptina regula directamente la función hepática (Yasari *et al.*, 2009), pudiéndose proponer un mecanismo de comunicación entre estos dos principales tejidos metabólicos (hígado y tejido adiposo).

Las respuestas metabólicas a los cambios en el estado metabólico podrían depender de la historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático), concepto denominado "memoria metabólica" (Chilliard *et al.*, 2005; Blache *et al.*, 2006). Se ha sugerido que el impacto de la subnutrición varía de acuerdo con el estado fisiológico del animal y de acuerdo con su condición corporal (Blanc *et al.*, 2006). En trabajos previos (Sosa *et al.*, 2006; 2009) hemos encontrado respuestas endocrino-metabólicas diferenciales frente a una misma restricción alimenticia; estos experimentos, que no se realizaron simultáneamente, se realizaron con animales de la misma raza, pero con una condición corporal (CC) de partida diferente (0.6 puntos de diferencia en una escala de 0 a 5; Russel *et al.*, 1969).

Por lo tanto, la hipótesis del presente trabajo fue que las respuestas metabólicas y endocrinas frente a un tratamiento de subnutrición agudo (efecto dinámico) podrían depender de las reservas energéticas corporales iniciales (CCi, efecto estático). El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta metabólica –en términos de metabolitos y hormonas– a una restricción alimenticia en ovejas con diferente CC al inicio del experimento.

Materiales y métodos

Animales y tratamientos

Este experimento se llevó a cabo en la granja experimental de la Universidad de Zaragoza, España (latitud 41°41' N), bajo la supervisión del Comité de Ética de la Universidad de Zaragoza y de acuerdo a las exigencias de la Unión Europea para la experimentación animal. Durante la estación reproductiva (Diciembre-Marzo), 36 ovejas Rasa Aragonesa fueron separadas en 2 grupos con diferente CC (CC inicial, CCI) (CC, escala de 0 a 5; Russel et al., 1969): CCI > 2,75 (n=19, moderadamente alta, A) y CCI < 2,25 (n=17, moderadamente baja, B). El peso vivo (PV) al inicio del experimento fue de 61,9 ± 1,6 kg y 50,9 ± 1,7 kg para el grupo A y B, respectivamente; y la CCI fue de 2,9 ± 0,04 para el grupo A y 2,1 ± 0,04 para el B. Durante 20 días, ambos grupos recibieron una dieta para cubrir los requerimientos de mantenimiento en energía y proteína (AFRC, 1993). Las dietas consistieron en: 0,45 kg de materia fresca (MF) de concentrado (pienso) y 0,55 kg MF de paja/oveja/día para el Grupo A, y en 0,40 kg MF de concentrado y 0,50 kg MF de paja/oveja/día para el Grupo B. Ambas dietas proporcionaron 2 Mcal EM/kg MF y 9% de PB. El concentrado estaba compuesto por cebada y soja, en una relación porcentual de 85:15. Tras este período, cada grupo fue dividido en 2 grupos que fueron alimentados para proporcionar 1,5 (control, C) o 0,5 (subnutrición, S) veces los requerimientos diarios de mantenimiento de acuerdo a nuestros trabajos previos (Abecia et al., 1993; 1995; Lozano et al., 1998; Sosa et al., 2006). Las dietas consistieron en 0,60 kg (MF) de pienso y 0,9 kg MF de paja/oveja/día para la dieta 1,5M (grupo C) y 0,20 kg MF de pienso y 0,30 kg MF de paja/oveja/día para la dieta 0,5 M (grupo S). Ambas dietas proporcionaron 2,1 Mcal EM/kg MF y 11% de PB. El concentrado estaba compuesto por cebada y soja en una relación de 66:34. Por lo tanto, los 4 grupos

experimentales fueron: ovejas altas control (AC, n = 9), ovejas altas subnutridas (AS, n = 10), ovejas bajas control (BC, n = 9) y ovejas bajas subnutridas (BS, n = 8). Al comienzo del tratamiento con las diferentes dietas, todas las ovejas fueron sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas de progestágeno (acetato de fluorogestona, 40 mg; ISPAH, Salamanca, España) durante 14 días. Al momento de la retirada de las esponjas, las ovejas fueron inyectadas i.m. con 300 UI de gonadotropina coriónica equina (Sincropart® PMSG, Ceva Salud Animal, Barcelona, España) y el estro (Día 0) se detectó cada 8 horas a partir de las 24 horas de retiradas las esponjas, usando moruecos vasectomizados. El día 5 después del celo, los animales de cada grupo fueron sacrificados para realizar otros estudios. El PV fue determinado los días -35, -21, -15 (inserción de esponjas e inicio de dietas diferenciales), -1 (retiro de esponjas) y 5 (sacrificio), con respecto al estro.

Muestreos sanguíneos

Las muestras de sangre se extrajeron cada 3 días en tubos de vacío con heparina de la vena yugular de animales en ayuno, desde el día anterior del comienzo de las dietas diferenciales (día -16) hasta el final del experimento. El plasma fue separado por centrifugación a 1000g por 10 minutos y almacenado a -20°C hasta la posterior determinación de hormonas y metabolitos.

Determinaciones analíticas

Las concentraciones de glucosa y BHB se determinaron usando un analizador automático (Gernonstar®, Transasia, Bombay, India). Para la determinación de glucosa se utilizó un kit enzimático (Gernon®, RAL for Laboratorios Techniques, Barcelona, España) y los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron 2,2% y 3,1%, respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 1 mg/dL. La

concentración de BHB también se determinó utilizando kits comerciales (RANBUT®, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Reino Unido) y su sensibilidad fue de 0,1 mmol/L. Los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron menores del 6%. Los AGNE fueron cuantificados utilizando el kit NEFA-HR (2) (Wako Chemicals, Richmond, Estados Unidos) con el volumen de muestra y reactivos ajustados para una placa de 96 pocillos (Multiskan EX; Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). La sensibilidad del ensayo fue de 0,01 mmol/L y el CV intra-ensayo fue 12,5%.

Las determinaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de insulina fueron determinadas por un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida utilizando kits de DPC (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, Estados Unidos). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 2,2 mUI/mL. Los CV intra-ensayo para controles bajos (2,2mUI/mL) y medios (12,6 mUI/mL) fueron 8,2 y 9,4%, respectivamente. El IGF-I fue determinado usando un ensayo inmuno-radiométrico de un kit comercial (IGF1-RIACT CisBio International, GIFS-R-YVETTE CEDEX, Francia), previamente comunicado por (Adrien *et al.*, 2011). La sensibilidad del ensayo fue de 0,7 ng/mL. Los CV intra-ensayo para el control 1 (43,8 ng/mL) y el control 2 (521,5 ng/mL) fueron de 8,2 y 7,9%. La concentración de leptina se determinó por un RIA en fase líquida usando un kit comercial Multi-Species Leptin (Millipore, Cat XL-85K) previamente comunicado en bovinos (Pinotti y Rosi, 2006). La sensibilidad fue de 1,8 ng/mL. Los CV intra-ensayo para el control 1 (5,3 ng/mL) y el control 2 (18,3 ng/mL) fueron 5,6 y 5,1%, respectivamente.

Análisis estadísticos

Todas las variables fueron analizadas por un ANOVA utilizando un procedimiento mixto de medidas repetidas. El modelo incluyó los

efectos fijos de CC inicial (moderadamente alta o moderadamente baja), tratamiento nutricional (control o subnutrición), días y sus interacciones y la estructura de covarianza autorregresiva de primer orden. Se utilizó el procedimiento Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador. La separación de medias se realizó por el test de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, Estados Unidos). Los datos se presentan como medias de mínimos cuadrados \pm errores estándares combinados. Las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$, y tendencia cuando $0,05 < P < 0,10$.

Resultados

Peso Vivo

Desde el comienzo del experimento hasta el día -15 (comienzo del tratamiento nutricional), el PV fue menor en las ovejas de baja CC en comparación con las de alta CC (Figura 1). Desde el día -15 hasta el día 5, las ovejas BS y AS perdieron peso vivo (6 y 7,3 kg, respectivamente; $P < 0,05$), mientras que el grupo BC ganó 5,8 kg ($P < 0,05$) y las ovejas AC mantuvieron su PV (Figura 1).

Metabolitos

La triple interacción entre CCi, tratamiento nutricional y día tendió a afectar las concentraciones de glucosa ($P = 0,08$). Los grupos subnutridos disminuyeron en un 10% la concentración de glucosa en el primer muestreo después de iniciada la subnutrición (66 vs 58,7 mg/dL; $P < 0,05$). Los niveles se mantuvieron bajos excepto por el aumento pronunciado de glucosa observado un día antes del estro (día-1) en todos los grupos exceptuando las BS, seguido por una disminución hasta el día 2 para todos los grupos (Figura 2). En general,

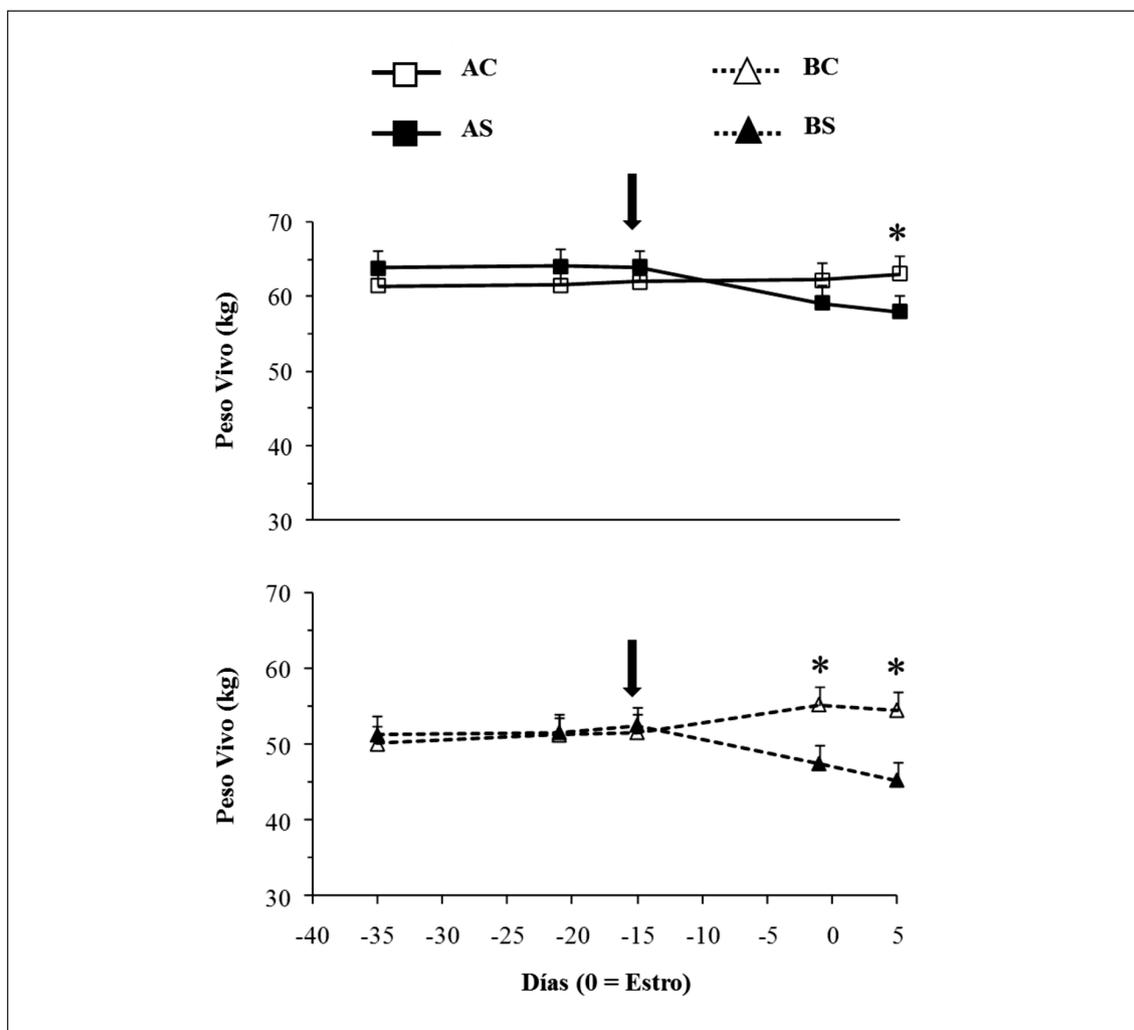


Figura 1. Peso vivo a lo largo del experimento en ovejas con una CCI moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición.

Figure 1. Body weight of fat (A) and lean (B) sheep fed 0.5 (undernourished, S) or 1.5 (control, C) times the requirements for maintenance. The black arrow indicates the moment where undernutrition started.

las concentraciones de glucosa fueron mayores en los grupos control respecto de los subnutridos (Tabla 1); evidenciándose este efecto en determinados días durante el experimento (Figura 2). No hubo efecto de la CCI ni de su interacción con el tratamiento nutricional.

Las ovejas subnutridas presentaron concentraciones de AGNE superiores a las ovejas controles ($P < 0,05$), independientemente de su CCI (Tabla 1). No hubo efecto de la CCI ni de su interacción con el tratamiento nutricional. Se observó una interacción entre tratamiento

Tabla 1. Concentraciones de metabolitos y hormonas en ovejas con alta (A) y baja (B) CCI alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento
 Table 1. Concentrations of metabolites and hormones in fat (A) and lean (B) ewes fed 0.5 (undernourished, S) or 1.5 (control, C) times the requirements for maintenance

	CCI		Tratamiento nutricional	
	A	B	C	S
Glucosa (mg/dL)	61,4 ± 1,0	62,7 ± 1,1	63,8 ± 1,0 ^a	60,3 ± 1,0 ^b
AGNE (mmol/L)	0,54 ± 0,05	0,58 ± 0,06	0,36 ± 0,05 ^a	0,76 ± 0,05 ^b
BHB (mmol/L)	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Insulina (μUI/mL)	4,84 ± 0,38 ^a	3,49 ± 0,40 ^b	4,64 ± 0,39 ^x	3,70 ± 0,39 ^y
Leptina (ng/mL)	2,94 ± 0,19 ^x	2,49 ± 0,21 ^y	2,78 ± 0,19	2,65 ± 0,20
IGF-I (ng/mL)	395,2 ± 28,4 ^a	261,6 ± 30,0 ^b	333,6 ± 29,2	323,3 ± 29,3

Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas: ^{a,b} P < 0,05; ^{xy} 0,05 < P < 0,10.
 Different superscripts in the same row indicate statistical differences: ^{a,b} P < 0.05; ^{xy} 0.05 < P < 0.10.

nutricional y día de muestreo en las concentraciones de AGNE (P < 0,01). Seis días después de iniciada la subnutrición las concentraciones de AGNE aumentaron en las ovejas AS (P < 0,05), mientras que en las BS el aumento ocurrió en el primer muestreo post tratamiento. Mientras que las AS mantuvieron concentraciones de AGNE estables, con un aumento el último día de muestreo, las BS presentaron fluctuaciones importantes (Figura 2).

Los perfiles de BHB no se vieron afectados por el tratamiento nutricional, la CCI ni la interacción entre ambas variables. Sí se observó una tendencia a ser afectados por la triple interacción entre CCI, el tratamiento nutricional y el día de muestreo (P = 0,06) dada fundamentalmente por diferencias en días puntuales. Las ovejas AS presentaron mayor concentración de BHB que el grupo AC ocho días después de iniciado el tratamiento nutricional (P < 0,05; Figura 2), mientras que esta diferencia no se observó en las ovejas de baja CCI. Por otro lado, en las BS se observó mayor concentración de BHB un día antes del estro que en las BC (P < 0,05). Se observó un aumento en las concentraciones de BHB un

día antes del estro (día-1) en todos los grupos (P < 0,05), excepto el BC (Figura 2).

Hormonas

Las ovejas de alta CCI presentaron mayor concentración de insulina en comparación con las ovejas de baja CCI (P < 0,05), así como las ovejas con una dieta de mantenimiento tendieron a tener mayores concentraciones de insulina que las subnutridas (P < 0,09; Tabla 1). Las concentraciones de insulina se vieron afectadas por la triple interacción entre CCI, tratamiento nutricional y día (P < 0,05): las ovejas con alta CCI mantuvieron niveles de insulina altos hasta el estro, el grupo AC mostró un aumento marcado al estro, y tras ese día ambos grupos disminuyeron (Figura 3). Por otro lado, en las ovejas con baja CCI se observó un claro efecto de la subnutrición, disminuyendo las concentraciones que se mantuvieron bajas hasta el final del ensayo. En el grupo BC los niveles se mantuvieron estables y no se observaron aumentos alrededor del estro (Figura 3).

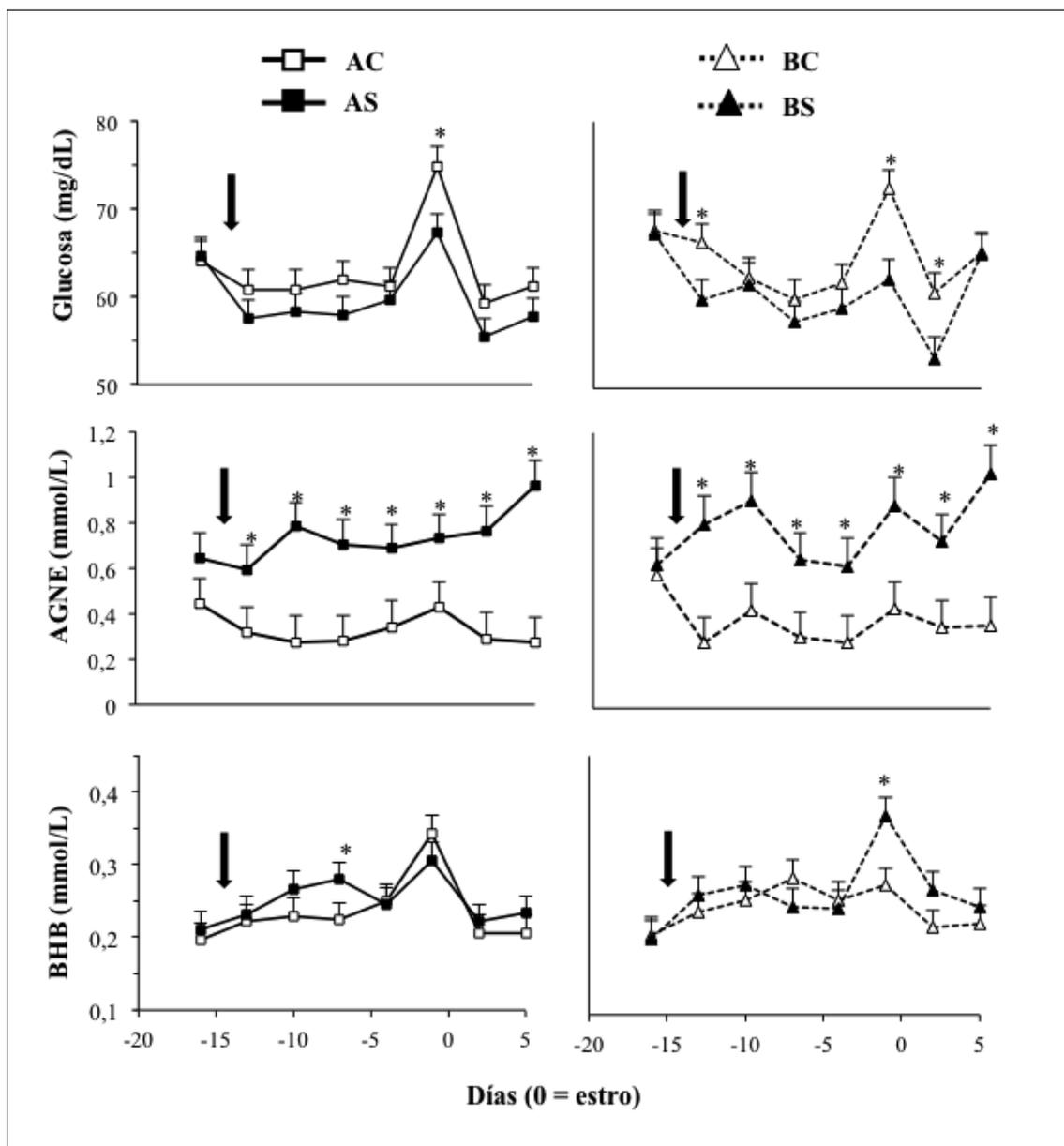


Figura 2. Concentración plasmática de glucosa, AGNE y BHB en ovejas con una CCi moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición. Los asteriscos denotan diferencias entre grupos, $P < 0,05$.

Figure 2. Plasma concentrations of glucose, AGNE and BHB of fat (A) and lean (B) sheep fed 0.5 (undernourished, S) or 1.5 (control, C) times the requirements for maintenance.

The black arrow indicates the moment where undernutrition started.

Asterisks indicate differences between groups, $P < 0.05$.

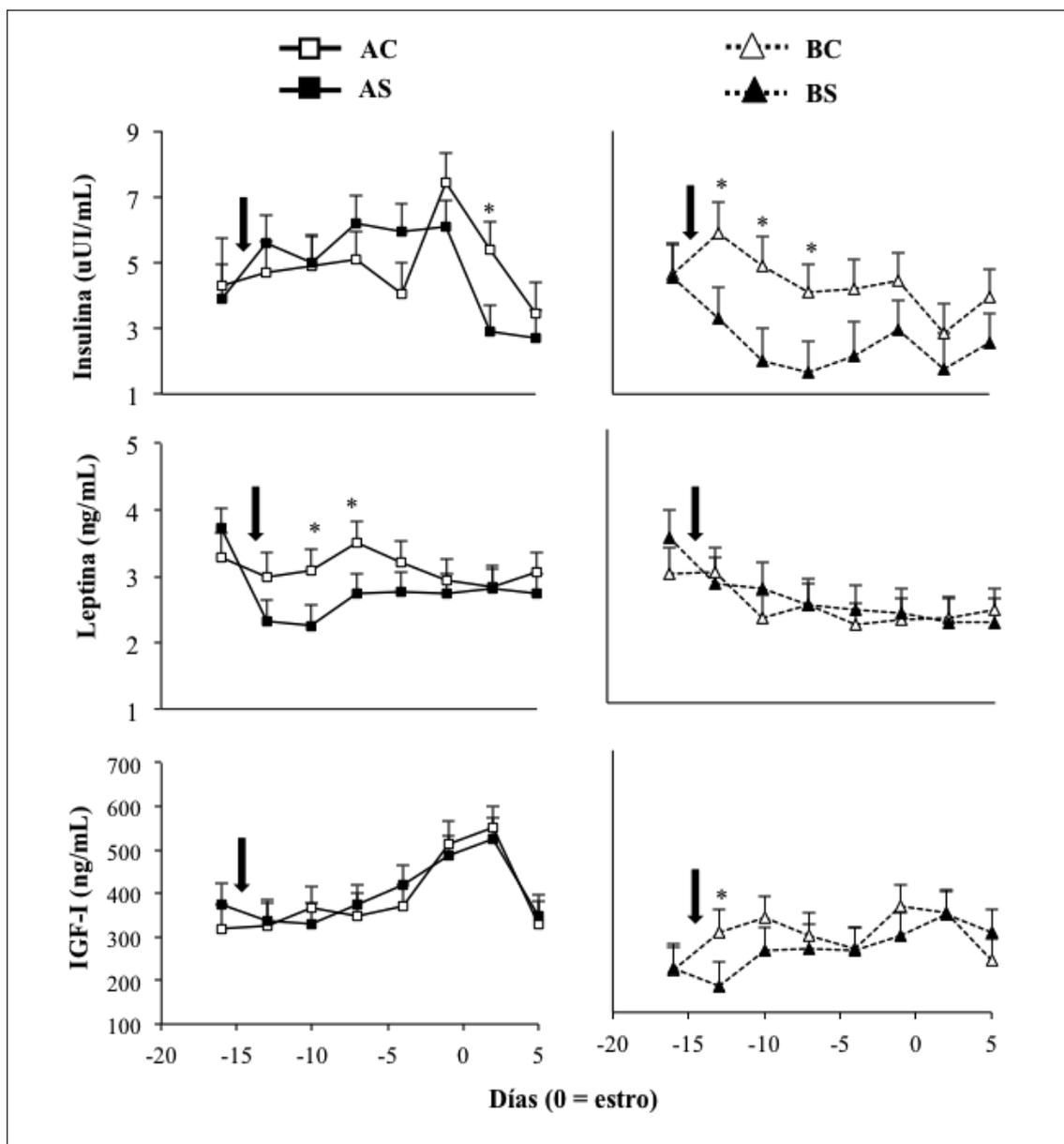


Figura 3. Concentración plasmática de insulina, leptina e IGF-I en ovejas con una CCI moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición. Los asteriscos denotan diferencias entre grupos, $P < 0,05$.

Figure 3. Plasma concentrations of insulin, leptin and IGF-I of fat (A) and lean (B) sheep fed 0.5 (undernourished, S) or 1.5 (control, C) times the requirements for maintenance. The black arrow indicates the moment where undernutrition started. Asterisks indicate differences between groups, $P < 0.05$.

Las concentraciones de IGF-I fueron mayores en las ovejas con alta CCI que en las de baja CCI ($P < 0,01$; Tabla 1). No se observó efecto del tratamiento nutricional ni de su interacción con la CCI. Las concentraciones de IGF-I tendieron a estar afectadas por la triple interacción entre CCI, tratamiento nutricional y día ($P = 0,07$). Las concentraciones a lo largo del tiempo tendieron a ser diferentes entre los distintos grupos: no se encontraron diferencias entre las ovejas con alta CCI, subnutridas o control, los niveles aumentaron alrededor del estro y disminuyeron posteriormente; mientras que se observó un aumento en las concentraciones de IGF-I en las BC con respecto a las BS en el primer muestreo post-tratamiento y los niveles volvieron a aumentar alrededor del estro. De forma similar a la glucosa, se detectó un aumento ($P < 0,05$) de IGF-I alrededor del estro en todos los grupos exceptuando las BS, seguido por una disminución hasta el día 5 (Figura 3).

Las ovejas con alta CCI tendieron a presentar mayores concentraciones de leptina que las de baja CCI ($P = 0,1$; Tabla 1). No se observó efecto del tratamiento nutricional ni de su interacción con la CCI. La triple interacción día x tratamiento x CCI no fue significativa, a pesar de que se observaron diferencias puntuales. El grupo AC presentó mayores concentraciones de leptina que el grupo AS entre los días -10 y -7 del ciclo ($P < 0,05$), dado principalmente por una drástica caída de la concentración de leptina a partir del inicio de la subnutrición en este último grupo. Una disminución menos marcada se evidenció en el grupo BS (Figura 3). No se observaron diferencias entre las ovejas con baja CCI.

Discusión

En este trabajo se pone en evidencia que la respuesta endocrino-metabólica a una restricción alimenticia - 0,5 M - en ovejas depende del grado de reservas corporales ini-

ciales (o memoria metabólica), lo cual se evidencia en los diferentes patrones observados a lo largo del experimento en las concentraciones de glucosa, BHB, insulina e IGF-I.

La subnutrición a mitad de los requerimientos para mantenimiento provocó una disminución de 6 kg de PV en las ovejas con alta CCI (CCI: 2,9) y de 7,3 kg en las ovejas con baja CCI (CCI: 2,1). Resultados similares se encontraron cuando se realizaron tratamientos de subnutrición semejantes: ovejas con mejor CC (3,4) perdieron 5 kg de PV (Sosa et al., 2009), mientras que ovejas más delgadas (CC de 2,9 y 2,8) perdieron 6,8 y 7 kg respectivamente (Sosa et al., 2004; 2006). Esto podría deberse a que animales más engrasados (mayor CC y PV) presentan un mayor porcentaje de lípidos corporales (Caldeira y Portugal, 2007) obteniendo más energía por kg de PV movilizado (Williams et al., 1989) debido a la mayor concentración energética de las grasas frente a proteínas o carbohidratos (2 a 2,5 veces mayor). Por otro lado, las ovejas AC mantuvieron su PV coincidiendo con trabajos previos (Sosa et al., 2004; 2006). Sin embargo, el grupo BC aumentó su PV probablemente como una respuesta compensatoria frente a la restricción alimenticia anterior.

Las concentraciones de glucosa fueron mayores en los grupos control respecto de los subnutridos, lo que es consistente con los tratamientos efectuados. Petterson et al. (1993) no encontraron diferencias en concentraciones de glucosa basal entre ovejas con dietas de 1 o 0,5 M, pero en este estudio se tomó una única muestra. Sosa et al. (2009) observaron que la subnutrición no afectó las concentraciones de glucosa, pero la frecuencia de muestreo fue menor a la del presente estudio. Esta señal de energía disponible está finamente regulada aún en el rumiante (Chilliard et al., 1998), y desencadena respuestas endocrinas específicas como las que se analizaron en el presente estudio.

La movilización de reservas provocada por la subnutrición se observó en el aumento de los AGNE tanto en animales con alta como con baja CCI. Este mecanismo de adaptación a la restricción de nutrientes es muy conocido y ha sido descrito en rumiantes y en experimentos similares al presente (Chilliard *et al.*, 1998; Sosa *et al.*, 2006; 2009). No se observaron diferencias en los niveles de AGNE de las ovejas con alta y baja CCI tras la subnutrición, a pesar de que las de alta CCI presentaban PV y CC iniciales mayores que las de baja CCI (11 kg y 0,8 puntos de CC de diferencia, respectivamente) sugiriendo una tasa de lipólisis similar entre estos grupos. Por otra parte, no se observaron diferencias importantes en las concentraciones de BHB entre grupos, sino aumentos puntuales de los grupos subnutridos frente a sus respectivos controles. Si bien estos aumentos de BHB concuerdan con aumentos anteriores o simultáneos de AGNE en estos grupos, el BHB no fue un buen indicador de restricción energética. El BHB es un producto de la degradación de los AGNE y se esperaría que el aumento de éstos estuviera acompañado por un aumento concomitante de BHB en sangre (Bouchat *et al.*, 1981; Chilliard *et al.*, 1998). Sin embargo es posible que ese efecto se observe en situaciones más extremas de balance energético negativo (por ejemplo, durante la gestación tardía) y no sea evidente en ovejas vacías.

Las concentraciones de insulina fueron mayores en las ovejas con alta CCI en comparación con las de baja CCI, reflejando un mejor estatus energético. Un hallazgo interesante de este trabajo fue la respuesta diferencial frente a la restricción alimenticia en esos dos grupos de animales: mientras que en las ovejas AS las concentraciones de insulina disminuyeron 2 semanas después de haberse iniciado el tratamiento, en las ovejas BS se observó una caída importante en el primer muestreo post-subnutrición. Teniendo en cuenta los perfiles de glucosa de estos gru-

pos, se puede sugerir que si bien en las ovejas con baja CCI, la disminución de la glucosa actuó como señal metabólica para la regulación de la secreción de insulina, en las ovejas con alta CCI la secreción de insulina fue –al menos en parte– independiente de la caída plasmática de glucosa. La regulación de la secreción de la insulina es compleja ya que se ha demostrado en roedores que además de la glucosa, intervienen la propia insulina, la leptina y el IGF-I (ver debajo). Este hallazgo podría implicar una adaptación metabólica diferencial en la que las ovejas con niveles críticos de reservas energéticas responden rápidamente a la ingesta diaria, mientras que ovejas en un estado energético superior (reservas) presentan una mayor independencia temporal de la misma. Bouchat *et al.* (1981) sugirieron que cuando se comparan animales delgados y gordos, hay diferencias importantes en la concentración de metabolitos en sangre en situaciones de ayuno, pero el estudio realizado por estos autores no pudo demostrar esta hipótesis. La disminución de insulina en animales BS es consistente con los bajos niveles de glucosa y los altos de AGNE que en conjunto reflejan un estado catabólico acorde a la ingesta insuficiente de nutrientes. Si bien Petterson *et al.* (1993) no pudieron demostrar una disminución de insulina frente a una subnutrición similar, el número de muestras consideradas en ese estudio es pobre y las diferencias numéricas presentadas son importantes, lo que respaldaría lo observado en el presente trabajo.

Se ha demostrado que una estrategia desarrollada en el rumiante frente a la restricción alimenticia, es el desacoplamiento en el eje GH-IGF-I, resultando en aumento de las concentraciones de GH y una disminución en la concentración circulante de IGF-I (Thissen *et al.*, 1994; Chilliard *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999). Sin embargo, en nuestro estudio no se observó disminución de esta última hormona en ninguno de los grupos subnu-

tridos. De forma similar, no se observaron disminuciones importantes de IGF-I tras la subnutrición en trabajos previos (Sosa et al., 2006; 2009), observándose diferencias sólo alrededor del estro (Sosa et al., 2006). En el presente estudio, las concentraciones de IGF-I presentan un claro efecto de la CCI de los animales siendo superiores las concentraciones en las ovejas gordas, siendo el indicador que mejor reflejó el efecto estático de la nutrición. Los niveles de IGF-I más altos en ovejas gordas son consistentes con los niveles mayores de insulina en estos animales (Mashek et al., 2001). Se ha propuesto un efecto estimulador de la insulina sobre la sensibilidad de GH hepática y consecuente síntesis de IGF-I (Butler et al., 2003; Rhoads et al., 2004). Una acción recíproca puede proponerse entre el páncreas y el hígado ya que también se ha demostrado una acción directa del IGF-I sobre las células b-pancreáticas, específicamente en la activación de la glucoquinasa, paso limitante para el metabolismo de la glucosa pancreática responsable de la secreción de insulina (Yoshida et al., 2007).

El nivel de la leptina plasmática es el resultado de la reserva de adipocitos, pero también se modula de una manera más rápida a través del nivel de alimentación (Delavaud et al., 2000). En el presente estudio, la leptina tendió a ser mayor en las ovejas AC, explicado por ser el grupo que presenta mayor cantidad de grasa corporal y ser aquel que está recibiendo mayor nivel de alimentación. En este mismo sentido, en un trabajo previo con condiciones corporales comparables al grupo A del presente estudio (Sosa et al., 2009), observamos importantes diferencias entre el grupo control y el subnutrido. La leptina disminuyó drásticamente en las ovejas más engrasadas tras la subnutrición, pero esta disminución no fue tan acusada en las ovejas delgadas. Se ha demostrado que la leptina ejerce efectos inhibitorios tanto en el control de la expresión como de la secreción

de insulina directamente sobre las células pancreáticas (humanos: Seufert et al., 1999; roedores: Morioka et al., 2007). La caída marcada de leptina observada en las ovejas AS tras la subnutrición podría ser un estímulo para el mantenimiento de insulina en plasma, aun con dietas de 0,5 M y niveles de glucosa más bajos. Por otro lado, la disminución moderada en las concentraciones de leptina tras la subnutrición en las ovejas delgadas y los niveles ya deprimidos de IGF-I podría explicar la drástica disminución de insulina. Con lo anteriormente expuesto, se podría especular que estas tres hormonas clave –insulina, leptina e IGF-I– no sólo regulan el flujo metabólico, sino que su regulación es inter-dependiente facilitando así la comunicación entre estos tres tejidos. A su vez, la leptina informa sobre el nivel de almacenamiento de energía periférica a regiones cerebrales y su acción inhibe el apetito y disminuye la tasa metabólica, por lo que la disminución de esta hormona en animales sometidos a una subnutrición facilitaría el restablecimiento de la homeostasis (Chilliard et al., 2005).

Al igual que en trabajos anteriores realizados por Sosa et al., (2006; 2009) se evidencia el aumento en el momento del celo de las concentraciones de los metabolitos. El resultado de esta movilización de energía alrededor del estro puede estar asociado al estrés y/o liberación de corticosterona/cortisol que se observa en varias especies incluidas los ovinos (Lyimo et al., 2000; Sosa y col., datos sin publicar). Por otro lado, el aumento de insulina e IGF-I alrededor del estro en ovinos ha sido comunicado previamente (Viñoles et al., 2005; Sosa et al., 2006; 2009). Estos aumentos estarían asociados al estradiol-17b pre-ovulatorio que puede haber incrementado la secreción pancreática de insulina como ha sido sugerido para ratas (Nadal et al., 1998; Morimoto et al., 2001) y síntesis de IGF-I y/o sus proteínas de unión como se ha determinado

en ovejas y vacas (Clapper *et al.*, 1998; Colak *et al.*, 2011). Asimismo, el aumento al estro del IGF-I puede explicarse por el aumento de insulina, ya que en vacas se ha descrito que la insulina aumenta las concentraciones hepáticas del mRNA de IGF-I (Butler *et al.*, 2003; Rhoads *et al.*, 2004). Este estudio muestra la relevancia de que en los estudios metabólicos los animales hayan sido sincronizados para presentar el celo al mismo tiempo, y abre una nueva perspectiva respecto del papel de las hormonas reproductivas sobre la regulación de las hormonas metabólicas.

En conclusión, en este estudio se encontró que los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I varían de forma diferente frente a una restricción alimenticia en función del grado de reservas corporales de las ovejas en el momento de iniciarse la restricción alimenticia.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los proyectos AGL2007-63822/GAN y AGL2010-15004.

Bibliografía

- Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Lozano JM, 1993. Effect of plane of protein after weaning on resumption of reproductive activity in Rasa Aragonesa ewes lambing in late spring. *Theriogenology*. 39(2): 463-473.
- Abecia JA, Rhind SM, Bramley TA, McMillen SR, 1995. Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Animal Science*. 61: 57-62.
- Adrien ML, Mattiauda DA, Artegoitia V, Carriquiry M, Motta G, Bentancur O, Meikle A, 2011. Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of postpartum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal*; in press.
- Agricultural and Food Research Council (AFRC), 1993. Energy and protein requirements of ruminants. An advisor manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients. Wallingford, UK, CAB International.
- Bell AW, 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci*. 73(9): 2804-2819.
- Bell AW, Bauman DE, 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2(3): 265-278.
- Blache D, Zhang S, Martin GB, 2006. Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod Nutr Dev*. 46(4): 379-390.
- Blanc F, Bocquier F, Agabriel J, D'Hour P, Chilliard Y, 2006. Adaptive abilities of the females and sustainability of ruminant livestock systems. A review. *Animal Research*. 55: 489-510.
- Bouchat JC, Doize F, Paquay R, 1981. Influence of diet and prolonged fasting on blood lipids, ketone bodies, glucose and insulin in adult sheep. *Reprod Nutr Dev*. 21(1): 69-81.
- Breier BH, 1999. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Domest Anim Endocrinol*. 17(2-3): 209-218.
- Burke CR, Roche JR, 2007. Effects of pasture feeding during the periparturient period on postpartum anovulation in grazed dairy cows. *J Dairy Sci*. 90(9): 4304-4312.
- Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR, 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol*. 176(2): 205-217.
- Caldeira RM, Portugal AV, 2007. Relationships of body composition and fat partition with body condition score in Serra da Estrela ewes. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 20(7): 1108-1114.

- Clapper JA, Snyder JL, Roberts AJ, Hamernik DL, Moss GE, 1998. Estradiol increases relative amounts of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 in serum and expression of IGFBP-2 in anterior pituitaries of ewes. *Biol Reprod.* 59(1): 124-130.
- Colak M, Shimizu T, Matsunaga N, Murayama C, Nagashima S, Kataoka M, Kawashima C, Matsui M, Dorland HV, Bruckmaier R, Miyamoto A, 2011. Oestradiol Enhances Plasma Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-I Concentrations and Increased the Expression of their Receptors mRNAs in the Liver of Ovariectomized Cows. *Reprod Domest Anim.*
- Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M, 1998. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev.* 38(2): 131-152.
- Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Faulconnier Y, Leroux C, Djiane J, Bocquier F, 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol.* 21(4): 271-295.
- Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M, 2005. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 29(1): 3-22.
- Chilliard Y, Ferlay A, Faulconnier Y, Bonnet M, Rouel J, Bocquier F, 2000. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc Nutr Soc.* 59(1): 127-134.
- Delavaud C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G, 2000. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J Endocrinol.* 165(2): 519-526.
- Etherton TD, 2004. Somatotrophic function: the somatomedin hypothesis revisited. *J Anim Sci.* 82 E-Suppl: E239-244.
- Flint DJ, Binart N, Kopchick J, Kelly P, 2003. Effects of growth hormone and prolactin on adipose tissue development and function. *Pituitary.* 6(2): 97-102.
- Ingvarstsen KL, Andersen JB, 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci.* 83(7): 1573-1597.
- Kobayashi Y, Boyd CK, Bracken CJ, Lamberson WR, Keisler DH, Lucy MC, 1999. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 140(9): 3947-3954.
- Lozano JM, Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Alfaro B, 1998. Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology.* 49: 539-546.
- Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W, Kruip TA, van Eerdenburg FJ, 2000. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology.* 53(9): 1783-1795.
- Martin GB, Milton JT, Davidson RH, Banchemo Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D, 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci.* 82-83: 231-245.
- Mashek DG, Ingvarstsen KL, Andersen JB, Vestergaard M, Larsen T, 2001. Effects of a four-day hyperinsulinemic-euglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins. *Domest Anim Endocrinol.* 21(3): 169-185.
- Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien L, Rupprechter G, Rovere G, Peñagaricano F, Mendoza A, Pereira I, Mattiauda D, Chilbroste P, 2010. Endocrinología metabólica en la vaca lechera durante el período de transición y su relación con el reinicio de la ciclicidad ovárica. *Agrociencia.* 14(3): 89-95.
- Morimoto S, Cerbon MA, Alvarez-Alvarez A, Romero-Navarro G, Diaz-Sanchez V, 2001. Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle. *Life Sci.* 68(26): 2979-2985.
- Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT, Kulkarni RN, 2007. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest.* 117(10): 2860-2868.

- Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C, Soria B, 1998. Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J.* 12(13): 1341-1348.
- Pedron O, Cheli F, Senatore E, Baroli D, Rizzi R, 1993. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *J Dairy Sci.* 76(9): 2528-2535.
- Petterson JA, Dunshea FR, Ehrhardt RA, Bell AW, 1993. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *J Nutr.* 123(7): 1286-1295.
- Pinotti L, Rosi F, 2006. Leptin in bovine colostrum and milk. *Horm Metab Res.* 38(2): 89-93.
- Quintans G, 2008. Algunas estrategias para disminuir la edad al primer servicio en vaquillonas. *Serie técnica. Seminario de actualización técnica: Cría vacuna. INIA.*(174): 53-55.
- Quintans G, Roing G, 2008. Principales factores que afectan la aparición de la pubertad en vaquillonas de razas carniceras. *Seminario de actualización técnica: Cría vacuna. Serie técnica INIA.* 174: 56-58.
- Renaville R, Hammadi M, Portetelle D, 2002. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 23(1-2): 351-360.
- Rhoads RP, Kim JW, Leury BJ, Baumgard LH, Se-goale N, Frank SJ, Bauman DE, Boisclair YR, 2004. Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *J Nutr.* 134(5): 1020-1027.
- Russel AJF, Doney JM, Gunn RG, 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science* 72: 451-454.
- Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF, 1999. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(2): 670-676.
- Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Forcada F, Martin GB, Palacin I, Meikle A, 2009. Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest Anim Endocrinol.* 36(1): 13-23.
- Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Vinales C, Tasende C, Valares JA, Palacin I, Martin GB, Meikle A, 2006. Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev.* 18(4): 447-458.
- Sosa C, Lozano JM, Vinales C, Acuna S, Abecia JA, Forcada F, Forsberg M, Meikle A, 2004. Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Anim Reprod Sci.* 84(3-4): 337-348.
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE, 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev.* 15(1): 80-101.
- Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A, 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction.* 129(3): 299-309.
- Whitaker D, Goodger W, Garcia M, Perera B, Wittwer F, 1999. Use of metabolic profiles in dairy cattle in tropical and subtropical countries on smallholder dairy farms. *Prev Vet Med.* 38(2-3): 119-131.
- Williams CB, Oltenacu PA, Sniffen CJ, 1989. Refinements in determining the energy value of body tissue reserves and tissue gains from growth. *J Dairy Sci.* 72(1): 264-269.
- Yasari S, Wang D, Prud'homme D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM, 2009. Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor-a, -b, and, -e in rats. *Mol Cell Biochem.* 324(1-2): 13-20.
- Yoshida K, Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Li J, Ahmed RA, Kitanaka N, Wong NC, Unterman TG, Magnuson MA, Ishida T, 2007. Pancreatic glucokinase is activated by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 148(6): 2904-2913.

(Aceptado para publicación el 29 de agosto de 2011)