

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Veterinarias
Maestría en Ciencias Veterinarias
Mención: Salud Animal

RELACIÓN ENTRE HORMONAS E INDICADORES METABÓLICOS
CON LA OVULACIÓN EN PERRAS DE DIFERENTE CONDICIÓN
CORPORAL

Vet. Mariana G. Kiener

MAGISTER EN CIENCIAS VETERINARIAS

Directora: Msc. M.V. Gabriela Romano

Jurados: Msc. M.V. Nelsa Widenhorn

Msc. M.V. Cristina Scaglione

Msc. M.V. Patricia Koscinczuk

AGRADECIMIENTOS

A Lilian Cadoche, Dario Manzoli, Fredy Sguerzo, Lucila Beltramini y Johann
Barolin
Sin su aporte y colaboración hubiera sido imposible la realización de este
trabajo

A los integrantes de Cátedra de Fisiología por el apoyo y la paciencia.

INDICE

- INTRODUCCIÓN.....pág. 1
- REVISION BIBLIOGRAFICA.....pág. 4
- MATERIALES Y METODOS..... pág. 15
- RESULTADOS.....pág. 18
- DISCUSION.....pág. 30
- CONCLUSIONES.....pág. 34
- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... pág. 35

RESUMEN

Desde el punto de vista reproductivo, el principal evento del ciclo estral de las hembras caninas es la ovulación, la cual está regulada por la interacción entre hormonas esteroides, peptídicas, metabólicas y sustancias plasmáticas propias del metabolismo orgánico que regulan la homeostasis ovárica. La condición corporal, estimador de la grasa corporal del individuo, contribuye a la generación de diferencias metabólicas.

El objetivo del presente trabajo fue relacionar la concentración plasmática de IGF-1, insulina e indicadores metabólicos durante el estro en relación con la ovulación en hembras caninas de diferente condición corporal.

Se determinaron los niveles plasmáticos de LH, progesterona, Insulina, IGF-1, glucemia, uremia, proteínas plasmáticas, creatinina, colesterol y triglicéridos en hembras caninas de diferente condición corporal, encontrando diferencias en la longitud del ciclo estral siendo más largo en el grupo de mayor condición corporal y en las hormonas reproductivas, la LH se relacionó positivamente con la glucemia e inversamente con la insulina y el IGF-1, y este alcanza mayores concentraciones en el grupo de mayor condición corporal y se relacionó de manera inversa a la progesterona. La condición corporal modifica tanto metabolitos plasmáticos como hormonas metabólicas y reproductivas en las diferentes etapas del ciclo estral de la hembra canina.

PALABRAS CLAVE: ovulación, perra, condición corporal.

SUMMARY

From reproductively, the main event of the estrous cycle of female dogs is ovulation, which is regulated by the interaction between steroid hormones, peptide, metabolic and own organic metabolism homeostasis regulating ovarian plasma substances. BCS, body fat estimator individual, contributes to the generation of metabolic differences.

The aim of this study was to relate the plasma concentration of IGF-1, insulin and metabolic indicators during estrus in relation to ovulation in female dogs of different body condition.

Plasma levels of LH, progesterone, insulin, IGF-1, glucose, uremia, plasma proteins, creatinine, cholesterol and triglycerides in canine females of different body condition is determined, finding differences in the length of the estrous cycle being longer in the group higher body condition and reproductive hormones, LH was positively associated with glucose and inversely with insulin and IGF-1, and this reached higher concentrations in the group of higher body condition and inversely related to progesterone . Body condition changes both plasma metabolites and metabolic and reproductive at different stages of the estrous cycle of the bitch hormones.

KEYS WORDS: ovulation, bitch, body condition,

I.INTRODUCCIÓN

El estudio de la fisiología reproductiva de la perra ha cobrado importancia en las últimas décadas. Estos animales se han consolidado como una de las especies de compañía para el hombre y al poseer características reproductivas únicas, asegurar la reproducción, depende de los conocimientos adquiridos en el tema.

La hembra canina presenta generalmente dos ciclos estrales por año, cada 6 meses aproximadamente en cada uno de los cuales, libera gametas susceptibles de ser fecundadas, esto es posible gracias a que se produce el evento principal de cada ciclo estral que es la ovulación.

La ovulación esta desencadenada principalmente por el pico de hormona Luteinizante (LH) (Concannon, 2011).

La secreción de gonadotrofinas hipofisarias, LH y Folículo Estimulante (FSH), está regulada por hormonas liberadoras de gonadotrofinas que se secretan en el hipotálamo, y que regulan su secreción principalmente por retroalimentación con esteroides ováricos, estrógenos y progesterona. La LH inicia la cascada de eventos del proceso ovulatorio, en los folículos maduros, que culmina con la ruptura del folículo y la liberación de un ovocito maduro susceptible de ser fecundado (de Gier y col. 2006a).

La influencia de la nutrición en la función ovárica es mediada por cambios en niveles de hormonas metabólicas y de la superfamilia de factores de crecimiento (Sanchez de Gomez, 2006).

La ovulación está afectada por la interacción de hormonas esteroides, peptídicas, metabólicas y sustancias plasmáticas propias del metabolismo de cada uno de los nutrientes orgánicos que regulan la homeostasis ovárica. Los principales factores asociados con estos procesos son el factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1(IGF-1) y la insulina (LeRoith y col., 2001 ; Yakar y col., 2002).

El IGF-1 juega un importante papel en la foliculogénesis inducida por las gonadotrofinas, en la esteroidogénesis ovárica y en la función del cuerpo lúteo (CL), así como también modula la función hipofisaria e hipotalámica (Spicer y col, 2005).

El IGF-1 circulante se relaciona con la condición corporal del animal, reflejo del estado nutricional y los parámetros reproductivos.

La concentración sérica de IGF-1 depende de: el estímulo de la hormona de crecimiento, la insulina, el estado nutricional, la edad, la secreción de esteroides sexuales y la función hepática.

La insulina secretada por el páncreas ante aumentos posprandiales de la glucemia, provoca la captación rápida, almacenamiento y el aprovechamiento de la glucosa por casi todos los tejidos del organismo. La insulina en el ovario actúa sobre su propio receptor para modular la respuesta de las células de la granulosa a las gonadotropinas, aumentando la producción de estradiol (Shimizu y col., 2008).

Las acciones generales que desempeñan tanto IGF-1 como insulina en relación a los nutrientes, es que cumplen un papel regulador en el metabolismo energético intermediario y tienen un rol fundamental en la regulación de la concentración plasmática de los llamados indicadores metabólicos como son glucemia, colesterolemia, uremia, creatinemia y proteinemia (Muñoz y col., 2010).

La gran diversidad de razas que presenta la especie, además de las variaciones individuales muy marcadas en cuanto a los diferentes parámetros reproductivos acrecienta la necesidad de ampliar los conocimientos relacionados con hormonas implicadas en la ciclicidad y eventos de la vida reproductiva de la hembra como la ovulación.

Por todo lo expresado los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

Objetivo general:

- Relacionar la concentración plasmática de IGF-1, insulina e indicadores metabólicos durante el estro en relación con la ovulación en hembras caninas de diferente condición corporal.

Objetivos específicos:

-Determinar la concentración plasmática de IGF-1 durante la ovulación.

-Determinar la concentración plasmática de Insulina durante el estro en relación con la ovulación.

-Determinar la concentración plasmática de indicadores metabólicos (glucemia, colesterolemia, uremia, creatinemia y proteinemia) durante el estro en relación con la ovulación.

-Relacionar las concentraciones plasmáticas de Insulina, IGF-1 con la concentración plasmática de indicadores metabólicos durante el estro en relación con la ovulación.

-Relacionar las concentraciones plasmáticas de Insulina, IGF-1 con la condición corporal durante el estro en relación con la ovulación.

-Relacionar las concentraciones plasmáticas de indicadores metabólicos con la condición corporal durante el estro en relación con la ovulación.

-Comparar las concentraciones plasmáticas de IGF-1, insulina e indicadores metabólicos entre los grupos de diferente condición corporal durante el estro en relación con la ovulación.

HIPOTESIS

Los cambios característicos producidos en las hormonas reproductivas durante la ovulación se relacionan con cambios en los niveles circulantes de hormonas e indicadores metabólicos y presentan diferencias en animales de diferente condición corporal.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Características generales del ciclo estral canino

La hembra canina es una especie monoéstrica no estacional, politoca, los ciclos estrales no están determinados por las estaciones del año y en cada uno de ellos ovula varios óvulos (de Gier y col., 2006 a).

Cada ciclo estral presenta diferentes etapas: proestro, estro, diestro y anestro.

a) Proestro

Esta fase es considerada el comienzo del ciclo estral, se hace evidente desde el punto de vista clínico, el sangrado vaginal (metrorragia), que caracteriza a esta etapa, y constituye un signo fácilmente identificable. El proestro tiene una duración de 3 a 20 días, con un promedio de 9 días. En este período se produce hiperactividad folicular, la hormona que estimula este crecimiento es la folículo estimulante (FSH). Bajo su influencia los folículos en desarrollo empiezan a secretar estrógenos, hormona responsable de producir la conducta estral (Echeverría, 2005). En este momento, los niveles séricos de estrógenos superan los 15 pg/ml hasta llegar a un pico 24 a 48 h antes de la presentación del estro, luego comienzan a declinar progresivamente durante 5 a 9 días.

El final del proestro y comienzo del estro están caracterizados por que la progesteronemia se eleva por encima de una meseta crítica de 0,5 ng/ml, a la vez que la estrogenemia disminuye. Se producen cambios morfológicos y bioquímicos en las células de la teca interna y de la granulosa del folículo preovulatorio, que conocemos como luteinización preovulatoria. Bajo los efectos de los estrógenos inicialmente y de la progesterona luego, el endometrio cambia y se prepara para la implantación mediante un incremento marcado en el espesor de la pared y la actividad glandular (Concannon, 2011).

b) Estro

La duración de esta fase suele ser 5 a 9 días, 7 días promedio. Es el período de aceptación al macho. Considerando la observación de la conducta de la perra, comienza el primer día que acepta al macho, permite la monta, y finaliza cuando ya no acepta la cubrición (Hase y col,2000). La perra promedio exhibe una conducta estral característica de aceptación al macho cuando la estrogenemia declina y sube la progesteronemia (Concannon, 2009).

En esta fase se produce la ovulación, de tipo espontánea, hormonalmente inducida por la secreción en pico de estrógenos seguido por la secreción en pico de hormona luteinizante (LH). La LH inicia la cascada de eventos del proceso ovulatorio, en los folículos maduros, que culmina con la ruptura de los folículos y la liberación de ovocitos maduros susceptibles de ser fecundados.

Si estos folículos no tienen madurez suficiente para ovular, luego del pico de LH, se atresian. Los folículos ovulados se luteinizan con rapidez y adquieren la capacidad de síntesis y secreción de progesterona.

Con el desarrollo de los cuerpos lúteos funcionales, la progesterona se eleva durante un período de 1 a 3 semanas. De este modo, hormonalmente el estro es un período de progresiva caída de estradiol, paulatino ascenso de progesterona, y una breve liberación de LH (pico).

c) Diestro

Comienza cuando se observa que la hembra vuelve a rechazar al macho. Se asocia con la actividad lútea, es decir que se produce durante todo el período en que hay niveles de progesterona superiores a 2 ng/ml.

La prolactina es la principal hormona luteotrópica durante la fase lútea, tanto en perras gestantes como no gestantes, lo que significa que el cuerpo lúteo es estimulado por la presencia de dicha hormona para secretar cantidades adecuadas de progesterona (Wanke, 2002).

La duración del diestro es similar en hembras gestantes y no gestantes, la progesteronemia se mantiene elevada en ambos casos durante 58 a 78 días. Este periodo es conocido como pseudogestación.

En hembras gestantes la progesteronemia cae antes y más rápidamente en la cercanía del parto, el fenómeno de luteólisis es más completo y masivo y está a cargo de la prostaglandina F_{2α} como en otras especies. En la hembra no gestante la luteólisis no se produce por prostaglandinas, aunque los mecanismos que desencadenan este proceso aún no están del todo claros. Algunas hipótesis sugieren que el sistema inmunológico participaría en los mecanismos que regulan la función del cuerpo lúteo, ya que se observó un aumento de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ al principio y en el último tercio del diestro, así como la presencia de interleuquinas (IL): IL8, IL10, IL12, factor de necrosis tumoral (TNF) α y factor de

crecimiento (TGF) β 1, indicando que la luteólisis podría producirse como un mecanismo de interacción antígeno–anticuerpo, que provoca la apoptosis celular (Hoffmann y col., 2004).

La degeneración del cuerpo lúteo y el cese de la secreción de progesterona son considerados el final del diestro (Concannon y England, 2002).

d) Anestro

Este período transcurre entre el final del diestro y el comienzo del proestro del ciclo siguiente, comienza con la luteólisis y/o parición y finaliza en el proestro.

Al igual que con las otras etapas, el anestro tiene una duración variable, pero puede considerarse con una duración aproximada de 4,5 meses.

Clínicamente es el período de reposo reproductivo, pero con fluctuaciones hormonales. Los niveles de estrógeno oscilan entre 5-15 pg/ml y los de progesterona 0,5-1 ng/ml. La FSH es secretada durante las 2-3 semanas previas al inicio del proestro en pulsos de frecuencia creciente (Concannon, 2011).

II. 2. Ovulación

Se define como ovulación al conjunto de eventos bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que desencadenan la liberación del ovocito a partir del folículo preovulatorio presente en el estroma ovárico. Los eventos necesarios para que se produzca la ovulación abarcan cambios hormonales, donde está involucrada la LH y los estrógenos (Concannon, 2011). La LH inicia la cascada del proceso ovulatorio, en los folículos maduros, que culmina con la ruptura de los folículos y la liberación de los ovocitos. El término de ruptura folicular se aplica a los cambios asociados con la formación del estigma, la degradación y fisura de la pared folicular que permiten la liberación del ovocito (Aznar y col., 2007).

La ovulación ocurre como resultado de una interacción dinámica entre el pico de LH y factores locales como: esteroides, prostaglandinas, péptidos vasoactivos, metaloproteasas, interleuquinas y óxido nítrico (Kiener, 2010).

La endocrinología del período preovulatorio es particular, el pico de estrógenos es seguido por un pico de hormona luteinizante (LH) y éste por la ovulación en las 48-60 horas posteriores (Concannon, 2011). El pico de LH en la hembra canina es diferente, su duración es de 48 a 72 h y está acompañado por un pico de FSH, todo esto ocurre en presencia de aumentos progresivos de progesterona, que se producen por el fenómeno de luteinización

preovulatoria, la cual comienza a elevar la producción de progesterona en la periferia del folículo aún antes de la ovulación (Reynaud, 2009).

En el mecanismo molecular de la ovulación, está involucrado el pico preovulatorio de LH que provoca cambios en la estructura del folículo, en la actividad proliferativa y en la esteroidogénesis de las células de la granulosa. Estos cambios ocurren entre el pico de LH y la ovulación y se asocian con aumento en la cantidad de uniones estrechas, expresión y síntesis de receptores para factores de crecimiento y abundante actividad mitótica en las células de la granulosa (Shao y col., 2004).

Los cambios estructurales más importantes que dan paso a la ovulación, ocurren a nivel del tejido conectivo de la túnica albugínea y de la teca externa. Cuando se aproxima la ovulación, se observa la disolución de la matriz extracelular incluyendo las fibras de colágena de la teca. Estos cambios son acompañados de un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos, lo que provoca la salida de células sanguíneas y edema del tejido folicular. Por otra parte, las uniones comunicantes entre las células de la granulosa y el ovocito se pierden previos a la ovulación (Curry y col., 2006).

La ovulación es espontánea, por producirse dentro de las 36 a 48 horas posteriores al pico de LH donde se liberan los óvulos en fase de oocito primario, estos deben alcanzar su madurez para poder ser fertilizados (de Gier y col., 2006 b).

El oocito de perro es diferente comparado con los de otras especies domésticas, la maduración nuclear y citoplasmática se produce 48 a 72 h después de la ovulación, influenciada por la creciente progesteronemia, proceso que requiere 12 a 36 h más que en otras especies. En la mayoría de los mamíferos el pico de LH representa la señal preovulatoria para la reanudación de la meiosis en el oocito, en caninos el oocito es ovulado en el comienzo de la primera división meiótica, lo que determina que la maduración se lleve a cabo en el oviducto. Después de la ovulación los oocitos pueden permanecer fertilizables durante un tiempo significativo, hasta 5 días, e incluso hasta después del cierre del cuello del útero (Hasegan y col., 2012).

Los métodos más utilizados para determinar el momento de ovulación en las perras incluyen:

1. Observación de cambios físicos
2. Evaluación de la conducta

3. Cambios en la citología vaginal

4. Determinación de concentraciones hormonales.

1. Observación de cambios físicos:

Durante el proestro el tracto reproductivo se edematiza, la vulva y tejidos perineales aumentan de tamaño, aumenta la turgencia como respuesta al aumento de estrógenos. En el momento del pico de LH, la concentración plasmática de estrógenos comienza a disminuir, combinándose con el aumento progresivo de la progesterona. Con este cambio hormonal se produce una reducción en el edema del tracto genital que trae aparejada la reducción de la turgencia y tamaño vulvar, además de cambios en el color de la descarga vaginal, de características serosanguinolenta a color pajizo durante comienzo del celo (Nishiyama y col., 2000). De todas maneras los signos son muy variables en los distintos individuos y se correlacionan escasamente con la ovulación (Hewitt y England, 2000).

2. Evaluación de la conducta:

En ciertas especies domésticas el inicio de los signos conductuales de estro se pueden utilizar para determinar el momento óptimo del servicio. Las perras pueden ovular en cualquier momento, desde 2 días antes hasta 6 días después del comienzo del celo (Concannon, 2009). Sin embargo, a menudo, la correlación entre los eventos endocrinos y los cambios conductuales es escasa en la perra.

3. Citología vaginal:

Durante las diferentes fases del ciclo estral se encuentran células parabasales, intermedias, superficiales y anucleadas dependiendo del estímulo hormonal. Con el incremento de la concentración de estrógenos se produce un aumento en el número de capas celulares de los epitelios, que trae aparejado un engrosamiento de la mucosa vaginal. Ésta, cambia de epitelio bajo, cuboidal a un epitelio estratificado, queratinizado escamoso. Durante esta transición, las células superficiales, se modifican en forma, tamaño, y características tintoriales, llegando a ser más grandes e irregulares. Las células intermedias son células escamosas planas todavía nucleadas y además se encuentran las células o escamas anucleares, estadio final de la cornificación celular, también llamadas células superficiales (Stornelli y col., 2006). Estas últimas se caracterizan por no tener un núcleo visible o sólo un remanente nuclear picnótico débil y/o pequeño. Las proporciones relativas de cada tipo celular son marcadores de los cambios endocrinos, particularmente, las concentraciones crecientes de estrógenos. La

queratinización generalmente ocurre antes del pico de LH (Malandian y Fontbonne, 2006). El estro, o celo se define citológicamente como la cornificación completa, con más del 60 % de las células anucleadas. Existe escasa correlación entre la ovulación y el comienzo del estro citológico.

El comienzo del diestro citológico, caracterizado por un abrupto y completo retorno a la presencia de células no cornificadas, ocurre 6 días después de la ovulación, permitiendo una evaluación retrospectiva del día de la ovulación (Moxon y col., 2010).

4. Determinación de la concentración de hormonas:

Los ensayos hormonales son las mediciones más exactas para determinar el momento de la ovulación, las hormonas analizadas comúnmente para el manejo reproductivo canino son LH y progesterona. Se pueden medir tanto en suero como en plasma.

Determinación de la concentración de LH:

Es la hormona específica para determinar el momento de ovulación, que se va a producir 2 días después del pico de LH, y este es un parámetro poco variable en todas las perras. (Concannon, 2011). Debido a que la duración del pico de LH promedia aproximadamente entre 1 y 3 días, las muestras deben ser tomadas cada 12 horas o por lo menos una vez al día, aproximadamente a la misma hora. Se considera rango de referencia para el pico de valor de LH 13,4 a 42,3 ng/ml con un promedio de 24,8 ng/ml mientras que las concentraciones previas al pico de LH son de 7 ng/ml a 9,1 ng/ml y las concentraciones posteriores se encuentran entre 5,8 a 2,4 ng/ml a las 6 y 12 horas posteriores al pico de LH respectivamente (Concannon, 2011).

La medición de la concentración de LH en el plasma periférico es una determinación confiable y exacta, existen diferentes métodos entre los cuales encontramos: RIA (radioinmunoanálisis), quimioluminiscencia, o ensayo ELISA semi-cuantitativo (Root Kustritz, 2001).

5. Determinación de la concentración de progesterona:

La concentración plasmática de progesterona comienza a incrementarse rápidamente desde el valor basal, aproximadamente 2 días antes de la ovulación, durante el pico de LH (de Gier y col., 2006 a). El monitoreo seriado de las concentraciones de progesterona plasmática permite estimar 1 o 2 días antes el momento de ovulación, o después de producida, confirmarla. Debido a que el ascenso de la progesterona es progresivo permite tomar

muestras cada 2 días. (Concannon, 2009). Cuando la concentración de progesterona del plasma alcanza y supera, los 2 ng/ml (6,5 nmol/l) se considera que ya ha ocurrido el pico de LH.

Las concentraciones de progesterona descritas respecto al pico de LH fueron las siguientes:

	Progesterona ng/ml
Dos días antes del pico de LH	0,53 ± 0,07
Un día antes del pico de LH	0,67 ± 0,09
En el momento del pico de LH	0,96 ± 0,06
Un día después del pico de LH	1,56 ± 0,15
Cuatro días posteriores al pico de LH	7,63 ± 0,82

Cuadro 1: Concentraciones de progesterona plasmática alrededor del momento del pico de LH.

La progesterona se puede determinar mediante análisis RIA (radio inmuno análisis), ELISA (ensayo cuantitativo inmunoabsorbente ligado a enzimas), o ensayos de inmuno quimioluminiscencia. El análisis RIA es el método más específico y sensible (Root Kustritz, 2001).

II. 3. Relación entre la reproducción y el metabolismo:

La homeostasis metabólica y los procesos reproductivos en un individuo están regulados por hormonas, estas hormonas modifican o modulan los procesos bioquímicos necesarios para que se lleven a cabo.

a) Factor de crecimiento análogo a insulina (IGF-1):

El eje somatotrópico regula el metabolismo celular y es esencial para el desarrollo somático del organismo. Integra numerosas hormonas, como hormonas metabólicas, leptina, hormonas esteroideas sexuales. Es un componente esencial en la comunicación química entre procesos metabólicos e ingesta de nutrientes (LeRoith y col., 2001; Yakar y col.,2002). El eje somatotrópico responde a la disponibilidad de energía alimentaria, al permitir la movilización energética y promover el crecimiento físico en periodos de energía adicional.

Aunque está constituido por diversas hormonas, los principales componentes del eje son tres: los factores de crecimiento análogos a la insulina, tipos 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2), la insulina, la hormona de crecimiento (GH) (Sanchez de Gómez, 2006).

La cuantificación de la GH se dificulta debido, en primer lugar, a su liberación episódica hacia la circulación sistémica y en segundo lugar, a su corta vida media en sangre, unos 20 minutos. Uno de los sitios de acción de la GH es el hígado, donde induce la síntesis de IGF-1. La cuantificación de este factor, por tanto, se considera un marcador fiable de la función hipofisaria y de la actividad del eje somatotrópico (Muñoz y col, 2010).

El tiempo de unión del IGF-1 con sus proteínas transportadoras en el torrente sanguíneo es prolongado (Graaf-Roelfsema y col., 2007). Por tanto, los efectos somatogénicos de la GH se encuentran mediados por el IGF-1.

Los principales efectos biológicos del IGF-1 se manifiestan en el sistema músculo-esquelético, sistema nervioso, órganos reproductores, a nivel hematopoyético e inmunológico y cardiovascular (Muñoz y col, 2010).

b) Relación entre IGF-1 y la función reproductiva

El sistema de factores análogos a insulina es primordial en la regulación intraovárica, para desarrollo exitoso de un oocito sano y una apropiada esteroidogénesis en las células de la granulosa y la teca, durante el ciclo estral (Rodríguez y col., 2013).

La activación de los receptores hipotalámicos para IGF-1 permite el normal desarrollo del pico de secreción de gonadotrofinas inducido por estradiol. El deterioro de este mecanismo marca el inicio de la declinación de la función reproductiva (Monget y col., 2002).

Numerosas investigaciones señalan que algunos procesos regulados por el estradiol requieren de la activación concomitante de señales mediadas por los receptores de IGF-1. Ambos receptores, los estrogénicos y los del IGF-1, se localizan en forma conjunta en las neuronas y en la glía cerebral. Asimismo, las neuronas hipotalámicas secretoras de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) expresan receptores para el IGF-1.

El IGF-1 actúa en el hipotálamo y, así, modula el pico de LH inducido por el estradiol (Todd y col., 2010).

Las concentraciones de IGF-1 están supeditadas a numerosos factores, como especie, tamaño corporal, raza, edad, sexo, momento de extracción de la muestra, ritmos circadianos, dieta, privación de comida, ejercicio, entrenamiento y ciertos estados patológicos.

Se ha demostrado que el IGF-1 favorece el desarrollo folicular en las hembras bovinas (Chun y col., 1994). Spicer y col. (2005) observaron que las concentraciones de IGF-1 en el líquido folicular de yeguas de los folículos grandes durante la fase folicular, eran

significativamente superiores a las encontradas durante el diestro de la misma manera que para folículos pequeños y medianos, tanto en proestro, estro y diestro. Estos datos sugirieron que el aumento de IGF-1 a nivel intrafolicular se asocia a una potenciación de la esteroidogénesis (Spicer y col., 2005).

En vacas el IGF-1 y la insulina presentes en la circulación y en el líquido folicular regulan la mitosis y la esteroidogénesis folicular, aumentando el número de receptores para la FSH y además induce el aumento de la actividad aromatasa principalmente en folículos grandes (Spicer y col., 2002). Esto evidencia el sinergismo entre la acción de IGF-1 e insulina y las gonadotropinas en el ovario (Mazerbourg y col., 2003).

En rumiantes el principal factor que regula la insulinogénesis es la glucemia. Tanto la glucosa como los esqueletos carbonados de aminoácidos, insulina y el IGF-1, pueden modular la tasa de ovulación independientemente de las concentraciones plasmáticas de la hormona folículo estimulante (FSH) por efectos directos en el ovario sobre el desarrollo folicular (Lenz Souza y col., 2007).

En la hembra canina no hay información suficiente sobre los efectos de estos factores y hormonas en la foliculogénesis ovárica.

c) IGF-1, Talla y Condición corporal

En perros y cerdos, se ha visto una correlación positiva entre tamaño corporal y la concentración plasmática de IGF-1. Los perros Pastor Alemán tienen concentraciones de IGF-1 superiores a otras razas más pequeñas, los valores sanguíneos de IGF-1 en perros se encuentran entre 50 ng/ml hasta 800 ng/ml dependiendo de la talla y la edad. (Eigenmann y col., 1984). Igualmente, las concentraciones de IGF-1 son menores en cerdos miniatura en comparación con cerdos de tamaño estándar (Buonomo y col., 1987).

En las perras existe correlación positiva entre las concentraciones plasmáticas e intrafoliculares de IGF-1 y a su vez éstas se correlacionan con la altura y el peso. Las concentraciones de IGF-1 fueron tres veces mayores en perras grandes en comparación con perras pequeñas. Estas diferencias se asociaron con aspectos funcionales de los folículos ováricos (Reynaud y col., 2010).

La condición corporal estima la proporción de grasa presente en el individuo, de una forma observacional en el que se utiliza una tabla para poder categorizar cada animal según su aspecto externo, llamado el Sistema de índice de condición corporal (BCS) (Freeman y

col., 2010). El nivel nutricional afecta los procesos involucrados en el desarrollo folicular y tasa ovulatoria de los rumiantes, particularmente a través de cambios en peso vivo (PV) y condición corporal (CC). Cabras con baja CC mostraron menor concentración sérica de IGF-I y menor actividad ovárica, coincidiendo con lo reportado por Williams y col. (2001), que luego de largos períodos de restricción nutricional o durante la movilización de tejido adiposo y muscular con pérdida de la CC, se afecta la función ovárica por la acción fisiológica de metabolitos y hormonas en el ovario. (Guerra-García y col, 2009).

En perros obesos la concentración sérica de IGF-1 se encuentra considerablemente elevada y se correlaciona con hiperinsulinemia postprandial probablemente relacionada con la resistencia insulínica que se presenta en la obesidad, aunque no se pudo establecer una correlación entre IGF-1 y peso (Muñoz y col.,2010).

d) Relación entre IGF-1, insulina y marcadores metabólicos

El IGF-1, ejerce acciones sobre el metabolismo, pero al parecer sólo en concentraciones altas, y sus efectos metabólicos son similares a la insulina. En las células musculares estimula la producción de proteínas y otros componentes celulares, mientras que en el tejido adiposo potencia el uso de la grasa como fuente de energía. En otros tejidos, el IGF-1 inhibe la transferencia de glucosa a través de la membrana celular por parte de la insulina. Como consecuencia, las células utilizan grasas para obtener energía. Estas acciones metabólicas están relacionadas con determinadas situaciones nutricionales y algunas respuestas sistémicas generales (Sanchez de Gómez, 2006). En una dieta normal, la glucosa y los aminoácidos absorbidos tras la digestión suponen un estímulo para la liberación de insulina la cual favorece una hipoglucemia que junto con la presencia de los aminoácidos en el plasma, estimulan la secreción de hormona de crecimiento. Estas acciones promueven el crecimiento, pues se dispone del IGF-1 hepático gracias a la presencia de insulina.

La insulina tiene un efecto estimulador sobre la síntesis y secreción de GH. Además su acción hipoglucemiante es un estímulo importante directo sobre el control hipotalámico de su síntesis y secreción.

Los combustibles metabólicos ejercen su principal efecto a nivel hipotalámico. La disminución de proteínas plasmáticas ha sido largamente reconocida por disminuir la secreción de GH (Muñoz y col., 2010).

Alteraciones en el metabolismo de la glucosa modifican la secreción de GH; la hiperglucemia incrementa su secreción y la hipoglucemia inducida por insulina, la aumenta en humanos. Cambios en la concentración plasmática de los ácidos grasos libres o no esterificados (NEFA), también pueden afectar la secreción de GH. Incrementos de NEFA, suprimen la liberación de GH, y descensos, la aumentan. Las elevaciones de NEFA en el suero, bloquea los efectos de la GHRH en la liberación de GH, además de intervenir en la liberación de IGF-1 inducida por GH (Gayet y col., 2004).

La movilización grasa y el aumento de amoníaco reducen significativamente la tasa de gluconeogénesis y por ende la glucemia, conduciendo en último término a una disminución marcada de las concentraciones plasmáticas de insulina e IGF-1. Tratando de establecer relaciones de asociación entre los indicadores metabólicos y parámetros reproductivos deficientes, se encontró que un gran porcentaje de rodeos con problemas reproductivos presentaban valores bajos de glucemia y valores plasmáticos de urea superiores al valor de referencia.

La insulina, hormona del crecimiento (GH) e IGF-1, tienen un papel importante en el metabolismo energético intermediario y están nutricionalmente regulados (Galvis Góez y Correa Cardona, 2002).

El IGF-1 funciona como un estimador indirecto de la relación nutrición - reproducción, es una señal de monitorización que permite evaluar la reproducción en bovinos (Velásquez, 2008).

En caninos las relaciones entre cada uno de los indicadores metabólicos con el IGF-1 y a su vez con hormonas reproductivas no está establecido por completo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. 1) Animales:

Se utilizaron doce hembras caninas mestizas con una talla comprendida entre 35 y 40 cm de altura a la cruz, con edades entre 2 y 5 años que presentaban actividad cíclica regular, con diferente condición corporal.

La actividad cíclica se comprobó por observación de los cambios en el tamaño de la vulva, la presencia de sangrado y citología vaginal.

a) Citología vaginal:

Etapa 1: Determinación del inicio del proestro: Observación diaria hasta agrandamiento del tamaño vulvar e inicio del sangrado.

Etapa 2: Desde el primer día de la observación del sangrado vulvar, las muestras de sangre se tomaron una vez por día simultáneamente se obtuvo una muestra para citología vaginal, hasta que el porcentaje de células anucleadas observadas en la citología vaginal supere el 60%.

Etapa 3: Desde que el porcentaje de células anucleadas observadas en la citología vaginal supere el 60% hasta la observación citológica característica del primer día de diestro se tomaron tres muestras de sangre y citología diarias.

Etapa 4: Desde la observación de citología característica de primer día de diestro y por cuatro días se tomó una muestra diaria de sangre y citología vaginal.

b) Obtención de muestras de sangre:

En todos los casos, se extrajeron tres (3) ml de sangre de la vena cefálica, con agujas 25/8. Se utilizó EDTA como anticoagulante. Las muestras de sangre fueron centrifugadas para separar el plasma, el cual se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

c) Determinación de la condición corporal:

Para dividir los grupos se verificó la condición corporal de los animales.

Para medir la condición corporal se utilizó el Sistema de índice de condición corporal (BCS) (Freeman y col.; 2010).

En el grupo N° 1 se incluyeron hembras caninas con condición corporal 4 y 5 (condición corporal ideal) y en el grupo N° 2 se incluyeron hembras caninas con condición corporal 6 y 7 (condición corporal con mayor proporción de grasa corporal) según BCS.

Los animales fueron mantenidos en caniles individuales, en el lugar de experimentación mientras duró el estudio y alimentados con dieta comercial (Según cuadro 2)

Composición de la dieta	Variación porcentual (%)
Proteínas	20
Grasa	9
Fibra	4
Calcio	1
Fósforo	0,6
Minerales	10
Humedad	12
Cenizas	2,2
Kcal/EM/Kg materia seca	3100

Cuadro 2: Composición de la dieta comercial suministrada a los animales.

Se proporcionó el alimento una vez por día (en horario programado después de la extracción de sangre) a razón de 132 Kcal de Energía Metabolizable * Kg de peso metabólico (PV^{0.75}) con la finalidad de mantener el estado corporal inicial. El suministro de agua fue a voluntad.

d) Determinaciones en plasma:

- Determinación de hormonas reproductivas en plasma:

Se determinó la concentración plasmática de Hormona luteinizante (LH): por radioinmunoensayo RIA (Root Kustritz, 2001) y la concentración plasmática de Progesterona (P): por enzimoimmunoensayo (ELISA) (Root Kustritz, 2001).

- Determinaciones de hormonas metabólicas en plasma:

Las concentraciones plasmáticas de Insulina (Yallow y Solomon, 1960) y la de IGF- 1 (Bowsher, 1991) fueron determinadas mediante radioinmunoensayo.

- Determinaciones de metabolitos en plasma:

Se determinó la concentración plasmática de Glucosa, Triglicéridos, Colesterol, Proteínas totales: por método enzimático. (Bush, 1982) (Wildeman y col., 2007).

Se determinó la concentración plasmática de Urea: por método de Berthelot modificado y la concentración plasmática de creatinina por método colorimétrico (Valdéz Diez y col.; 1997).

A.2) Diseño Experimental y Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron cargados en una planilla de cálculo de Excel, donde se obtuvieron los valores promedio y desvío estándar (DS) para cada determinación en cada fase del ciclo estral en cada grupo.

Se utilizó un diseño factorial de 2x3 (dos grupos de diferente condición corporal y 3 etapas correspondientes a diferentes estadios del ciclo reproductivo).

El análisis estadístico se realizó mediante el sistema R Commander (Fox,J 2005).

Se utilizó un modelo lineal mixto para analizar las interrelaciones entre variables durante el estro, en el caso de glucemia, proteínas y colesterol.

Para analizar las interrelaciones entre variables como triglicéridos, IGF-1, uremia se utilizó un Modelo mixto lineal generalizado por aproximación de Laplace. Los términos se consideraron significativos si el intervalo de confianza no incluyó el 0.

Dividiéndolos en ambos casos en grupo de condición corporal baja (4-5) y grupo de condición corporal alta (6-7).

Para la diferenciar la duración del estro entre grupos se utilizó el test no paramétrico de Mann Whitney Wilcoxon.

El número total de observaciones analizadas fue de 182 para un n=12

IV. RESULTADOS

a) Estadística descriptiva

Los resultados promedio y desvío estándar (DS) de las hormonas e indicadores metabólicos determinadas en el proestro se muestran en las tablas 1(a y b) y 2 (a y b) para el grupo 1 y 2 respectivamente.

Hormonas	Promedio \pm DS
LH (ng/ml)	1.74 \pm 3.19
Progesterona (ng/ml)	0.24 \pm 0.19
Insulina (ng/ml)	0.41 \pm 0.19
IGF-1(ng/ml)	116.47 \pm 50.39

Tabla 1 (a): Concentraciones promedio y DS de hormonas determinados durante el proestro en el Grupo1 CC 4-5.

Indicadores metabólicos	Promedio \pm DS
Glucemia (mg/dl)	94,02 \pm 18,6
Proteinemia (gr/dl)	6,67 \pm 0,84
Uremia (mg/dl)	9,97 \pm 4,22
Creatinemia (mg/l)	11,09 \pm 1,40
Triglicéridos (mg/dl)	120,19 \pm 99,84
Colesterol (mg/dl)	143,85 \pm 28,80

Tabla 1 (b): Concentraciones promedio y DS de indicadores metabólicos determinados durante el proestro en el Grupo1 CC 4-5.

Hormonas	Promedio ± DS
LH (ng/ml)	0,76 ± 0,84
Progesterona (ng/ml)	0.22 ± 0.19
Insulina (ng/ml)	0.22 ± 0.19
IGF-1(ng/ml)	50,97 ± 16,35

Tabla 2 (a): Concentraciones promedio y DS de hormonas determinados durante el proestro en el grupo 2 CC 6-7

Indicadores metabólicos	Promedio ± DS
Glucemia (mg/dl)	69,3 ± 6,7
Proteinemia (gr/dl)	6,6 ± 0,7
Uremia (mg/dl)	22,3 ± 8,2
Creatinemia (mg/l)	9,8 ± 30,4
Triglicéridos (mg/dl)	104,2 ± 61,2
Colesterol (mg/dl)	169,5 ± 15,2

Tabla 2 (b): Concentraciones promedio y DS de indicadores metabólicos determinados durante el proestro en el grupo 2 CC 6-7.

Los resultados promedio y DS, de las hormonas e indicadores metabólicos determinados en el estro se muestran en las tablas 3 (a y b) y 4 (a y b) para el grupo 1 y 2 respectivamente.

Hormonas	Promedio ± DS
LH (ng/ml)	8,52 ± 9,43
Progesterona (ng/ml)	2,59 ± 2,49
Insulina (ng/ml)	0.34 ± 0.13
IGF-1(ng/ml)	130,25 ± 63,15

Tabla 3 (a): Concentraciones promedio y DS de hormonas determinadas durante el estro en el grupo 1 CC 4-5.

Indicadores metabólicos	Promedio ± DS
Glucemia (mg/dl)	82,08 ± 11,3
Proteinemia (gr/dl)	6,96 ± 0,76
Uremia (mg/dl)	23,04 ± 13,80
Creatinemia (mg/l)	13,40 ± 1,59
Triglicéridos (mg/dl)	87,68 ± 62,6
Colesterol (mg/dl)	156,07 ± 19,5

Tabla 3 (b): Concentraciones promedio y DS de indicadores metabólicos determinados durante el estro en el grupo 1 CC 4-5.

Hormonas	Promedio ± DS
LH (ng/ml)	9,58 ± 7,31
Progesterona (ng/ml)	1,84 ± 1,91
Insulina (ng/ml)	0.21 ± 0.074
IGF-1(ng/ml)	53,72 ± 36,76

Tabla 4 (a): Concentraciones promedio y DS de hormonas determinadas durante el estro en el grupo 2 CC 6 - 7

Indicadores metabólicos	Promedio ± DS
Glucemia (mg/dl)	71,1 ± 10,9
Proteinemia (gr/dl)	6,8 ± 0,4
Uremia (mg/dl)	21,7 ± 5,8
Creatinemia (mg/l)	13,40 ± 1,59
Triglicéridos (mg/dl)	10,06 ± 1,8
Colesterol (mg/dl)	82,6 ± 60,3

Tabla 4 (b): Concentraciones promedio y DS de indicadores metabólicos determinados durante el estro en el grupo 2 CC 6 – 7.

La concentración promedio del pico de LH en el grupo 1 CC 4-5 fue de 24,6 ng/ml, registrándose 16,9 ng/ml 12 horas antes del pico de LH y 20,26 ng/ml 12 horas después del pico de LH, el valor promedio hallado 24 horas después del pico fue de 11,7 ng/ml. En el grupo 2 CC 6-7 la concentración promedio del pico de LH fue de 23,9 ng/ml; 15,9 ng/ml fue la concentración 12 horas previas al pico de LH; 17,8 ng/ml y 11,2 ng/ml, 12 y 24 horas posteriores al pico de LH respectivamente.

En el momento de la ovulación, 48 horas posteriores al pico de LH, las concentraciones promedios y DS de las hormonas reproductivas, metabólicas e indicadores metabólicos, determinadas en ambos grupos, se muestran en la tabla 5.

	Grupo 1 CC 4-5	Grupo 2 CC 6-7
LH (ng/ml)	2,85 ± 1,07	6,4 ± 3,14
Progesterona (ng/ml)	3,30 ± 2,90	2,27 ± 0,28
Insulina (ng/ml)	0,32 ± 0,2	0,26 ± 0,05
IGF-1 (ng/ml)	143,60 ± 94,21	33,31 ± 14,98
Glucemia (mg/dl)	84,80 ± 13,06	73,45 ± 8,97
Proteínas (gr/dl)	7,3 ± 0,64	6,73 ± 0,23
Uremia (mg/dl)	16,98 ± 12,98	17,66 ± 3,88
Creatinina (mg/l)	14,8 ± 3,05	9,10 ± 0,47
Colesterol (mg/dl)	118,14 ± 46,28	151,43 ± 22,38
Triglicéridos (mg/dl)	195,80 ± 95,20	33,28 ± 7,32

Tabla 5: Concentraciones promedio y DS de hormonas reproductivas, metabólicas e indicadores metabólicos determinados en el grupo 1 y en el grupo 2 en el momento de la ovulación.

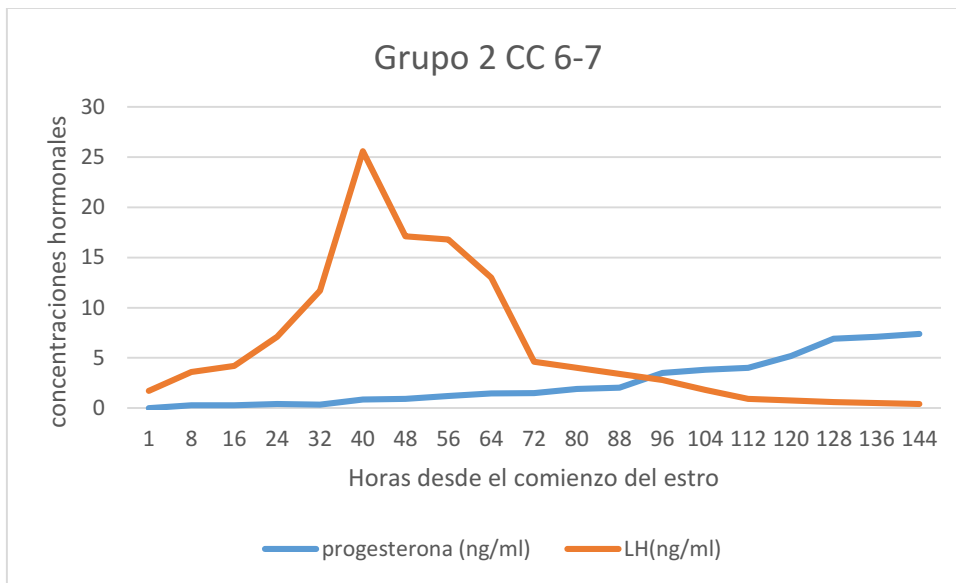


Gráfico 1: Variaciones en las concentraciones de LH y progesterona durante el estro en el grupo 2.

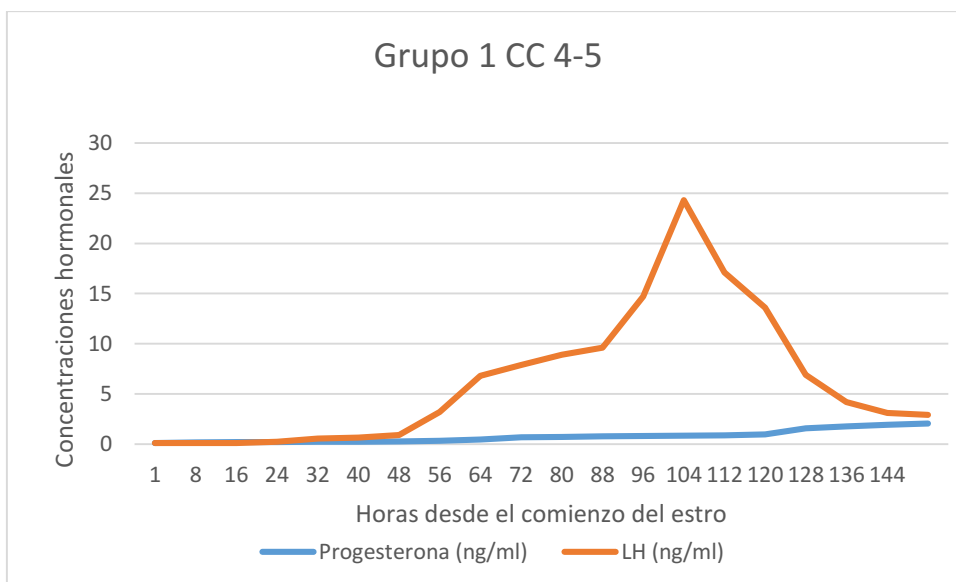


Gráfico 2: Variaciones en las concentraciones de LH y progesterona durante el estro en el grupo 1.

Las tablas 6 (a y b) y 7 (a y b) muestran los resultados promedio y DS, de cada hormona e indicador metabólico determinados en el diestro para el grupo 1 y 2 respectivamente.

Hormonas	Promedio ± DS
LH (ng/ml)	0,325 ± 0,33
Progesterona (ng/ml)	14,50 ± 14,50
Insulina (ng/ml)	0.31 ± 0.15
IGF-1(ng/ml)	133,28 ± 189,16

Tabla 6 (a): Concentraciones promedio y DS de hormonas determinadas en el diestro en el grupo 1 CC 4-5.

Indicadores metabólicos	Promedio ± DS
Glucemia (mg/dl)	74,80 ± 14,30
Proteinemia (gr/dl)	7,06 ± 1,09
Uremia (mg/dl)	16,41 ± 7,86
Creatinemia (mg/l)	13,40 ± 1,38
Triglicéridos (mg/dl)	92,63 ± 58,8
Colesterol (mg/dl)	153,85 ± 16,6

Tabla 6 (b): Concentraciones promedio y DS de indicadores metabólicos determinados en el diestro en el grupo 1 CC 4-5.

Hormonas	Promedio ± DS
LH (ng/ml)	1,10 ± 1,19
Progesterona (ng/ml)	15,49 ± 6,39
Insulina (ng/ml)	0.28 ± 0.09
IGF-1(ng/ml)	57,41 ± 36,28

Tabla 7 (a): Concentraciones promedio y DS de hormonas determinadas durante el diestro en el grupo 2 CC 6 – 7.

--	--

Indicadores metabólicos	Promedio ± DS
Glucemia (mg/dl)	75,05 ± 10,09
Proteinemia (gr/dl)	6,9 ± 0,4
Uremia (mg/dl)	26,2 ± 8,6
Creatinemia (mg/l)	8,3 ± 2,2
Triglicéridos (mg/dl)	95,4 ± 53,9
Colesterol (mg/dl)	162,9 ± 24,4

Tabla 7 (b): Concentraciones promedio y DS indicadores metabólicos determinados durante el diestro en el grupo 2 CC 6 – 7.

b) Relación entre variables

Las variables que mostraron relación, en las cercanías del momento de la ovulación fueron:

✓ Condición Corporal y duración del ciclo estral:

La duración del ciclo estral muestra diferencias entre el grupo 1 y grupo 2 de diferente condición corporal. Utilizando el test de Mann Whitney Wilcoxon se compararon ambos grupos de diferente condición corporal, en este caso la hipótesis alternativa es que el período de estro en los animales del grupo 2 CC 6-7 es menor que los del grupo 1 CC 4-5 (p- valor: 0,004238). Dado que p es menor a 0.05 se rechaza la H0.

✓ Variables asociadas a la glucemia:

La concentración de glucosa en sangre se relacionó de manera positiva con la concentración de LH, y mostró diferencias en los distintos grupos de condición corporal. (Tabla 8).

	Estimador	Error estándar	t valor	LI IC 95% ¹	LS IC 95% ²
Intercepto	67.474908	2.705844	24.937	62.171454	72.778362
Cond .corp (bajo)*	7.358258	2.40142	3.064	2.6514748	12.065041
LH ²	-0.017671	0.007579	-2.332	-0.032526	-0.002816
LH	0.55205	0.273183	2.021	0.0166113	1.0874887
LH: cond. corp (bajo)	0.452455	0.193	2.344	0.074175	0.830735
Insulina	4.417521	7.511619	0.588	-10.30525	19.140294

Referencias: Los términos significativos se muestran en negrita.

1: Límite inferior del intervalo de confianza al 95%; 2: Límite superior del intervalo de confianza al 95%;

*Condición corporal de referencia: alto.

Tabla 8: modelo lineal mixto de las variables asociadas a los niveles de glucemia en cercanías de la ovulación.

✓ Variables asociadas a los niveles de LH

Se evidencia que la relación entre IGF-1 y LH es inversa, a mayores niveles de LH menores niveles de IGF-1.

	Estimador	Error Estándar	z valor	LI IC 95 % ^{1*}	LS IC 95 % ^{2*}
Intecepto	2.2012333	0.1158889	18.994	1.9740911	2.4283755
Cond. Corp (bajo)*	-0.512194	0.180243	-3.008	-0.865471	-0.158918
IGF 1²_{t-1}	-0.001424	0.0005502	-2.588	-0.002502	-0.000346
Intervalo²	-0.026655	0.0020216	-13.186	-0.030618	-0.022693
Intervalo	-0.261353	0.0198472	-13.168	-0.300253	-0.222452
Intervalo: Cond. Corp (bajo)*	-0.164099	0.038555	-4.256	-0.239666	-0.088531
Intervalo²: Cond. Corp (bajo)*	-0.00777	0.0039685	-1.958	-0.015548	8.06E-06

Referencias: Los términos significativos se muestran en negrita.

1: Límite inferior del intervalo de confianza al 95%; 2: Límite superior del intervalo de confianza al 95%;

*Condición corporal de referencia: alto.

Tabla 9: Modelo lineal generalizado (distribución de Poisson) mixto de las variables asociadas con los niveles de LH en cercanías de la ovulación.

✓ VARIABLES ASOCIADAS CON LOS NIVELES DE IGF-1.

Como se muestra en la Tabla 10 la relación del IGF-1, progesterona y colesterol es inversa, a mayores niveles de IGF-1, menores concentraciones tanto de progesterona como de colesterol en ambos grupos. Los animales del grupo 1 CC 4-5 presentan concentraciones más elevadas de IGF-1 que los del grupo 2 CC 6-7.

	Estimador	Error estándar	z valor	LI IC 95% ¹	LS IC 95% ²
Intercepto	4.1781557	0.0878885	47.54	4.00589	4.35042
Cond. corp (bajo)*	1.2124602	0.0650461	18.64	1.08497	1.33995
Colesterol	- 0.0017279	0.0004159	-4.15	-0.00254	-0.00091
Progesterona cond. corp (bajo)*:	-0.068518	0.019553	-3.5	-0.10684	-0.03019
Progesterona Intervalo ²	- 0.0281879	0.0128621	-2.19	-0.05340	-0.00298
Intervalo ² : cond. Corp (bajo)*	0.0063476	0.0005514	11.51	0.00527	0.00743
Intervalo	- 0.0039335	0.000401	-9.81	-0.00472	-0.00315
	0.0317933	0.0089454	3.55	0.01426	0.04933

Referencias: Los términos significativos se muestran en negrita.

1: Límite inferior del intervalo de confianza al 95%; 2: Límite superior del intervalo de confianza al 95%;

*Condición corporal de referencia: alto.

Tabla 10: Modelo mixto lineal generalizado (distribución de Poisson) de las variables asociadas a los niveles de IGF 1 en cercanías de la ovulación.

✓ Uremia:

La relación entre IGF-1 y la uremia es inversa, independientemente de la condición corporal de los animales. A medida que transcurre el tiempo en el período de estro, los niveles de uremia disminuyen, esto es más pronunciado en los animales de baja condición corporal. (Tabla 11)

	Estimador	Error estándar	t valor	LI IC 95% ¹	LS IC 95% ²
intercepto	3.0531799	0.0708285	43.11	2.91436	3.19200
cond. Corp (bajo)*	0.0249301	0.1015941	0.25	-0.17419	0.22405
Intervalo	-	0.0047716	-2.91	-0.02324	-0.00454
Intervalo : cond. Corp (bajo)*	-	0.0071374	-8.39	-0.07390	-0.04592
IGF-1_{t-1}	-	0.0003195	-2.48	-0.00142	-0.00017

Referencias: Los términos significativos se muestran en negrita.

1: Límite inferior del intervalo de confianza al 95%; 2: Límite superior del intervalo de confianza al 95%;

*Condición corporal de referencia: alto.

Tabla 11: modelo mixto lineal generalizado (distribución de Poisson) de las variables que se hallaron asociadas con los niveles de uremia en cercanías de la ovulación.

✓ Variables asociadas con la proteinemia

La concentración de proteínas presenta diferencias entre los diferentes grupos de condición corporal (Tabla 12).

La concentración de progesterona se asocia positivamente con los niveles de proteínas. Este efecto de la progesterona sobre las proteínas se ve modificado a lo largo del período del estro. (Tabla 12).

	Estimador	Error estándar	t value	LI IC 95% *1	LS IC 95% *2
Intercepto	6.65627	0.1147579	58	6.4313445	6.8811955
Progesterona intervalo ²	0.1126008	0.414901	2.71	-0.700605	0.9258068
cond. corp (bajo)*	0.3055607	0.1211972	2.52	0.0680142	0.5431072
Progesterona :intervalo ² intervalo ² : : cond. Corp (bajo)*	-0.002124	0.0009462	-2.24	-0.003978	-0.000269
	-0.00489	0.002281	-2.14	-0.009361	-0.000419

Referencias: Los términos significativos se muestran en negrita.

*1: Límite inferior del intervalo de confianza al 95%; *2: Límite superior del intervalo de confianza al 95%;

*Condición corporal de referencia: alto.

Tabla 12: Modelo lineal mixto de las variables que están asociadas con los niveles de proteína en sangre en cercanías de la ovulación.

✓ Colesterol:

Se observan diferencias entre la relación de triglicéridos y colesterol en los distintos grupos de CC (Tabla 13)

	Estimador	Error estándar	t valor	LI IC 95% *1	LS IC 95% *2
Intercepto	165.506	3.65824	45.24	158.335	172.676
Triglicéridos	-0.12411	0.03522	-3.52	-0.1931	-0.0550
Cond. Corp (bajo)*	-13.85125	5.38287	-2.57	-24.401	-3.3008
Triglicéridos: Cond. Corp (bajo)*	0.1715	0.05114	3.35	0.07126	0.27173

Referencias: Los términos significativos se muestran en negrita.

*1: Límite inferior del intervalo de confianza al 95%; *2: Límite superior del intervalo de confianza al 95%;

*Condición corporal de referencia: alto.

Tabla 13: modelo lineal mixto que muestra la asociación de la condición corporal y los niveles de triglicéridos con el colesterol en el período cercano a la ovulación.

✓ Progesterona:

La progesterona no mostro influencias de otras variables y aumentó durante el estro de manera similar en ambos grupos de diferente condición corporal (Tabla 15).

	Estimador	Error estándar	z valor	LI IC 95%*1	LS IC 95%*2
Intercepto	3.481543	0.500075	69.53	2.50140	4.46169
Intervalo	0.183292	0.004025	45.54	0.17540	0.19118

Referencias: Los términos significativos se muestran en negrita.

Tabla 14: Modelo lineal generalizado (distribución de Poisson) mixto del comportamiento de la progesterona en función del intervalo.

V. DISCUSION

Los resultados de este estudio muestran variaciones en las relaciones temporales entre hormonas e indicadores metabólicos relacionados con la ovulación y el ciclo estral de la hembra canina en grupos con diferente condición corporal.

Teniendo en cuenta la duración del ciclo estral en las hembras estudiadas hallamos que los animales del grupo 2 de condición corporal 6-7 presentan estros más cortos que los del grupo 1 de condición corporal 4-5, Ortega Pacheco y col (2000) no hallaron diferencias entre la presentación de ciclos estrales en animales condición corporal 5 y 6 pero no hacen referencia a la duración de cada una de las etapas del ciclo en las distintos grupos.

En todas las hembras las concentraciones de LH y progesterona durante el proestro, estro y diestro coinciden con los rangos descritos por Concannon (2011) y Hewitt (2009). La mayor concentración de LH se encuentra durante el estro en concordancia con la ocurrencia del pico de LH. Esta alcanzó valores más altos en el grupo de condición corporal 6-7 y el pico de LH en todas las hembras de ambos grupos mostro una bifurcación que fue descrita por de Gier y col. (2006), esta bifurcación en el pico de LH no se encuentra en otras especies donde el pico de LH es más corto. Facilitó que pudiera evidenciarse este evento que la toma de muestras durante el estro se realizara tres veces por día, Wildt y col. (2009) encontraron esta bifurcación en el pico de LH tomando dos muestras diarias. La ovulación ocurrió en ambos grupos alrededor de las 48 hs. posteriores al pico de LH, Concannon (2011) cita un rango más amplio que el encontrado en este estudio de ocurrencia de la ovulación entre las 36 y 48 hs. de producido el pico de LH.

La concentración plasmática de progesterona comienza a elevarse en concordancia con el pico de LH, lo que sugiere el papel facilitador de esta hormona para la ocurrencia del pico de LH, esto no ocurre en otras especies como fue reportado por Wildt y Concannon (2009), aumentando lentamente su concentración hasta producida la ovulación donde la existencia de un cuerpo lúteo funcional hace que se eleve más rápidamente, aquí se encontraron diferencias en ambos grupos de condición corporal. En el grupo 2 de CC 6-7 la concentración de progesterona se eleva más rápidamente, alcanzando en diestro mayores valores, no hallamos bibliografía respecto a este punto en particular.

De las hormonas metabólicas determinadas, IGF-1 presenta mayor grado de dispersión. El grupo 2 de condición corporal 6-7 muestra concentraciones más elevadas que el grupo 1 de condición corporal 4-5, la misma relación fue documentada por Jaillardon y col (2011).

En el grupo 1 de condición corporal 4-5, la insulina mostró diferencias con los resultados obtenidos en el grupo 2 de condición corporal 6-7 en el cual los valores promedios hallados fueron más bajos. En ovejas se encontró que los niveles de insulina aumentaban alrededor del estro asociados a los altos niveles de estradiol- 17β (Espinoza y col. 2008)

Los indicadores metabólicos mostraron variaciones; la glucemia alcanzó mayores concentraciones (Tabla en el grupo 1 y 3) de condición corporal 4-5 en las etapas de proestro y estro del ciclo estral. Contrariamente Almeida y col. (2015) describieron que la glucemia es mayor en perras castradas que en aquellas que siguen ciclando independientemente de la condición corporal, además Oyarzo (2010) documentó la hiperglucemia asociada a la condición corporal en el caso de perros obesos. La glucemia, durante la fase de estro, se vio modificada por los niveles de LH y la condición corporal. La LH tiene un componente parabólico que se da en el momento del pico de LH, es una parábola donde el vértice es el máximo. Carrión y Medel (2008) describieron que el rápido incremento en la secreción de LH como respuesta a la alimentación en cerdas está relacionado con los cambios de la glucemia e insulinemia. Las respuestas ováricas a las gonadotropinas podrían además estar potenciadas por incrementos en los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y IGF-I. En el pico de LH los niveles de glucemia fueron los más altos, esto sucedió tanto en animales del grupo 1 condición corporal 4-5 como en los del grupo 2 condición corporal 6-7. (Tabla 5). Los animales de condición corporal baja presentan menores valores de LH que los de alta. A medida que disminuyen los niveles de IGF-1_{t-1} los de LH aumentan, esto es válido para todos los animales.

Con respecto a las concentraciones de proteínas plasmáticas, los animales del grupo 1 condición corporal 4-5, presentan mayores niveles de proteínas plasmáticas que los animales del grupo 2 condición corporal 6 - 7. Existe un efecto significativo y positivo con la concentración de progesterona, es decir, ante aumentos de los niveles de progesterona circulante, se observan aumentos de las proteínas plasmáticas en la muestra siguiente. Este efecto de la progesterona sobre las proteínas se ve modificado a lo largo del período del estro.

Si bien se observaría (por el *p-valor*) un efecto significativo de la progesterona sobre la concentración de triglicéridos sanguíneos, estos se encuentran en el límite de la confianza establecida para las Ciencias Naturales (0.95), sumado al número de animales (n=12) esto puede estar dado por errores aleatorios y no mostrar asociación verdadera.

Se observa que existe un efecto de la progesterona, en los animales del grupo 1 de condición corporal 4-5, positivo con relación a los triglicéridos_{t+1}. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo dentro del período de estro, este efecto de la progesterona va disminuyendo. Espinoza y col. (2008) describen la importancia de los metabolitos lipídicos en la estimulación de la producción de progesterona por el cuerpo lúteo en ovejas. A su vez la progesterona no mostro influencias de otras variables. (Tabla 15).

La concentración de uremia mostró su medición más baja durante el proestro en el grupo 1 de condición corporal 4-5; en este grupo, en las demás fases del ciclo estral las mediciones no presentaron diferencias significativas con el grupo de condición corporal 6-7 (Tabla 11). Oyarzo (2010) en su estudio de la obesidad canina describió aumentos sostenidos en la uremia relacionados con las condiciones corporales más altas. A medida que aumenta el IGF-1 plasmático la uremia disminuye, sin estar relacionado con la condición corporal de los animales. Por otro lado, a medida que transcurre el tiempo en el período de estro, los niveles de uremia disminuyen, esto es más pronunciado en los animales del grupo 1 de condición corporal 4-5.

Los individuos del grupo 1 condición corporal 4-5 presentan mayores valores de IGF-1 que los del grupo 2 condición corporal 6-7. A su vez, a mayor concentración de colesterol plasmático la concentración de IGF-1 plasmático es menor, igual comportamiento se observa con la progesterona, en los animales del grupo 1 de condición corporal 4-5 esto es más evidente.

Existe un efecto de la concentración plasmática de triglicéridos sobre la concentración plasmática de colesterol; en este caso a mayores niveles de triglicéridos plasmáticos en los animales del grupo 2 condición corporal 6-7 el colesterol plasmático disminuye, lo contrario ocurre en los animales del grupo 1 condición corporal 4-5, en los cuales se observa que a mayores niveles de triglicéridos plasmáticos el colesterol plasmático aumenta, pero los niveles basales de este último en animales de condición 4 y 5 son menores.

Almeida y col. (2015) describieron aumentos del colesterol circulantes asociados al diestro en la hembra canina y además que la concentración plasmática de colesterol es mayor en las perras no castradas comparadas con aquellas que fueron castradas.

La concentración de triglicéridos es la variable que presenta mayores diferencias en los valores promedios y DS durante las diferentes fases del ciclo estral en cada grupo y entre grupos de diferente condición corporal. La bibliografía que describe específicamente los cambios metabólicos relacionados a la condición corporal y la ovulación y el ciclo estral en la hembra canina es escasa.

VI. CONCLUSIONES

Las condiciones corporales comparadas en este estudio, son consideradas estados corporales fisiológicos, no obstante, los hallazgos permiten concluir que una condición corporal levemente superior a la ideal, modifica la homeostasis metabólica del individuo que repercute sobre la performance reproductiva de las hembras caninas.

La condición corporal modifica tanto metabolitos plasmáticos como hormonas metabólicas y reproductivas en las diferentes etapas del ciclo estral de la hembra canina, y esto se evidencia particularmente sobre la ocurrencia del pico de LH previo a la ovulación y al aumento de secreción de progesterona durante el estro. Como consecuencia, la duración del estro fue más prolongada en las hembras de condición corporal más baja.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen pilares para la continuidad del estudio de la temática abordada en pos de la profundización del conocimiento de la fisiología reproductiva de hembras caninas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida P, Capella C, Souza S, Rodriguez S, Peres W, Oliveira M. 2015. Serum lipid profile of spayed and non-spayed female dogs associated with the body condition score. *Cienc.anim.bras.*p.262-267.

Aznar F, Botija J, Lorente, J. 2007. Regulación neurohormonal de la función reproductora. El eje diencéfalo - hipófisis-gónadas. En: fundamentos de obstetricia. Madrid: Segó, 79-84.

Bowsher R, Lee W, Apathy J, O'Brien P, Ferguson A, Henry, D. 1991. Measurement of insulin-like growth factor II in physiological fluids and tissues. An improved extraction procedure and radioimmunoassay for human and rat fluids. *Endocrinology.* 128:805–814

Buonomo F, Lauterio T, Baile C, Campion D. 1987. Determination of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-binding protein levels in swine. *Domest. Anim. Endocrinol.;* 4: 23-31.

Bush B. 1982. Manual de Laboratorio Veterinario de Análisis Clínicos. Editorial ACRIBIA. Zaragoza. [España](#).

Carrión D, Medel P.2006. Interacción nutrición y reproducción en Ganado porcino. XVII Curso de Especialización FEDNA.

Concannon P, England G. 2002. Determination of the Optimal Breeding Time in the Bitch: Basic Considerations Recent Advances in Small Animal Reproduction. International Veterinary Information Service (www.ivis.org)

Concannon P. 2009. Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. *Reprod Dom Anim* 44 (Suppl. 2), 3–15 ISSN 0936- 6768

Concannon P. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science* 124 200–210

[Curry T, Smith M](#). 2006. Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition. [Semin Reprod Med.](#) 24 (4):228-41

Chun S, Billig H, Tilly J, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh A. 1994. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*; 135: 1845-1853

(A). de Gier J, Kooistra H, Djajadiningrat-Laanen S, Dieleman S, Okkens, A. 2006. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17b, progesterone, prolactin, and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology*. 65 1346–1359

(b).de Gier J, Kooistra H, Djajadiningrat-Laanen S, Dieleman S, Okkens , A. 2006. Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch. *Theriogenology* 66 1419–1422

Echeverria J.2005. Aspectos farmacológicos en el manejo reproductivo de la perra. *Revista electronica de Veterinaria* 1695-7504 Vol. 6 N° 03

Eigenmann J, Patterson D, Zape J, Froesch, E.1984. Insulin-like growth factor I in the dog: a study in different dog breeds and in dogs with growth hormone elevation. *Acta Endocrinol*. 105: 294-301.

Espinoza J, Palacios A, Ortega R, Guillén A. 2008. Efecto de la suplementación de grasas sobre las concentraciones séricas de progesterona, insulina, somatotropina y algunos metabolitos de los lípidos en ovejas Pelibuey. *Arch Med Vet* 40, 135-140.

Freeman L, Becvarova I, Cave N, MacKay C, Nguyen P, Rama B, Takashima G, Tiffin R, Tsjimoto H, Van Beukelen P.2010. Guías para la Evaluación Nutricional .Congreso de la Asociación Veterinaria Mundial de Pequeños Animales (WSAVA).

Fox J.2005. The R Commander: A Basic Statistic Graphical User Inreface to R. *Journal of Stadistical Sofware* 14(9):1-42

Graaf-Roelfsema E, Keizer H, Van Breda E, Wijnberg I, Van der Kolk J.2007. Hormonal responses to acute exercise, training and overtraining. A review with emphasis on the horse. *Vet. Q* 29: 82.

Galvis Góez R, Correa Cardona R. 2002. Interacciones entre el metabolismo y la reproducción en la vaca lechera: es la actividad gluconeogénica el eslabón perdido? *Rev. Col Cienc Pec* Vol. 15:1 36-50.

- Gayet C, Bailhache E, Dumon H, Martin L, Siliart B, Nguyen, P .2004. Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNF α , IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 88, 157–165 ISSN 0931–2439
- Guerra-García M, Meza-Herrera C, Sánchez-Torres T, Gallegos-Sánchez J, Torres-Hernández G, Pro-Martínez P.2009. IGF-1 y actividad ovárica de cabras en condición corporal divergente y con un suplemento de proteína no degradable en rumen. *Agrociencia* 43: 241-247.
- Hase M, Hori T, Kawakami E, Tsutsui T .2000. Plasma LH and Progesterone Levels before and after Ovulation and Observation of Ovarian Follicles by Ultrasonographic Diagnosis System in Dogs. *J Vet Med Sci.* 62: 243-248.
- Hasegan I, Sonea A, Matei M, Vintila L, Ion C, Birtoiu A.2012.Current Relevant Knowledge on dog reproductive physiology- a review. *Animal Science and Biotechnologies.* 45(1).
- Hewitt D, England G .2000. Assessment of optimal mating time in the bitch. *In Practice.* 22:24-33.
- Hoffmann B, Büsges F, Engel E, Kowalewski M, Papa P .2004. Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 232–240.
- Jaillardon L, Martín L, Nguyen P, Siliart,B. 2011. Serum insulin-like growth factor type 1 concentrations in healthy dogs and dogs with spontaneous primary hypothyroidism. *The Veterinary Journal* 190 e95-e99.
- Kiener M. 2010. Mecanismos y mediadores químicos involucrados en la ovulación en animales domésticos .*Revista FAVE-Ciencias Veterinarias* 9 (1)-ISSN 1666-938X.
- Lenz Souza M, Ramirez Benavidez G, Uribe Velazquez L. 2007. Papel del factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-1) en la regulación de la función ovárica .*Biosalud* Vol 6, 149-159.
- Le roith D, Bondy C, Yakar S, Jun-li Liu, Butler A. 2001. The Somatomedin Hypothesis. *Endocrine Reviews* 22(1): 53–74
- Malandian E, Fontbonne A .2006. Vaginal Smears in bitch. *The Royal Canin –Cut out keep guide.* Waltham Focus Vol 16 n°2
- Mazerbourg S, Bondy C, Zhou J, Monget, P. 2003. The Insulin-like Growth Factor System: a Key Determinant Role in the Growth and Selection of Ovarian Follicles? A Comparative Species Study. *Reprod Dom Anim* 38, 247–258 ISSN 0936-6768

Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen, JM, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals *Domestic Animal Endocrinology* 23 139–154.

Moxon R, Copley D, England G. 2010. Quality assurance of canine vaginal cytology: A preliminary study *Theriogenology* 74 479–485.

Muñoz A, Riber C, Trigo P; Castejón, F. 2010. Acciones biológicas y factores determinantes de las concentraciones del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1) en el caballo. *Revista electronica de Veterinaria* 1695-7504 Vol. 11 N° 06.

Muñoz A, Riber C, Trigo P, Castejón, P. 2010. Pathological changes and clinical use of the measurement of serum/plasma concentrations of insulin-like growth factor type 1 (IGF-1) in horses, dogs and cats. *Human & Veterinary Medicine International Journal of the Bioflux Society*. Volume 2, Issue 2.

Nishiyama T, Narita K, Tsumagari S. 2000. Shrinkage in the horizontal dimensions of the vulva (vulvar shrinkage) as an indicator of standing heat in the Beagle. *J Amer Anim Hosp Assoc*. 36: 556-560.

Ortega-Pacheco A, Rodríguez-Buenfil P, Leal-Ortega J. 2000. Actividad estral de perras callejeras en la ciudad de Mérida, Yucatán y su relación con edad, tamaño y condición corporal. *Rev Biomed*. 11:107-111.

Oyarzo M. 2010. Valores de presión arterial y concentración sanguínea de urea, creatinina y glucosa en perros con sobrepeso. Tesis de grado. Universidad de Valdivia. Chile.

Pessina P, Sosa C, Araújo M, Orellana B, Brambillasca S, Cajarville C, Meikle A. 2010. Perfiles metabólicos y endócrinos en perros sanos: influencia de la ingesta y el sexo *Comunicación Corta. Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay*. Año LX Vol. 46 N° 177-178-179-180.

Reynaud K, Viaris de Lesegno C, Chebrou M, Thoumire S, Chastant-Maillard S. 2009. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin on figuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology* 72 1120–1131

[Reynaud K](#), [Chastant-Maillard S](#), [Batard S](#), [Thoumire S](#), [Monget P](#). 2010. IGF system and ovarian folliculogenesis in dog breeds of various sizes: there a link? *J. Endocrinol* 206 (1): 85-92.

Rodríguez F, Salvetti N, Colombero M, Stangaferro M, Barbeito C, Ortega H, Rey F 2013. Interaction between IGF1 and IGFBPs in bovine cystic ovarian disease. *Animal reproduction science* 140:14-25.

Root Kustritz, M. 2001. Uso de kits comerciales para ensayos de hormona luteinizante y de progesterona en el manejo reproductivo canino. *Recent Advances in Small Animal Reproduction International Veterinary Information Service* (www.ivis.org).

Sánchez de Gómez, M. 2006. Significado biológico del eje hormona de crecimiento (GH) / factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 30 (114): 101-108. ISSN 0370-3908.

Shao, R. 2004. Inhibition of small ubiquitinrelated modifier-1 expression by luteinizing hormone receptor stimulation is linked to induction of progesterone receptor during ovulation in mouse granulosa cells. *Endocrinology.* 145: p. 384 – 392.

Spicer L, Chamberlain C, Maciel S. 2002. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology* 22 237–254.

Spicer L, Santiago C, Davidson T, Bridges T, Chamberlain, C. 2005. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF-1) during follicular development in mares. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29: 573-581.

Stornelli MA, Savignone C, Tittarelli M, Stornelli M C. 2006. Citología Vaginal en caninos: Metodología y Aplicaciones Clínicas. *Veterinaria Cuyana* ISSN 1850-356 Año 1 n° 1

Todd BJ, Merhi ZO, Neal-Perry GS. 2010. Hypothalamic Insulin-Like Growth Factor-I Receptors Are Necessary for Hormone-Dependent Luteinizing Hormone Surges: Implications for Female Reproductive Aging. *Endocrinology* 151(3):1356-1366

Valdés Diez L, González García A, Rodríguez Párraga M, Rodríguez Villar O, Sijó Yero M. 1997. Variantes del método de Berthelot. *Rev Cubana Farm.* 31(2):96-101^a

Velazquez M, Spicer L, Wathes, D. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domestic Animal Endocrinology* 35 325–342.

Wanke M, Romagnoli S, Verstegen J, Concannon, P. 2002. Pharmacological approaches to pregnancy termination in dogs and cats including the use of prostaglandins, dopamine

agonists, and dexametasona .Recent Advances in Small Animal.International Veterinary Information Service (www.ivis.org).

Wildeman A, Zapata B, Builes M, Holtman K, Deiver N, Fajardo G, Rincon H. 2007. Manual de Química sanguínea Veterinaria. Monografias.com.

Williams S, Blache G, Martin B, Foot A, Blackberry M, Scaramuzzi, R. 2001. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters one and 4 in sheep granulose and theca cells. *Reproduction* 122: 947-956.

Yakar S, Rosen C, Beamer W, Ackert-Bicknell C, Wu Y, Liu J, Ooi G, Setser J, Frystyk J, Boisckair Y, LeRoith D. 2002. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J.Clin. Invest.*; 110: 771-774.

Yalow R, Solomon A. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest.*; 39(7):1157–1175