



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

UNIDAD REGIONAL UNIVERSITARIA DE ZONAS ÁRIDAS

SUPLEMENTACIÓN DE GLUTAMATO, INICIO DE PUBERTAD Y METABOLITOS SANGUÍNEOS EN CABRAS: PROTEÍNA TOTAL Y UREA

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL DOBLE GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS
(UACH-URUZA, MÉXICO)

MÁSTER EN ZOOTECNIA Y GESTIÓN SOSTENIBLE:
GANADERÍA ECOLÓGICA E INTEGRADA
(UCO-IDEP, ESPAÑA)



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA

MA. GUADALUPE CALDERÓN LEYVA

CORDINACIÓN DE POSGRADO
Bermejillo, Durango, México. Abril, 2013.



SUPLEMENTACIÓN DE GLUTAMATO, INICIO DE PUBERTAD Y METABOLITOS SANGUÍNEOS EN CABRAS: PROTEÍNA TOTAL Y UREA

Tesis realizada por **Ma. Guadalupe Calderón Leyva** bajo la dirección del Comité Asesor,
aprobada y aceptada como requisito para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas

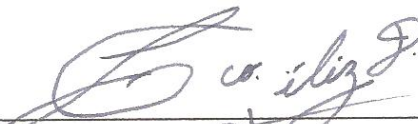
Director



Dr. César A. Meza Herrera

Universidad Autónoma Chapingo - URUZA, México.

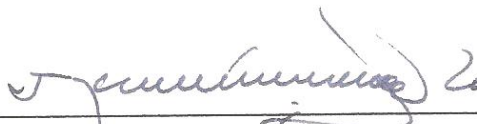
Asesor



Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.

Asesor



Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.

Asesor



Dr. Antón R. García Martínez

Universidad de Córdoba-IDEP, España.

Asesor



Dr. Juan M. Serradilla Manrique

Universidad de Córdoba-IDEP, España.

SUPLEMENTACIÓN DE GLUTAMATO, INICIO DE PUBERTAD Y METABOLITOS SANGUÍNEOS EN CABRAS: PROTEÍNA TOTAL Y UREA

Tesis realizada por **Ma. Guadalupe Calderón Leyva** bajo la dirección del Comité Asesor,
aprobada y aceptada como requisito para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias en Recursos Naturales
y Medio Ambiente en Zonas Áridas**

**Máster en Zootecnia y Gestión Sostenible:
Ganadería Ecológica e Integrada**

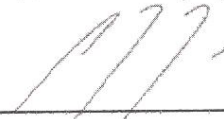
Director



Dr. César A. Meza Herrera

Universidad Autónoma Chapingo - URUZA, México.

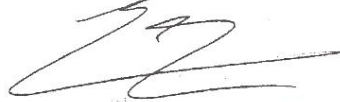
Asesor



Dr. Antón R. García Martínez

Universidad de Córdoba – IDEP, España.

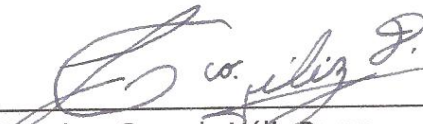
Asesor



Dr. Juan M. Serradilla Manrique

Universidad de Córdoba – IDEP, España.

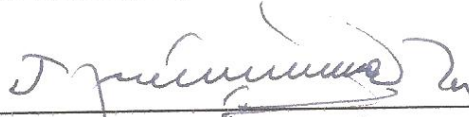
Asesor



Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.

Asesor



Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.

Bermejillo, Durango, México. Abril, 2013



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Fernando Mazo Romero, Secretario del Instituto de Estudios de Postgrado, por delegación de firma del Excmo. Sr. Rector Magfco. de la UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, por resolución de 25 de febrero de 2011,

CERTIFICA: que **Dña. Maria Guadalupe Calderón Leyva**, nacida el 17 junio de 1985, en Pinos, de nacionalidad mejicana, con DNI (o pasaporte) número G10214627 ha superado en esta Universidad, con fecha junio de 2012 los estudios que conducen al título universitario de

Máster Universitario en Zootecnia y Gestión Sostenible: Ganadería Ecológica Integrada

Y ha abonado los derechos de expedición del título, en fecha de 12 de marzo de 2013, que está en trámite de expedición.

Y para que conste y surta los mismos efectos del título con carácter provisional hasta que éste se edite, expide la presente certificación, en Córdoba, a 13 de marzo de 2013.



TRABAJO FIN DE MÁSTER. ACTA DE EVALUACIÓN

Máster Universitario en: **ZOOTECNIA Y GESTIÓN SOSTENIBLE, GANADERIA ECOLÓGICA E INTEGRADA**

Alumno/a: **M^a Guadalupe Calderón Leyva**
DNI: G04085159

Título del Trabajo Fin de Máster: **SUPLEMENTACIÓN DE GLUTAMATO, INICIO DE PUBERTAD Y METABOLITOS SANGUÍNEOS EN CABRAS: PROTEÍNA TOTAL Y UREA**

Tutor/a: DR. D. CESAR ALBERTO MEZA HERRERA Y DR. D. ANTÓN GARCÍA MARTÍNEZ

TRIBUNAL EVALUADOR:

(De 3 a 5 miembros)

(Si algún miembro del tribunal no es de la UCO, indicar procedencia)

Presidente/a: JUAN VICENTE DELGADO BERMEJO

Secretario/a: RAQUEL ACERO DE LA CRUZ

Vocal: JOSÉ MANUEL PEREA MUÑOZ

CALIFICACIÓN NUMÉRICA (0-10): 9

CALIFICACIÓN ALFABÉTICA: SOBRESALIENTE

Córdoba, 18 de OCTUBRE de 2012

Presidente/a

Secretario/a

Vocal

Fdo.: Juan Vicente Delgado

Fdo.: Raquel Acero

Fdo.: José Manuel Perea



*Se hace patente un reconocimiento al apoyo recibido
para el desarrollo de la presente investigación:*

Al Programa de Becas Nacionales CONACYT 2011-2012.

Al Programa de Becas Mixtas en el Extranjero, para Becarios CONACYT Nacionales 2011-2012.

Programa de Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas 2011-2012 (UACH-URUZA).

Dirección General de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma Chapingo.

Instituto de Estudios de Posgrado de la Universidad de Córdoba España (IDEP-UCO).

DEDICATORIA

A mis padres Víctor Calderón y Espedita Leyva

A mis hermanos mayores y sus familias Heriberto, Juan, Irene, Gloria y Verónica

A mis hermanos pequeños Luis, Carlos y Víctor

Por ser mi guía, mi luz, mi fuerza, mis motivos, mi refugio, mi todo...Por los momentos compartidos que al recordarlos en mi soledad me hacen reír y llorar.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por las todas las bendiciones otorgadas.

A la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (URUZA) por acogerme una vez más.

Al Dr. Cesar A. Meza-Herrera por dirigir esta tesis, por depositar su confianza para la obtención de la doble titulación y por inculcarme el siempre ver mas allá. A los Doctores Antón R. García, Juan Manuel Serradilla, Francisco G. Véliz y Rafael Rodríguez por asesorar y contribuir en el presente trabajo.

A los Profesores del programa de posgrado por compartir sus conocimientos, experiencia y buenos ratos, en especial al Dr. Ricardo Trejo gracias por sus buenos consejos.

A mis amigos y compañeros de generación con quien viví muchas aventuras, compartí alegrías y tristezas María, Laura, Luis, Rosario, Mali, Oli, Cinthia, Anai, Mariana, Julio y Diana. Procuren no perder su buen sentido del humor...

A Margarita Ávila que nos contagia con su buen humor y ha sabido ser una buena amiga que escucha y aconseja.

A Ricardo Vicente mi gran amigo que a pesar de la distancia procuras estar cuando te necesito (siempre...).

A Concepción Guerra, Don Adrian Guerra, Lupita Guerra y su esposo Roberto Sánchez por considerarme y hacerme sentir parte de su familia.

A Lauro Ibarra por estar conmigo cuando inicie ayudándome a contrarrestar momentos difíciles y a Fabián Rosales por corregir mi tesis, por ser un buen amigo y por motivarme para dar el siguiente paso.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional y por no cortarme las alas.

Podría escribir muchas más cosas lindas de cada uno de los mencionados pero sería casi como hacer otra tesis, hay mucho que decir. Gracias por ser parte de una etapa importante en mi vida.

SUPLEMENTACIÓN DE GLUTAMATO, INICIO DE PUBERTAD Y METABOLITOS SANGUÍNEOS EN CABRAS: PROTEÍNA TOTAL Y UREA

GLUTAMATE SUPPLEMENTATION, ONSET OF PUBERTY AND BLOOD METABOLITES IN GOATS: TOTAL PROTEIN AND UREA

¹Ma. Guadalupe Calderón-Leyva y ²César A. Meza-Herrera

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la suplementación de glutamato sobre el inicio de la pubertad y la posible unión en los cambios de las concentraciones séricas de proteína total (PT) y urea (U). El estudio se llevó a cabo en cabras prepúberes (n=18; 3 meses de edad, 7/8 Saanen-1/8 Criollo), divididas aleatoriamente en dos grupos experimentales: 1) Aminoácido excitador (AAE, n=10; 16.52±1.04 kg de peso vivo (PV), 3.4±0.12 unidades de condición corporal (CC)), recibió una infusión endovenosa de 7 mg kg⁻¹ de L-glutamato y 2) el grupo control (CONT, n=8; 16.1±1.04 kg de PV, 3.1±0.12 unidades de CC), recibió una infusión salina. Se evaluaron las concentraciones séricas de PT, U y progesterona (P4). Los promedios finales para PV (23.2±0.72 kg), CC (3.37±0.10 unidades), y las concentraciones séricas globales para PT (65.28 ± 2.46 mg mL⁻¹) y U (23.42±0.95 mg mL⁻¹) no difirieron (P>0.05) entre tratamientos. Además, los niveles séricos para PT y U no difirieron (P>0.05) a través del tiempo entre tratamientos. Sin embargo, se observó un efecto de tratamiento (P<0.05) respecto al inicio (207±9 vs. 225±12 días) y el porcentaje (70 vs. 25%) de cabras mostrando pubertad en favor del grupo AAE. Los resultados confirman que la administración exógena de glutamato promovió un inicio precoz así como una mayor porcentaje de pubertad en cabras. Lo anterior sugiere que dicho escenario fisiológico pareciera involucrar un mecanismo independiente de proteína total así como un posible efecto directo del glutamato en la activación del eje hipotalámico-hipofisial-gonadal en cabras prepúberes.

Palabras clave: pubertad, glutamato, metabolitos sanguíneos, proteína total, urea.

ABSTRACT

The effect of glutamate supply upon the onset of puberty and possible links to changes in serum concentrations of total protein (TP) and urea (U) was evaluated. The study was conducted in prepuberal female goats (n = 18; 3 mo. old, 7/8 Saanen-Alpine, 1/8 Criollo) randomly assigned to two experimental groups: 1) Excitatory amino acids group (AAE, n = 10; 16.52±1.04 kg live weight (LW), 3.4±0.12 body condition score (BCS)) receiving an intravenous infusion of 7 mg kg⁻¹ live weight of L-glutamate, and 2) Control group (CONT, n = 8; 16.1±1.04 kg LW, 3.1±0.12 BCS) receiving saline. The content of serum TP, U and progesterone (P4) was evaluated. The general average for LW (23.2±0.72 kg), BCS (3.37±0.10 units), and global averages for serum TP (65.28 ± 2.46 mg mL⁻¹) and U (23.42±0.95 mg mL⁻¹) did not differ (P> 0.05) among treatments. In addition, serum TP and U did not differ (P>0.05) across time between treatments. However, a treatment effect (P <0.05) was detected regarding both the onset (207±9 vs. 225±12 days) and the percentage (70 vs. 25%) of females showing puberty, favoring to the AAE group. These results confirm that exogenous administration of glutamate promotes an earlier onset while an increased percentage of puberty in goats. The last suggest that such physiological scenario seems to involve a total protein-independent mechanism while a possible direct effect of glutamate supplementation as activator of the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis in peripuberal goats.

Keys Words: puberty, glutamate, blood metabolites, total protein, urea.

¹ Tesista

² Director

ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN.....	i
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	iv
CUADRO DE ABREVIATURAS.....	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	3
2.1. Hipótesis	3
2.2. Objetivo.....	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1. Importancia de la producción caprina	4
3.2. Generalidades y comportamiento productivo/reproductivo de las cabras	5
3.2.1. Fotoperiodo	7
3.3. La pubertad	10
3.3.1. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas en la pubertad.....	12
3.3.2. Estado metabólico y control de los sistemas neuroendocrinos a la pubertad.....	13
3.3.3. Señalización de kisspeptinas en la pubertad	17
3.4. Neurotransmisores	26
3.4.1. Glutamato.....	27
3.4.2. Rutas metabólicas del glutamato.....	39
3.5. Metabolitos sanguíneos.....	44
3.5.1. Proteínas.....	44
3.5.2. Ciclo de la urea	47

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	51
4.1. Localización del área de estudio	51
4.2. Animales, alimentación y período experimental.....	51
4.3. Diseño de tratamientos y preparación de la solución buffer	52
4.4. Muestreo sanguíneo intermitente	53
4.5. Cuantificación de progesterona y determinación del inicio de la pubertad	53
4.6. Cuantificación de metabolitos sanguíneos	54
4.7. Análisis estadístico.....	54
4.8. Modelos estadísticos	55
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
VI. CONCLUSIONES.....	66
VII. LITERATURA CITADA	67

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

No.	Título	Página
1	Medias de mínimos cuadrados para peso vivo (kg), condición corporal (unidades), proteína total (g/Lt), urea ($\mu\text{g/dl}$) y pubertad (%) en cabras suplementadas con glutamato (AAE) y cabras control (CONT) en el norte de México (26° Norte, n=18).	58

FIGURAS

No.	Título	Página
1	Control neuroendocrino del anestro estacional en la oveja.	9
2	Comportamiento reproductivo de las cabras a través del año.	10
3	Modelo integral provisional para el control metabólico del inicio de la pubertad por la interacción dinámica entre las hormonas periféricas y los circuitos centrales.	17
4	Diagrama de la señalización de kisspeptinas dentro del SNC de la hembra	22
5	Control neuroendocrino en la oveja durante la época reproductiva (fase folicular del ciclo estral).	25
6	Modelo del control estacional de la reproducción en las ovejas involucrando cambios en el sistema neuronal de las kisspeptinas y de la GnIH.	26
7	Los receptores del glutamato agrupados en dos grandes familias	37
8	Árbol de receptores a glutamato.	38
9	Comportamiento reproductivo de cabras suplementadas con glutamato (AAE) y grupo control (CONT); las flechas muestran el inicio de la pubertad (AAE=207 $\pm$ 9 d y CONT=225 $\pm$ 12 d), los histogramas de la derecha muestran el porcentaje de pubertad (AAE=70% y CONT=25%) bajo un fotoperiodo natural decreciente en el norte de México (26° Norte, n=18).	59
10	Concentraciones séricas de proteína total a través del tiempo de muestreo para el grupo glutamato (AAE) y el grupo control (CONT) durante el periodo experimental junio – octubre, en cabras peripúberes (n=18).	60
11	Concentraciones séricas de urea a través del tiempo de muestreo para el grupo glutamato (AAE) y el grupo control (CONT) durante el periodo experimental junio – octubre, en cabras peripúberes (n=18).	61

CUADRO DE ABREVIATURAS		
ABREVIATURA	ESPAÑOL	INGLÉS
A15	Núcleo hipotalámico A15	A15 hypothalamic nucleus
AAE	Aminoácido excitador	Excitatory amino acid
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
AGA	Codón de arginina	Arginine codón
AMPA	Ácido DL- α -amino-3-hidroxi-5metil-isoxazol propiónico	α -amino-3-hydroxi-5-methyl-4-isoxazol-propionic acid
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	Cyclic adenosine Monophosphate
ANOVA	Análisis de varianza	Analysis of variance
APO	Área preóptica	Preoptic area
APM	Área premamilar	Mamillary area
ARC	Núcleo arqueado	Arcuate nucleus
ARN	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	Messenger ribonucleic acid
ATP	Adenosin trifosfato	Adenosine triPhosphate
AVPV	Núcleo anteroventral periventricular	Anteroventral periventricular nucleus
°C	Grados Celsius	Centigrade grades
Ca ⁺	Calcio	Calcium
CA	Comisura anterior	Anterior commissure
CaM- Kinasa	calcio-calmodulina-quinasa	calcium-calmodulin kinase
CC	Condición corporal	Body condition score
CoA	Acetil coenzima A	Acetyl coenzyme A
CO ₂	Dióxido de carbono	Carbon dioxide
CONT	Control	Control
CPS1	Carbamoil fosfato sintetasa I	Carbamoyl phosphate syntetase I
CTD	Dominio carboxilo terminal	Carboxyl terminal domain
DMH	Núcleo dorsomedial	Dorsomedial nucleus
E ₂	Estrógeno	Estrogen
EM	Eminencia media	Median eminence
ER α	Receptor de estrógeno alfa	Estrogen receptor alpha
ER β	Receptor de estrógeno beta	Estrogen receptor beta
FSH	Hormona folículo estimulante	Follicle-stimulating hormone
GAD	Ácido glutámico	Glutamic acid
GABA	Ácido gamma aminobutírico	Gamma-Aminobutyric acid
Glu	Glutamato	Glutamate
GluR	Receptor de glutamato	Glutamate receptor
GnRH	Hormona liberadora de	Gonadotropic-releasing

	gonadotropinas	hormone
GnIH	Hormona inhibidora de gonadotropinas	Gonadotropic-inhibiting hormone
H	Horas	Hours
H ₂ O	Agua	Water
HPG	Hipotálamo- pituitaria-gónadas	Hypothalamic-pituitary-gonadal
iGluR	Receptores a glutamato ionotrópico	Ionotropic glutamate receptor
K	Potasio	Potassium
KA	Kainato	Kainate
Kg	Kilogramos	Kilograms
LH	Hormona luteinizante	Luteinizing hormone
LN	Latitud norte	North latitude
LO	Latitud oriente	East latitude
Mg	Magnesio	Magnesium
Mg	Miligramo	Milligram
mGluRs	Receptor metabotrópico a glutamato	Metabotropic glutamate receptor
ml	Mililitro	Milliliter
Mm	Milímetros	Millimeters
mTOR	Objetivo de rapamicina	Target of rapamycin
N	Nitrógeno	Nitrogen
Na	Sodio	Sodium
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Ng	Nanogramos	Nanogram
NAG	N-acetilglutamato	N-acetylglutamate
NAGS	N-acetilglutamato sintetasa	N-acetylglutamate synthetase
NH ₃	Amoniaco	Ammonia
NK3R	Taqui quinina neuroquinina 3 receptor	Tachykinin neurokinin 3 receptor
NKB	Neuroquinina B	Neurokinin B
NMDA	N-metil-D-aspartato	N-methyl-D-aspartate
NPV	Núcleo paraventricular	Paraventricular nucleo
NTD	Dominio amino terminal	Amino terminal domain
NVM	Núcleo ventromedial	Ventromedial nucleo
P4	Progesterona	Progesterone
PC	Proteína cruda	Crude protein
PT	Proteína total	Total protein

PV	Peso vivo	Live weight
RIA	Radioinmunoanálisis	Radioimmunoassay
SAS	Sistema de análisis estadístico	Statistical analysis system
SNC	Sistema nervioso central	Central nervous system
SNAP	Proteína asociada a la sinapsis	Synapse associated protein
SNPB	Sinaptobrevina	Synaptobrevin
SNPF	Sinaptofisina	Synaptophysin
SNPT	Sinaptotagmina	Synaptotagmin
SNTX	Sintaxina	Syntaxin
TMD	Dominios transmembranales	Transmembrane domain
U	Urea	Urea
VGLUT	Transportadores de glutamato vesicular	Vesicular glutamate transporters

I. INTRODUCCIÓN

Para optimizar el comportamiento reproductivo, se requiere de una apropiada estrategia de selección en la producción de pequeños rumiantes. Las hembras jóvenes tienen que ser suficientemente maduras para iniciar la reproducción en un momento óptimo del año, de esta forma sus crías nacerán en una estación más favorable para su crianza y supervivencia (Valasi *et al.*, 2012). El norte de México, región árida y semiárida concentra la mayor producción caprina del país y presenta limitaciones ambientales como son la estacionalidad reproductiva paralelo a un inadecuado balance de nutrientes, principalmente de proteína y energía, lo cual se refleja en bajas condiciones corporales (Mellado y Valdés, 1998; Meza-Herrera *et al.*, 2004). Tanto el estado metabólico como la disponibilidad de nutrientes son algunos de los principales factores ambientales necesarios para el establecimiento de la función reproductiva (Meza-Herrera, 2008; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2011). Dicho estado metabólico así como las alteraciones que afectan la partición de nutrientes y el apetito, son regulados por una serie de interacciones complejas entre las concentraciones sanguíneas de hormonas metabólicas y el perfil de metabolitos sanguíneos.

Muchas de las hormonas metabólicas y los nutrientes que pueden ayudar a mantener la homeostasis también afectan el sistema reproductivo (Scaramuzzi *et al.*, 2006; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2011), promoviendo alteraciones importantes en la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, caracterizadas por cambios que están asociados, ya sea con la activación o inhibición en la síntesis y secreción de la GnRH (Meza-Herrera *et al.*, 2004 y 2007; López-Medrano *et al.*, 2009).

Para maximizar el éxito reproductivo en condiciones marginales de alimentación, el sistema endocrino regula los mecanismos internos y trata de alinearlos respecto cambios en el medio ambiente externo; primero, mediante cambios en la anatomía y fisiología reproductiva, y posteriormente, en el comportamiento reproductivo. Un grupo importante de hormonas está involucrado en esta regulación, pero el iniciador común es la GnRH, cuyo patrón de pulsatilidad constituye la unión clave entre la percepción de las condiciones ambientales por el cerebro y el sistema reproductivo. La actividad de este sistema neuronal es controlado a su vez por diferentes sistemas neurotransmisores, siendo un incremento en la neurotransmisión glutamatérgica, el principal evento excitador que estimula el inicio de la pubertad (Brann y Mahesh, 1997; Meza-Herrera, 2008).

Dentro del SNC, una de las funciones adicionales del glutamato es la de producir cambios en la actividad metabólica, la expresión génica y la síntesis de proteínas (Meza-Herrera, 2008). Los requerimientos de proteína para el crecimiento y eventos reproductivos tal como la pubertad, son muy importantes y significativos en el contexto de la utilización de la energía corporal (Meza-Herrera *et al.*, 2004; Scaramuzzi *et al.*, 2006; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2011). Bajos niveles de proteína en la dieta promueven una reducción en la ganancia de peso, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la síntesis y liberación de LH por parte de los gonadotropos pituitáricos. Por lo anterior, los niveles séricos de proteína podrían ser importantes moduladores de los procesos neuronales que promueven el incremento en los niveles de GnRH durante la pubertad (Meza-Herrera, 2008).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

2.1. Hipótesis

La suplementación de glutamato promueve tanto un mayor porcentaje como un inicio más temprano de la pubertad, y tal escenario está positivamente relacionado con el aumento de los niveles de proteína y con la disminución de los niveles de urea en el suero sanguíneo.

2.2. Objetivo

Evaluar el efecto de la suplementación de glutamato sobre el inicio de la pubertad y su posible acción en la modificación de los niveles séricos de proteína total y urea, como indicadores metabólicos asociados al inicio de la función reproductiva en cabras.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Importancia de la producción caprina

La cabra es de gran relevancia económica para los pequeños productores, especialmente en zonas ecológicamente marginales, como tierras de secano y montañas, donde no pueden mantenerse fácilmente otros animales domésticos, y es una de las especies más útiles al hombre, desempeñando funciones muy variadas, exhibiendo una capacidad de adaptación única para su cría en ambientes difíciles, por lo que se dice que es el animal domesticado que posee el hábitat de mayor rango ecológico (Aréchiga *et al.*, 2008). Así, con predominio de las zonas áridas, esta especie se desarrolla desde los desiertos hasta las montañas, en terrenos abruptos, alimentadas con hojas de arbustos y otras especies vegetales que no pueden ser utilizadas por otros rumiantes (ACPA, 2005; Aréchiga *et al.*, 2008 y FAO, 2010).

El ámbito árido y semiárido del norte de México es propicio para el desarrollo de la caprinocultura. En esta región se encuentra el 80% del inventario caprino nacional que se constituye en un sistema que tiene como propósito la producción del cabrito y leche; es una explotación en su mayoría extensiva, que se basa en el aprovechamiento del agostadero y la utilización de esquilmos agrícolas, principalmente de rastrojo de maíz (Mellado y Valdés, 1998; Escareño *et al.*, 2012).

Las cabras son animales multipropósito, ya que producen carne, leche, pieles, pelo, y a su estiércol se le considera un excelente abono orgánico. La décima parte de toda la leche consumida en el mundo proviene de las cabras y en ciertas zonas es la

única fuente láctea, en algunas regiones del Asia, la India, África y el Caribe, constituyen el más importante abastecedor de carne roja (FAO, 2010). En el Mediterráneo, un cuarto de la población pecuaria está representada por la cabra, que se utiliza para la producción de leche fresca, yogur y queso (ACPA, 2005; Aréchiga *et al.*, 2008).

Los estimados de la población mundial de cabras indican aproximadamente 617 millones de cabezas, localizadas el 65.9% en Asia, el 27.4% en África, el 3.5% en Europa y 3.0% en América. En general, un 97.3% de las cabras del mundo están en los países pobres (FAOSTAT, 2011). México es clasificado como uno de los principales productores de cabras en el continente Americano, a nivel mundial ocupa el lugar número 18 en la producción de leche y el número 17 en la producción de carne. Aunque México es uno de los países con la más alta producción de leche de cabra, no existe información disponible con respecto a la calidad de la leche en los sistemas de producción de cabras lecheras (Escareño *et al.*, 2012). En los sistemas de producción caprina participan principalmente productores ejidatarios, su economía depende principalmente de lo que surten de cabrito a la industria restaurantera nacional, y de leche a la industria procesadora de dulces y queso (Mellado y Valdés, 1998).

3.2. Generalidades y comportamiento productivo/reproductivo de las cabras

Para el productor es de extraordinaria importancia conocer los principales eventos que definen el comportamiento reproductivo de su rebaño. Dentro de ellos se citan la aparición de la pubertad y los factores que la determinan, el ciclo estral, el parto

y el reinicio de la actividad ovárica posparto, ya que están directamente relacionados con la eficiencia reproductiva que se logra en el proceso productivo, como premisa para alcanzar la eficiencia económica (ACPA, 2005). La elección de una apropiada estrategia en la producción optimiza el comportamiento reproductivo; una consideración importante para este objetivo es la selección de hembras prepúberes y machos para el remplazo de animales. Esto está basado en el potencial productivo-reproductivo así como en la integridad estructural de los remplazos seleccionados. Considerando la diversidad entre razas, la época de partos y la época de empadre de los pequeños rumiantes, el inicio de la pubertad es también crucial para determinar la eficiencia reproductiva de los animales, por que influye sobre la edad al primer parto (Valasi *et al.*, 2012).

La selección de animales jóvenes para remplazo nacidos antes del mes de junio, para el empadre durante el siguiente otoño, ofrece la ventaja de tener un periodo corto del nacimiento al apareamiento, con mínimos costos de mantenimiento (Valasi *et al.*, 2006; Keisler, 2007). Las hembras jóvenes tienen que ser suficientemente maduras para iniciar la reproducción en un tiempo óptimo del año, así sus crías pueden nacer en una estación más favorable para su supervivencia y nutrición.

Los corderos y cabritos nacidos en el invierno o primavera, alcanzan la pubertad durante el siguiente otoño, a una edad más joven que aquellos nacidos en otoño, los cuales llegarían a la pubertad una edad de 10-12 meses. También, aquellas crías nacidas hacia el final de la primavera, podrían no alcanzar la pubertad en el siguiente otoño,

debiendo esperar hasta la siguiente época de empadre. Lo anterior, retrasaría el inicio de la ovulación en estas crías debido al efecto del fotoperiodo que induce o retarda la sensibilidad del hipotálamo para percibir una retroacción positiva del estradiol gonadal que permita el desarrollo de la oleada de secreción o el pico preovulatorio de LH (Foster, 1994).

3.2.1. Fotoperiodo

En todas las especies, se puede lograr un balance reproductivo con estrategias basadas, tanto en eventos reproductivos oportunistas como en eventos reproductivos estacionales, determinados por interacciones complejas dadas por señales fotoperiódicas, sociales y nutricionales (Delgadillo, 2005). En pequeños rumiantes, la estacionalidad reproductiva, conduce al desarrollo de mecanismos especializados en la detección de señales ambientales que permiten determinar el momento óptimo para la reproducción (Arroyo, 2011). Las cabras exhiben marcada estacionalidad reproductiva y el fotoperiodo es la primer señal medioambiental para la regulación de la reproducción (Delgadillo, 2005) y es el factor ambiental más repetible y con variabilidad nula entre años.

De esta forma, la señal medioambiental dominante afecta la estación de empadre en pequeños rumiantes, debido al cambio anual del largo del día (reproductores de días cortos) (Delgadillo, 2005), así, el anestro estacional ocurre cuando el largo del día se incrementa, y este periodo es asociado con una ausencia de la actividad reproductiva.

Así es como la duración de las horas luz sincroniza el ciclo reproductivo anual de los reproductores estacionales (Arroyo, 2011).

Las ovejas y cabras detectan las variaciones anuales en la duración del fotoperiodo utilizando una compleja red neural a nivel central, y transformando la señal luminosa en una señal hormonal a través de la síntesis y secreción de melatonina (Mapaux *et al.*, 1999; Barrell *et al.*, 2000; Arroyo, 2011). En este mecanismo, la luz es captada en el ojo, a través de la retina, la señal luminosa se transforma en una señal eléctrica que es conducida de la retina al hipotálamo por medio del tracto retinohipotalámico; en el hipotálamo, el núcleo supraquiasmático capta la señal y posteriormente se transfiere al núcleo paraventricular; finalmente al cerebro posterior, específicamente al ganglio cervical superior. En este punto, la señal eléctrica se transforma en una señal química; el ganglio cervical superior libera noradrenalina, la cual es captada por receptores α y β adrenérgicos en la membrana celular de los pinealocitos, se induce la síntesis de la N-acetil-transferasa, enzima fundamental en la síntesis de melatonina (Arendt, 1998); de esta manera, a partir del triptófano, la hormona se sintetiza en los pinealocitos de la glándula pineal durante las horas de oscuridad; la duración de la secreción varía a lo largo del día actuando como la expresión neuroquímica de tiempo (Malpoux *et al.*, 2002; Meza-Herrera, 2012).

La menor duración en la secreción de melatonina durante los días largos, permite la síntesis de dopamina e induce el anestro estacional. Durante los días cortos, la mayor duración en la síntesis y secreción de melatonina inhibe la producción de dopamina, con

el subsecuente restablecimiento de la actividad estral y la ovulación (Viguié *et al.*, 1997; Malpaux *et al.*, 1999; Delgadillo, 2005). Durante esta etapa fisiológica, el estradiol ejerce un efecto de retroalimentación negativa, su concentración es basal y actúa en el núcleo A15, al parecer en procesos neurales GABA cuyo origen es el área preóptica. En el núcleo A15, el GABA bloquea la actividad de las neuronas dopaminérgicas; el efecto del estradiol es bloquear la liberación del GABA en este núcleo, con lo cual aumenta la actividad de las neuronas dopaminérgicas y la dopamina actúa en las neuronas GnRH e inhibe la frecuencia de pulsos de esta hormona y de LH. El modelo de síntesis de melatonina permite que ocurran estos eventos fisiológicos, además de que factores nutricionales o sociales también pueden estar implicados en la regulación de la ovulación (Figura 1) (Arroyo, 2011).

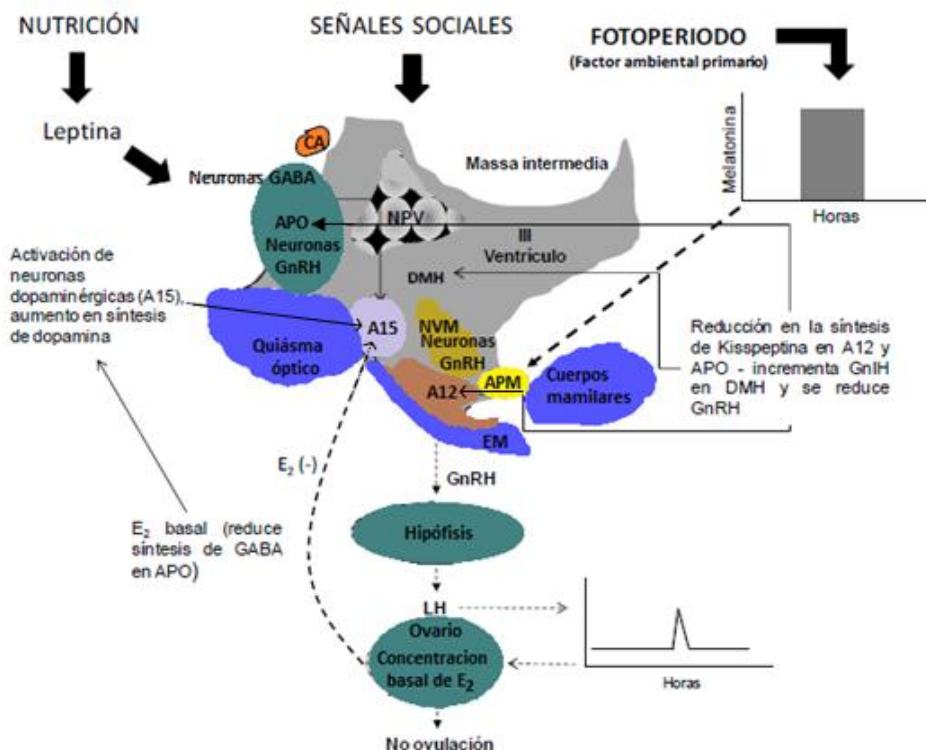
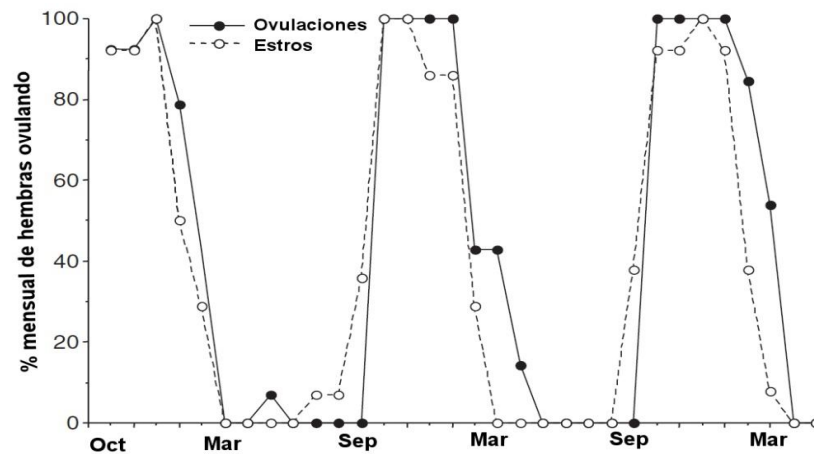


Figura 1. Control neuroendocrino del anestro estacional en la oveja (Tomado de Arroyo, 2011).

En el hemisferio norte, la frecuencia de ovulaciones y el comportamiento reproductivo en las cabras presentan un largo periodo de inactividad sexual o anestro estacional, variando dramáticamente en los meses de marzo a septiembre, aun cuando se mantenga una buena condición corporal, reiniciando la actividad sexual durante los meses de octubre a enero (Figura 2) (Delgadillo, 2005; Hernandez-Valenzuela *et al.*, 2009; Arroyo, 2011).



en la edad en la cual pueden soportar el término de la preñez, mientras que para los machos, es la edad cuando el contenido eyaculado contiene un número de espermatozoides adecuado para una fertilización exitosa (Valasi *et al.*, 2012). Sin embargo, la gran variabilidad entre individuos en el inicio y progresión de la pubertad, indica que no es una función simple de edad cronológica, más bien, es un proceso complicado, afectado por un gran número de factores internos y externos que dependen de la jerarquía e interacción de diferentes señales, para permitir o inhibir el proceso de un adelanto en el inicio de la pubertad (Meza-Herrera, 2008; Valasi *et al.*, 2012). El conocimiento de la forma de cómo estos factores interactúan, podría llevar a la aplicación de estrategias para incrementar el tiempo de vida reproductiva y el comportamiento productivo de los pequeños rumiantes (Ebling, 2005; Valasi, *et al.*, 2012).

En corderas, el inicio de la pubertad depende mayormente de tres factores: 1) edad de los animales, entre 6-12 meses dependiendo de la raza y mes de nacimiento, 2) apropiada estación del año, que ocurra dentro del periodo reproductivo de cada raza, y 3) tamaño, peso corporal y estado metabólico. Bajo condiciones de campo, los animales de reemplazo no siempre cumplen las condiciones anteriores y, por tanto, no se reproducen dentro de un mismo año o estación reproductiva (Keisler, 2007). Asimismo, los sistemas neurotransmisores y neuromoduladores que impactan sobre la red secretora de GnRH, transmiten información sobre señales tanto internas como externas, fotoperiodo, estación de nacimiento, metabolismo, nutrición, señales sociales con animales machos o

hembras, que influyen sobre el mapa genético y la función del sistema secretorio de GnRH (Valasi *et al.*, 2006; Meza-Herrera, 2008).

3.3.1. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas en la pubertad

La pubertad es desde una perspectiva neuroendocrina, la reactivación del sistema de secreción de la GnRH como mensajero primario involucrado en la maduración sexual, llevándolo a un sistema de secreción interrumpido, incrementando el pulso para estimular la secreción prepuberal de gonadotropinas y a su vez, la actividad gonadal mediante el incremento en la amplitud y frecuencia en los pulsos de LH y FSH (Ebling, 2005; Ojeda *et al.*, 2006; Meza-Herrera, 2008). Durante la pubertad, los cambios en el patrón de liberación de GnRH están bajo el control de mecanismos dependiente e independiente de esteroides. El mecanismo dependiente de esteroides involucra cambios en la sensibilidad de los esteroides gonadales de la retroalimentación negativa para la regulación de las neuronas de GnRH. Aunque la habilidad para la liberación de los pulsos de GnRH de alta frecuencia es inherente a una edad temprana, esto no se expresa completamente por la presencia de esteroides gonadales y la gran sensibilidad del sistema de la GnRH para éstos. Así, el tiempo a la pubertad decrece la sensibilidad de los esteroides gonadales para permitir un incremento en la frecuencia del pulso de GnRH (Suttie *et al.*, 1998; Foster, 1994; Meza-Herrera *et al.*, 2009). En estos importantes cambios en las gonadotropinas, subyace claramente la pubertad incrementando la frecuencia del pulso, que pareciera ser la clave determinante de la función reproductiva. Sin embargo, existen diferencias sexuales en la sensibilidad del sistema GnRH por la

inhibición de los esteroides, por lo cual se genera un tiempo diferente del inicio de la pubertad en hembras y machos (Claypool y Foster, 1990).

El control de la secreción de LH es programado prenatalmente, pero el mecanismo de LH es susceptible de promover la programación del estradiol post-natal en hembras (Jackson *et al.*, 2009). Al respecto, se ha propuesto que las neuronas de GnRH están razonablemente maduras al nacimiento; sin embargo, conforme inicia el proceso de crecimiento, se suprime su liberación pulsátil. En efecto, en rumiantes existe un incremento en la actividad gonadotrópica en la etapa temprana posterior al nacimiento, el cual genera un incremento en el desarrollo de folículos antrales en el ovario. Sin embargo, no se comprende aún del todo la regulación endocrina de ésta estimulación del sistema folicular del ovario (Rawlings *et al.*, 2003; Meza-Herrera *et al.*, 2009).

3.3.2. Estado metabólico y control de los sistemas neuroendocrinos a la pubertad

La reproducción es una función de alta demanda metabólica que requiere niveles suficientes de reservas de energía para continuar. Esto, debido al elevado gasto de energía durante la gestación y la lactancia, es más evidente en las hembras mamíferas, mientras que en los machos, aunque los requerimientos nutricionales son comparativamente menores, la función reproductiva también es sensible a las condiciones de estrés metabólico (Roa *et al.*, 2011). En efecto, tanto el estado metabólico como la disponibilidad de nutrientes, son algunos de los principales factores

ambientales necesarios para el establecimiento de la función reproductiva (Scaramuzzi *et al.*, 2006; Meza-Herrera *et al.*, 2009; Meza-Herrera y Tena-Sempere, 2012).

La afirmación de que la aparición de la pubertad depende críticamente de las reservas corporales adecuadas de energía, ha sido conocida desde la antigüedad, sin embargo, el sustrato neuroendocrino para la regulación metabólica de la pubertad y la fertilidad apenas ha comenzado a revelarse recientemente (Roa *et al.*, 2010). Por lo tanto, un mayor entendimiento de los mecanismos del sistema, puede permitir el desarrollo de métodos para modificar la intensidad de la activación de la estimulación nutricional del hipotálamo, incrementando la habilidad para modular la reproducción (Dunn y Moss, 1992).

En muchas especies animales, el déficit de nutrientes causa perturbaciones en la secreción de hormonas gonadotrópicas, tanto en animales inmaduros como en mamíferos adultos (Meza-Herrera, 2008; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2010). En general, cuando se consideran todas las reacciones metabólicas necesarias para la reproducción, el efecto neto de entradas positivas y negativas puede ser lo suficientemente positivo para inducir un umbral potencial para la despolarización neural que causa la liberación de GnRH. Se ha propuesto que el descenso en la secreción pulsátil de GnRH genera una disminución en la síntesis y liberación de LH por las células gonadotrópicas y que dicho escenario ha sido uno de los principales factores etiológicos para la supresión de la función hipofisiaria gonadal inducida nutricionalmente (Meza-Herrera *et al.*, 2007; Meza-Herrera, 2008; Meza-Herrera y Tena-Sempere, 2012).

Los bajos niveles de proteína en la dieta promueven una disminución, no solo en el peso vivo, sino también en la ganancia diaria de peso, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la síntesis y liberación de LH por parte de los gonadotropos pituitáricos. Sin embargo, no se observó dicho efecto con respecto a la hormona FSH. Por lo anterior, la concentración proteica en la dieta, puede ser un importante modulador de los procesos neuronales que promueven el incremento en los niveles de LH durante la pubertad (Polkowska *et al.*, 2003; Meza-Herrera, 2008). En el mismo sentido, en corderas, una subnutrición severa previene la ovulación al impedir el funcionamiento del sistema GnRH que gobierna la producción y secreción de LH con un patrón de alta frecuencia, de tal forma que genere un desarrollo folicular hasta el estado preovulatorio, así como el establecimiento de suficientes reservas de LH en la pituitaria para su liberación mediante la retroacción estimuladora de estradiol, generando el pico preovulatorio de LH (Foster, 1994).

De hecho, la secreción de GnRH está influenciada por un número de señales metabólicas, tales como la glucosa, la insulina, la leptina y la ghrelina, que, sin embargo, no pueden operar directamente sobre las neuronas GnRH. Tanto la leptina como la ghrelina ejercen importantes funciones como marcadores del estado nutricional y pueden actuar sobre el SNC para iniciar el complejo proceso del establecimiento de la pubertad y mantener una función reproductiva normal en el estado adulto (Meza-Herrera y Tena-Sempere, 2012). Al actuar a través del cerebro, estas hormonas pueden servir como una conexión entre el nivel de reservas metabólicas y el sistema reproductivo para aportar y regular las necesidades de energía para una función reproductiva normal (Figura 3)

(Fernandez-Fernandez *et al.*, 2006; Meza-Herrera *et al.*, 2009; Roa *et al.*, 2010; Roa *et al.*, 2011).

Los papeles que adopta la leptina (como señal importante para la abundancia de la energía; permisivo / factor estimulador) y la ghrelina (como señal protegida de la insuficiencia energética, factor inhibidor) son destacados. Además, se representa el importante papel de las neuronas kisspeptina como integradoras de una amplia diversidad de señales periféricas y centrales que transmiten información metabólica hacia los centros reproductivo. Cabe destacar, que las neuronas KiSS-1 han sido propuestas como objetivos para regular las acciones de la leptina (y ghrelina), y su papel como mediador para los efectos de leptina esta reforzado por que los receptores de leptina no se expresan en las neuronas de GnRH, lo que excluye la posibilidad de efectos directos de la leptina en este sitio. No obstante, sigue siendo posible que parte de las acciones de la leptina sobre las neuronas KiSS-1 puedan ser conducidas indirectamente a través de vías neuronales intermedias, cuya naturaleza y relevancia fisiológica aún no se ha aclarado. Además, también se indica la implicación potencial de mTOR y CRTC1 en la transmisión metabólica (leptina) sobre la información de las neuronas KiSS-1 (Figura 3) (Roa *et al.*, 2011).

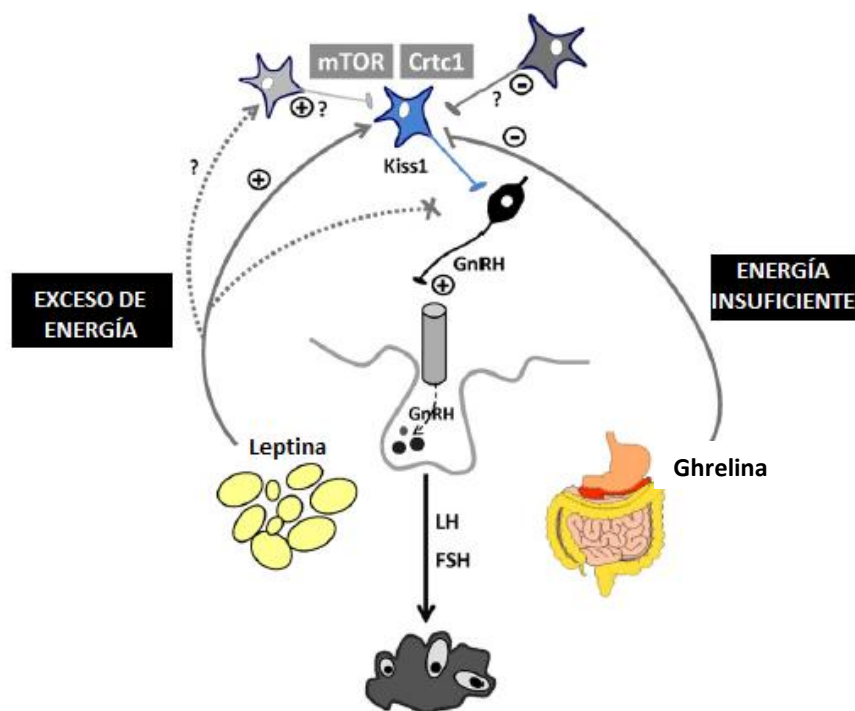


Figura 1. Modelo integral provisional para el control metabólico del inicio de la pubertad por la interacción dinámica entre las hormonas periféricas y los circuitos centrales (Tomado de Roa *et al.*, 2011).

Similarmente, se han descrito diferentes neuropéptidos centrales como mediadores potenciales en este fenómeno; las kisspeptinas han iniciado la más reciente identificación, y probablemente una de las más importantes, como reguladoras en el control central del inicio de la pubertad mediante diferentes rutas de señalización metabólica (Tena-Sempere, 2006; Castellano *et al.*, 2009; Meza-Herrera y Tena-Sempere, 2012).

3.3.3. Señalización de kisspeptinas en la pubertad

La kisspeptina, un péptido conformado por 53 aminoácidos, producto del gen *KiSS-1*, y su receptor GPR54 enlazado a proteínas G, han emergido como reguladores esenciales de la reproducción y como elementos clave en la regulación de la secreción

de GnRH, tanto en la ausencia como en el inicio de la pubertad (Tena-Sempere, 2006; Roa *et al.*, 2011). Las kisspeptinas son encontradas tanto en el sistema periférico como en el SNC. En el sistema periférico las kisspeptinas han sido identificadas en testículos, ovarios, gonadotropos de la pituitaria anterior, páncreas e intestino delgado (Hameed *et al.*, 2011).

En términos de expresión génica, los análisis llevados a cabo en la rata sugieren que los niveles hipotalámicos de expresión del gen KiSS-1 y de su receptor GPR54 son relativamente bajos en el periodo prepuberal y aumentan coincidiendo con la llegada de la pubertad. Estas observaciones han sido confirmadas en primates, en los que se ha observado un incremento en la expresión hipotalámica de los genes KiSS-1 y GPR54 en torno a la pubertad. Desde el punto de vista funcional, los datos de administración de kisspeptinas en animales inmaduros refuerzan la idea de un papel relevante del sistema KiSS-1 en la activación puberal del eje reproductor (Tena-Sempere, 2006, 2010).

En un reciente estudio se reportó que la administración de kisspeptina en corderas prepuberales provoca la liberación del pulso de LH y estimula la función ovárica, llevando al aumento de la estereidogénesis ovárica, la estimulación de una oleada preovulatoria de LH y la actividad ovulatoria y lútea (Redmond *et al.*, 2011). El corte proteolítico del producto primario KiSS-1 genera el decapeptido kisspeptina-10, el cual es extraordinariamente potente en el desencadenamiento de la liberación de LH (Ojeda *et al.*, 2006; Meza-Herrera y Tena-Sempere, 2012).

Los mecanismos que producen la activación del sistema GnRH por las kisspeptinas durante la pubertad son diversos, sofisticados y altamente regulados, reflejo de la importancia funcional de los mismos. Cuatro son los posibles procesos implicados identificados hasta la fecha: 1) aumento del tono endógeno de kisspeptinas, reflejado por un incremento de la expresión del gen KiSS-1 en torno a la pubertad; 2) posible aumento de la expresión del receptor GPR54, de menor magnitud que la del ligando; 3) incremento de la sensibilidad a las acciones estimuladoras de la kisspeptina durante la transición puberal, que se asociaría a un aumento de la eficacia del acoplamiento de GPR54 a sus rutas de señalización; 4) incremento de los contactos sinápticos entre neuronas KiSS-1 y neuronas de GnRH a lo largo de la pubertad (Meza-Herrera, 2008).

Además, las neuronas que expresan kisspeptina son blancos directos de las acciones de la retroacción tanto negativa como positiva de esteroides, los cuales regulan diferencialmente la expresión del ARNm KiSS-1 en varias regiones del cerebro, y se les ha asignado con un rol relevante en el establecimiento de la pubertad. Se ha sugerido un doble sitio de acción de la kisspeptina: bien, en la región hipotalámica hipofisiaria, o en la eminencia media del hipotálamo, una región localizada fuera de la barrera hemática cerebral. Aunque las neuronas que contienen kisspeptina están localizadas en subgrupos neuronales discretos del área preóptica y el núcleo arqueado del cerebro, las neuronas que contienen los receptores GPR54 están más difusamente distribuidas, e incluyen las neuronas para GnRH y la adenohipófisis (Meza-Herrera y Tena-Sempere, 2012).

En los primates los niveles de KiSS-1 y GPR54 ARNm se incrementan significativamente en el hipotálamo al tiempo de la pubertad, indicando que el incremento en la señalización mediante el GPR54 contribuye a la activación puberal de la secreción de GnRH (Ojeda *et al.*, 2006). Asimismo, el incremento en la secreción pulsátil de GnRH observada en las etapas previas a la pubertad, ocurre debido a los cambios coordinados en la comunicación trans-sináptica y a la interacción entre células gliales y neuronas (Meza-Herrera *et al.*, 2009).

Conforme se incrementa la señal excitadora de las neuronas y de las células gliales, y se conecta a la red neuronal de GnRH, se observa una reducción en la inhibición del tono trans-sináptico, ocasionando la activación puberal de la secreción de GnRH. Los sistemas neuronales preponderadamente invocados en este proceso incluyen al glutamato y el péptido kisspeptina, los cuales ejercen los procesos de neurotransmisión-neuromodulación, mientras que la más importante señal inhibidora es provista por neuronas GABAérgicas y opiotérgicas (Ojeda *et al.*, 2006; Meza-Herrera, 2008).

En ovejas, las neuronas de kisspeptinas en el núcleo preciso, parecieran tener un papel tanto en la retroacción negativa como positiva de la liberación de GnRH ejercida por los esteroides sexuales (Smith y Clarke, 2010). En mujeres, durante la mayor parte del ciclo menstrual, el estrógeno suprime la secreción de gonadotropinas, pero en la mitad del ciclo el efecto de los estrógenos sobre los cambios del eje HPG da lugar a un potente efecto de retroalimentación positiva, lo que lleva a un aumento de LH

plasmática y a la ovulación. Existe una creciente evidencia que sugiere que la señalización hipotalámica por kisspeptina juega un papel crítico en la generación de la oleada preovulatoria de LH, la cual es necesaria para la fertilidad normal (Hameed *et al.*, 2011).

Las células de kisspeptina en el hipotálamo modulan la retroacción de los esteroides sexuales en el control de la secreción de GnRH. Estas células expresan los receptores de esteroides sexuales. El estrógeno receptor α (ER α) ha mostrado tener un efecto esencial en la retroacción negativa de estrógenos, los cuales se producen en las hembras a la mitad del ciclo durante la oleada de LH. Interesantemente, la oleada preovulatoria de LH es preservada en el receptor β de estrógeno (ER β). Las neuronas de GnRH que expresan ER β pero no ER α , implican que a la mitad del ciclo, la regulación positiva de GnRH liberada por estrógenos es mediada por una población separada de neuronas que expresan ER α con una relativa activación para las neuronas de GnRH. Estudios de la hibridación dual *in situ* han revelado la co-expresión de KiSS-1 y ARN de ER α en el AVPV y el ARC (Hameed *et al.*, 2011).

El E₂ en las neuronas kisspeptina, expresando ER α en el AVPV, regula positivamente las neuronas GnRH que culminan en la oleada preovulatoria de LH. Sin embargo, las neuronas de kisspeptina expresando ER α en el ARC, responden a la estimulación de estrógenos por la inhibición de producción y liberación de GnRH. Esta alimentación seguida del control de retroalimentación sobre la liberación de GnRH por los esteroides gonadales, es esencial para la fertilidad normal (Clarkson *et al.*, 2009;

Hameed *et al.*, 2011). La kisspeptina puede también tener un efecto modulador directo sobre la liberación pituitaria de LH y FSH. Las neuronas KISS-1 en el ARC co-expresan la neuroquinina B (NKB), la cual estimula la liberación de LH y FSH en una manera dependiente de la GnRH. La señalización de leptina tiene un efecto permisivo sobre la señalización de kisspeptinas dentro del ARC (Figura 4) (Hameed *et al.*, 2011).

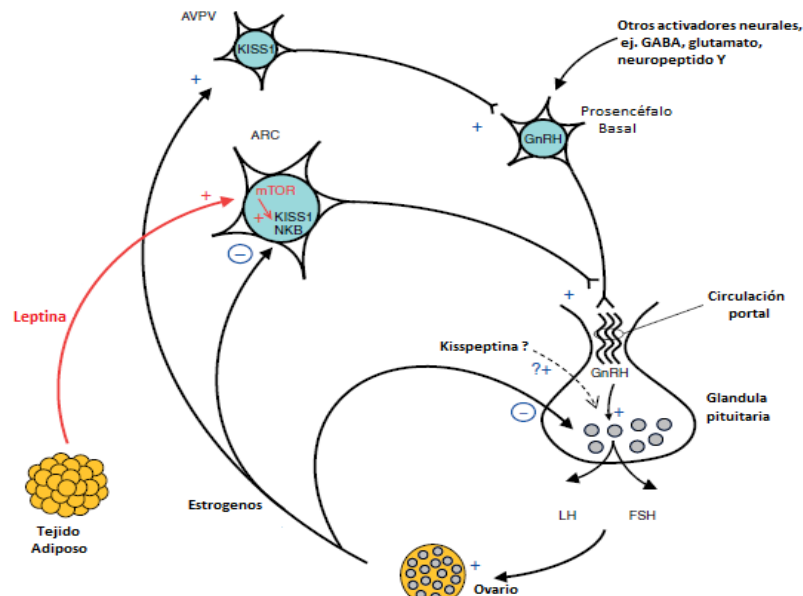


Figura 2. Diagrama de la señalización de kisspeptinas dentro del SNC de la hembra (Tomada de Hameed *et al.*, 2011).

Las neuronas kisspeptina en el ARC co-expresan neuropéptidos, neuroquinina B (NKB) y dinorfina, y esta co-localización está altamente conservada en varias especies de mamíferos, incluyendo a los humanos. La dinorfina es un péptido opioide endógeno que desempeña un papel en el control de retroalimentación negativa mediada por la progesterona, en el control de la liberación de GnRH, mientras que NKB es miembro de la sustancia P relacionada con la familia de las taquiquininas (Goodman *et al.*, 2004). La NKB posee un receptor taquiquinina neuroquinina 3 (NK3R), que se expresa en las

neuronas de GnRH (Hameed *et al.*, 2011). Hasta hace poco, las investigaciones del efecto de la NKB sobre la liberación de la hormona reproductiva habían dado lugar a resultados inconclusos y contradictorios en ovejas y roedores. Sin embargo, recientemente se ha reportado, que la administración intravenosa de NKB o un agonista NKB en monos machos, resulta en una potente estimulación de la liberación de LH, un efecto que es abolido por el pretratamiento con un antagonista de GnRH (Figura 4) (Hameed *et al.*, 2011).

3.3.3.1. Kisspeptina y estacionalidad reproductiva

Durante el anestro estacional, el estradiol muestra un efecto en la inhibición de la expresión de RNAm para KiSS-1 y la proteína kisspeptina. En el hipotálamo, las poblaciones neuronales que producen las kisspeptinas y la hormona inhibitoria de gonadotropinas (GnIH) parecieran ser importantes para el cambio estacional en la actividad reproductiva, así como también son requeridas para el inicio de la pubertad (Arroyo, 2011).

Las células de kisspeptina en el núcleo arqueado (ARC) y el área preóptica aparecen en el inicio de la estación de reproducción para regular las neuronas de GnRH y transmitir las señales de la retroacción de los esteroides sexuales a estas neuronas entre épocas, de manera que modulan los cambios anuales en la fertilidad y participan en la transición cíclica estacional de la época reproductiva al anestro estacional (Smith, 2012; Meza-Herrera, 2012).

Aparentemente los bajos niveles de kisspeptina durante la estación no reproductiva pueden ser corregidos por la infusión de kisspeptina, la cual causa la ovulación en hembras estacionalmente acíclicas. El papel de la GnIH es menos claro, pero la creciente evidencia apoya el papel de este neuropéptido inhibitorio en la regulación de la secreción de GnRH y la liberación de gonadotropina desde la glándula pituitaria. Se sugiere que la melatonina actúa directamente en las neuronas kisspeptina y GnIH, regulando su actividad a través del año y durante los días cortos, estimulando la síntesis y secreción de kisspeptina e inhibe la GnIH (Figura 5); de manera contraria, durante los días largos, reduce la síntesis y secreción de kisspeptina e induce la síntesis y liberación de GnIH, modulando de esta manera el ciclo reproductivo anual de la oveja (Figura 6) (Simonneaux *et al.*, 2009; Arrollo, 2011; Smith, 2012).

El estradiol ejerce un efecto de retroalimentación positiva e induce la síntesis y secreción de GnRH/LH. La Dopamina y el GABA no ejercen un efecto inhibitorio en las neuronas GnRH. La melatonina, que actúa a nivel del APM, mantiene un perfil de secreción característico de días cortos y permite la ocurrencia de los eventos neuroendocrinos implicados en la ovulación. La nutrición y los estímulos sociales pueden modular la respuesta (Arroyo, 2011).

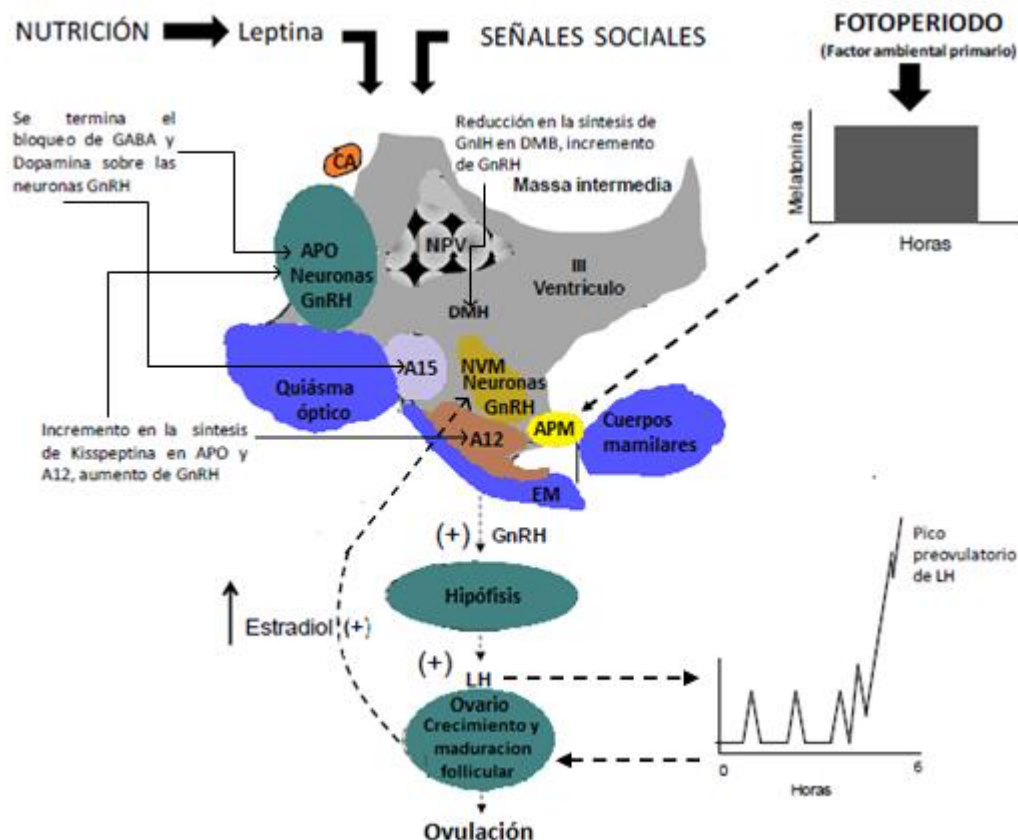


Figura 3. Control neuroendocrino en la oveja durante la época reproductiva (fase folicular del ciclo estral) (Tomada de Arroyo, 2011).

De igual manera, la melatonina modula la reproducción regulando la secreción de GnRH, sin actuar directamente sobre las neuronas de GnRH. Contrario a la kisspeptina, la expresión de GnIH está marcadamente reducida al inicio de la estación reproductiva. Además, en estrecha añadidura con las neuronas de GnRH, el número de las fibras de GnIH también decrece durante este tiempo. Los tratamientos endógenos de GnIH pueden bloquear considerablemente, tanto la liberación pulsátil de LH como la oleada preovulatoria durante la estación reproductiva (Arroyo, 2011; Smith, 2012). Durante la estación reproductiva, se incrementan el número de células KiSS-1 identificables en el núcleo arqueado y la afluencia de las células de kisspeptina a las

neuronas de GnRH. Alternativamente, el número de células de GnIH y la aposición a las neuronas de GnRH decrecen durante la estación de reproducción comparada con la no reproductiva (anestro estacional), cuando existe un incremento adicional en la secreción de GnIH en el sistema portal hipofisiario (Figura 6) (Smith, 2012).

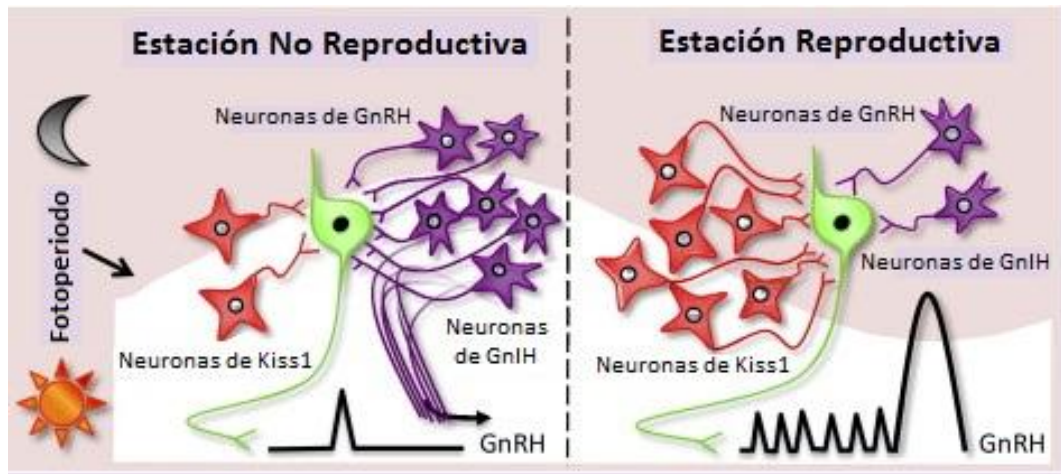


Figura 4. Modelo del control estacional de la reproducción en las ovejas involucrando cambios en el sistema neuronal de las kisspeptinas y de la GnIH (Tomado de Smith, 2012).

3.4. Neurotransmisores

Entre las sustancias que actúan como neurotransmisores se incluyen aminas biogénicas, aminoácidos, nucleótidos o nucleósidos y numerosos neuropéptidos, unos producen excitación en la neurona postsináptica y otros la inhiben. Ambos son fundamentales para mantener un funcionamiento apropiado en el SNC (Moreno-González y Zarain-Herzberg, 2006). En el SNC, el neurotransmisor excitador mayoritario en las sinapsis rápidas es el ácido glutámico. Los principales agentes que median la transmisión sináptica inhibitoria rápida son el GABA y la glicina.

El GABA media interacciones inhibitorias en la mayor parte del cerebro, mientras que la glicina es el agente inhibidor en una parte de las sinapsis establecidas principalmente en el tronco del encéfalo y la médula espinal. Por el contrario, las aminas y los péptidos tienen la potestad de modular la transmisión sináptica rápida y la excitabilidad neuronal. Cada uno de estos agentes neurotransmisores reconoce una colección de receptores a nivel postsináptico, y presentan un grado de diversidad funcional extraordinariamente amplio e impensable hace sólo unos años (Lerma, 1997).

3.4.1. Glutamato

El Glu pertenece a la familia de neurotransmisores conocida como EAA, es el principal neurotransmisor excitador en el SNC y ejerce esta función por medio de receptores específicos. Los EAA en general, y el glutamato en particular, ejercen un marcado efecto estimulante sobre el eje reproductivo, particularmente en el momento de la pubertad. De hecho, la administración de glutamato y sus agonistas promueven la liberación pulsátil de LH en animales previamente expuestos a esteroides. A la inversa, los antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato inhiben la liberación de LH, e inhabilitan la secreción de LH inducida por E_2 y la oleada preovulatoria de LH (Meza-Herrera *et al.*, 2009). El inicio de la pubertad requiere una comunicación recíproca neurona-glía que implica EAA, principalmente glutamato y aspartato, además de algunos factores de crecimiento y de la acción coordinada de un grupo de los neuromoduladores, todo lo cual representa un mayor nivel de control que regula el proceso de la pubertad (Ojeda *et al.* 2006).

Estudios realizados en numerosas especies han demostrado la inmunoreactividad del glutamato en determinadas localizaciones a través del SNC, incluyendo neuronas en el hipotálamo y en los nervios terminales en la eminencia media (Moreno-González y Zarain-Herzberg, 2006; Estienne *et al.*, 2000). En un principio fue difícil admitir el papel del glutamato como neurotransmisor, dado que esta molécula se encuentra ampliamente distribuida en las neuronas y en células gliales y se involucra en la actividad considerada no-sináptica, tal como su participación en la función metabólica de las células. Por tal razón, es importante distinguir entre el acervo de glutamato dedicado a la neurotransmisión y aquel que forma parte de las rutas metabólicas comunes a todas las células (Bergles *et al.*, 1999).

El glutamato y la glutamina son uniones claves entre el metabolismo, general del carbono y del nitrógeno; entre el metabolismo del carbono el glutamato y la glutamina son importantes en el metabolismo de los carbohidratos y de las proteínas en particular. La importancia de lo anterior es la degradación a la cual la glutamina y el glutamato dietarios contribuyen para su integro metabolismo corporal (Reeds *et al.*, 2000).

La literatura revisada nos deja con una impresión del intercambio celular de Glu y sus precursores y metabolitos, algo diferente de la idea clásica del ciclo de la glutamina con su casi estequiométrico intercambio de Glu y glutamina entre neuronas y astrocitos. (1) Como se creía anteriormente, el Glu es sintetizado no solamente a partir de la glutamina, sino también a partir de precursores neuronales suministrados por carboxilación del piruvato neuronal. (2) Los transmisores de Glu son mayoritariamente

captados por los astrocitos para su conversión a glutamina, pero una fracción desconocida es metabolizada por el ciclo de Krebs, ya sea totalmente a CO_2 y agua, o sólo parcialmente a malato, el cual es convertido a piruvato y a lactato. (3) La captación de glutamato en los astrocitos estimula la absorción de los astrocitos de la glucosa sérica y la exportación de lactato al líquido extracelular. (4) El lactato, formado a partir de transmisores de Glu o de la glucosa sérica, puede aumentar el flujo sanguíneo cerebral regional y actuar como principal sustrato energético neuronal. (5) La glutamina es desviada a las neuronas en las que, en gran medida, se metaboliza a CO_2 y agua y, posiblemente, en menor medida, es convertida en transmisores de Glu. (6) La captación de procesos relacionados con la manipulación de transmisores de Glu y glutamina, junto con la formación de glutamina, causan el gasto aproximado del 3% de la energía total de la glucosa en el suero absorbido por el cerebro (Ottersen y Storm-Mathisen, 2000; Reeds *et al.*, 2000).

3.4.1.1. Síntesis del glutamato en el sistema nervioso

El glutamato como neurotransmisor presenta las particularidades siguientes:

- ✓ Se localiza en vesículas presinápticas
- ✓ Se ha demostrado su liberación cuando se estimulan las terminales axónicas
- ✓ Se han caracterizado receptores específicos que responden al ácido glutámico, tanto en la membrana presináptica como en la postsináptica
- ✓ Existen mecanismos para removerlo de la hendidura sináptica.

Dentro del sistema nervioso central el glutamato no solo se limita a mediar la neurotransmisión excitatoria, sino que presenta un gran número de funciones adicionales (Michaelis, 1998):

- ✓ Actúa como neurotransmisor excitador de acción rápida.
- ✓ Participa en la inducción y mantenimiento de cambios a mediano y largo plazo en la excitabilidad neuronal y en la plasticidad sináptica, asociados con procesos de aprendizaje y memoria.
- ✓ Actúa como estímulo quimiotáctico durante la sinaptogénesis y el desarrollo embrionario.
- ✓ Actúa como desencadenante de procesos de migración neuronal.
- ✓ Modula el crecimiento axonal y la formación de sinapsis.
- ✓ Promueve la supervivencia de ciertas poblaciones neuronales.
- ✓ Produce cambios en la actividad metabólica, la expresión génica y la síntesis de proteínas.
- ✓ Presenta un papel destacado en procesos neurodegenerativos.

El glutamato que se utiliza como neurotransmisor se almacena en vesículas. Estas lo atrapan con la participación de moléculas que se localizan en la membrana vesicular, las cuales se conocen como VGLUT. Así el transportador interioriza el glutamato con la ayuda de un mecanismo que requiere intercambio de protones; mientras que la asociación entre la vesícula y el citoesqueleto permite un transporte hacia la membrana presináptica, de manera que se encuentre disponible para la exocitosis (Lerma, 1997).

El proceso de liberación del glutamato ocurre cuando la vesícula se fusiona con la membrana presináptica por medio de la interacción con proteínas presentes en la membrana de las vesículas, en el citoplasma y en la membrana presináptica. Las proteínas tienen la capacidad de formar un sistema de anclaje que se activa con la entrada de calcio a la terminal presináptica. Hasta ahora solo se ha identificado algunas proteínas que participan en este proceso. En la membrana de las vesículas se conocen entre otras, la sinaptobrevina, la sinaptofisina y la sinaptotagmina. En el citoplasma está presente la alfa-SNAP, mientras que en la membrana presináptica se localizan la SNAP-25 (proteína asociada a la sinapsis) y la fisofilina (Michaelis, 1998).

Las vesículas que se ligan al citoesqueleto por medio de la proteína sinapsina se liberan por la activación de la enzima calcio-calmodulina-kinasa (CaM- Kinasa) en respuesta al ingreso de calcio a la terminal presináptica del citoplasma y de la terminal presináptica, a su vez inducido por la llegada de un potencial de activación y organización de las proteínas de anclaje vesicular. La interacción de estas proteínas forma un núcleo o eje que permite la fusión de la vesícula con la membrana presináptica, lo cual antecede a la exocitosis (Michaelis, 1998). En la terminal presináptica el glutamato se acumula en las vesículas, por medio del transportador VGLUT, el cual lo intercambia por protones. Las vesículas, inicialmente ancladas, son liberadas por la actividad de la CaM kinasa, en respuesta al ingreso de calcio, y movilizadas hacia la terminal presináptica, para liberar su contenido a la hendidura sináptica (Lecznar y Kravmska, 2007).

En la membrana vesicular, la SNPT actúa como sensor de Ca^+ en la vesícula, la SNPB se encarga de reconocer la membrana presináptica y la SNPF establece un poro de fusión con la membrana. En el citoplasma se encuentra la proteína de fusión, que requiere la SNAP para su acople al eje. En la membrana presináptica se encuentra SNTX, encargada de reconocer la membrana vesicular, y la SNAP 25, captadora de las proteínas citoplasmáticas (Lecznar y Krasmska, 2007).

Una vez que la vesícula se fusiona a la membrana presináptica, el neurotransmisor se libera en el espacio sináptico e interactúa con los receptores, ubicados tanto en la membrana pre como postsináptica, que regulan esta operación. Es necesario tener en cuenta que en las células gliales se convierten en glutamina, mientras que en las células gabaérgicas, en el caso de la corteza cerebral, están en estrecha relación con las células glutamatérgicas piramidales y por acción de la enzima que descarboxila al ácido glutámico (GAD) se convierte en neurotransmisor GABA (Bergles *et al.*, 1999).

La glucosa sérica es el precursor más importante para la síntesis de ácido glutámico en el sistema nervioso. La captura de glucosa se realiza por la acción de los transportadores de la familia Glu, los cuales se expresan tanto en las células endoteliales como en los astrocitos. Por acción de los astrocitos, la glucosa se convierte en ácido láctico, el cual se libera en el líquido extracelular, luego las neuronas lo captan y se constituye así en una de sus alternativas de sustrato energético. Los astrocitos tienen una capacidad limitada para sintetizar ácido láctico. Las neuronas, convierten el lactato en

pirúvico y a este en acetil CoA, el cual ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico, donde se une con el oxalacetato para formar citrato. Este pasa luego, sucesivamente, a isocitrato y a alfa-cetoglutarato, el cual puede ser transaminado a glutamato por transaminasas como la aspartato aminotransferasa, que utiliza donadores de grupos amino como aspartato y alanina (Ottersen y Storm-Matisen, 2000).

3.4.1.2. Receptores del glutamato en el SNC

En el SNC, el L-glutamato ejerce su función por medio de receptores específicos frecuentemente localizados en las neuronas y células gliales y están así, idealmente situados para mover neurotransmisores hasta el sitio de liberación y de acción (Hollmann y Heinemann, 1994; Böhm *et al.*, 1997). Las acciones fisiológicas del glutamato que responden al ácido glutámico están mediadas a través de la activación de dos familias de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos, distribuidos en todo el SNC (Hollmann y Heinemann, 1994; Moreno-González y Zarain-Herzberg, 2006).

La primera familia la forman canales iónicos forman un canal iónico y dan origen a la transducción rápida de las señales activados por ligando o GluRs ionotrópicos (iGluRs), permeables a Ca^{2+} , Na y K. Los iGluRs están compuestos por: receptores para α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), los receptores para kainato (KA) y los receptores para N-Metil-D-aspartato (NMDA) (Hollmann y Heinemann, 1994, Lerma, 1997). Además de los lugares de fijación del agonista, sobre la representación esquemática de cada receptor se indican los sitios descritos de regulación alostérica, CTZ, ciclotiacida; 2,3,- BZD, 2,3-benzodiacepina. En la parte inferior se

enumeran las subunidades clonadas de cada uno de ellos, cuya combinación da lugar a receptores recombinantes con propiedades funcionales semejantes a las observadas en los receptores nativos (Lerma, 1997).

Los iGluRs están constituidos por ensamblajes hetero-oligoméricos de subunidades proteicas integrales de membrana. Una subunidad típica de los iGluRs consiste en un dominio amino terminal (NTD), un dominio de unión al ligando (S1, S2), tres dominios transmembranales (TMD), un asa reentrante de poro y un dominio carboxilo terminal (CTD) (Ottersen y Storm-Mathisen, 2000).

La familia de receptores de tipo AMPA incluye a las subunidades GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4, las cuales forman el receptor por ensamble heterooligomérico. En cada subunidad existen dos versiones de un segmento de ADN de 115 pares de bases llamadas *flip* y *flop*, que codifican para 38 aminoácidos, que resultantes de un empalme alternativo del pre-ARNm y que difieren en su respuesta a los agonistas (Lerma, 1997). En los transcritos primarios de GluR2, el codón CAG, que codifica para una glutamina en el segundo paso transmembranal (TMD2) puede ser modificado a CIG para codificar una arginina, lo que disminuye la permeabilidad del receptor al calcio. Las subunidades GluR2, GluR3 y GluR4 pueden editarse en un codón de arginina (AGA), reemplazándolo por un codón de glicina (IGA), lo que disminuye la velocidad de recuperación de la desensibilización del receptor (Figura 7 y 8) (Moreno-González y Zarain-Herzberg, 2006).

Se han clonado cinco subunidades de receptores para kainato. Las subunidades GluR5, GluR6 y GluR7 pueden ensamblarse entre sí para producir canales funcionales o co-expresarse con las subunidades K1 o K2. El pre-ARNm de los receptores de kainato se procesa por empalme alternativo, lo que genera las isoformas GluR5a-d, GluR6 y GluR6-2, y GluR7a y 7b, de las cuales se desconoce su función precisa. El ARNm de las subunidades GluR5 y 6 se modifica también en el sitio presente en el TMD2. La subunidad GluR6 sufre otras dos modificaciones en el TMD1 en los sitios conocidos como I/V (isoleucina/valina) y T/C (tirosina/cisteína) (Lerma, 2003).

Los receptores de Glu tipo NMDA poseen alta permeabilidad para Ca^{2+} y sensibilidad dependiente del voltaje al Mg^{2+} . Se han identificado tres subtipos de subunidades presentes en los NMDA funcionales: la NR1, la NR2 (NR2A-D) y la NR3 (NR3A y 3B). En el ratón se han identificado ocho isoformas funcionales de la subunidad NR1, que se originan por empalme alternativo del pre-ARNm (Ottersen y Storm-Mathisen, 2000). Las subunidades NR2 y NR3 tienen diversas variantes producidas por empalme alternativo, aunque su relevancia es aún poco conocida. La subunidad NR2D puede ser modificada por empalme alternativo de la región 3' del pre-ARNm, para producir una isoforma con un inserto de 33 aminoácidos adicionales en la CTR de la proteína. A su vez, la subunidad NR3A puede tener un sitio de 20 aminoácidos extra en la CTR. Las subunidades NR2B, NR2C y NR2D también tienen sitios de empalme alternativo en sus regiones 5'-no traducida del pre-ARNm. (Lerma, 2003).

A la segunda familia pertenecen los GluRs acoplados a una proteína G y a los segundos mensajeros inositol 3-fosfato, diacilglicerol y AMP cíclico; éstos reciben también el nombre de receptores metabotrópicos (mGluRs) (Conn, 2003). Éstos son generados por la activación de la Fosfolipasa C, que hidroliza fosfoinosítidos, o por inhibición de la adenilato ciclasa, que regula a la baja la actividad de la proteína kinasa A, dependiente del AMP cíclico (cAMP) (Lerma, 1997).

Los mGluRs tienen como estructura general un gran NTD, siete segmentos TMD separados por pequeñas asas intracelulares y extracelulares, y una región CTD de longitud variable. Los ocho subtipos de mGluR se clasifican en tres grupos funcionales principales, con base en sus secuencias homólogas, su acoplamiento a segundos mensajeros y su selectividad a varios agonistas. El grupo I, que incluye mGlu1 y mGlu5, se acopla principalmente a una proteína Gq que aumenta la hidrólisis de fosfoinosítidos y funciona principalmente como receptor postsináptico involucrado en un aumento de la excitabilidad neuronal. El grupo II, que incluye mGlu2 y mGlu3 y el grupo III, el mGlu-4, -6, -7 y -8, se acoplan a Gi/Go y se asocian a vías efectoras, como es la inhibición de la adenilato ciclasa, y generalmente funcionan como receptores presinápticos, con lo que disminuyen la liberación del neurotransmisor (Conn, 2003). Las variantes de empalme alternativo, se encuentran en tres de los mGluRs: mGluR1a-d, mGluR4a y b, y mGluR5a y b, que resultan de la utilización de sitios aceptores de intrón para empalme alternativo cuya posición se conserva en los tres genes (Figura 7 y 8) (Lerma, 1997).

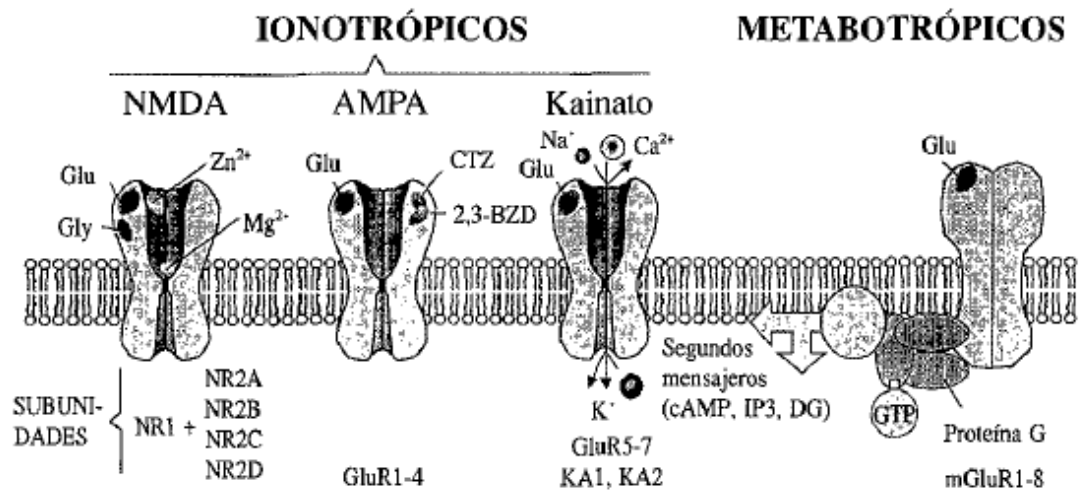


Figura 5. Los receptores del glutamato agrupados en dos grandes familias (Tomada de Lerma, 1997).

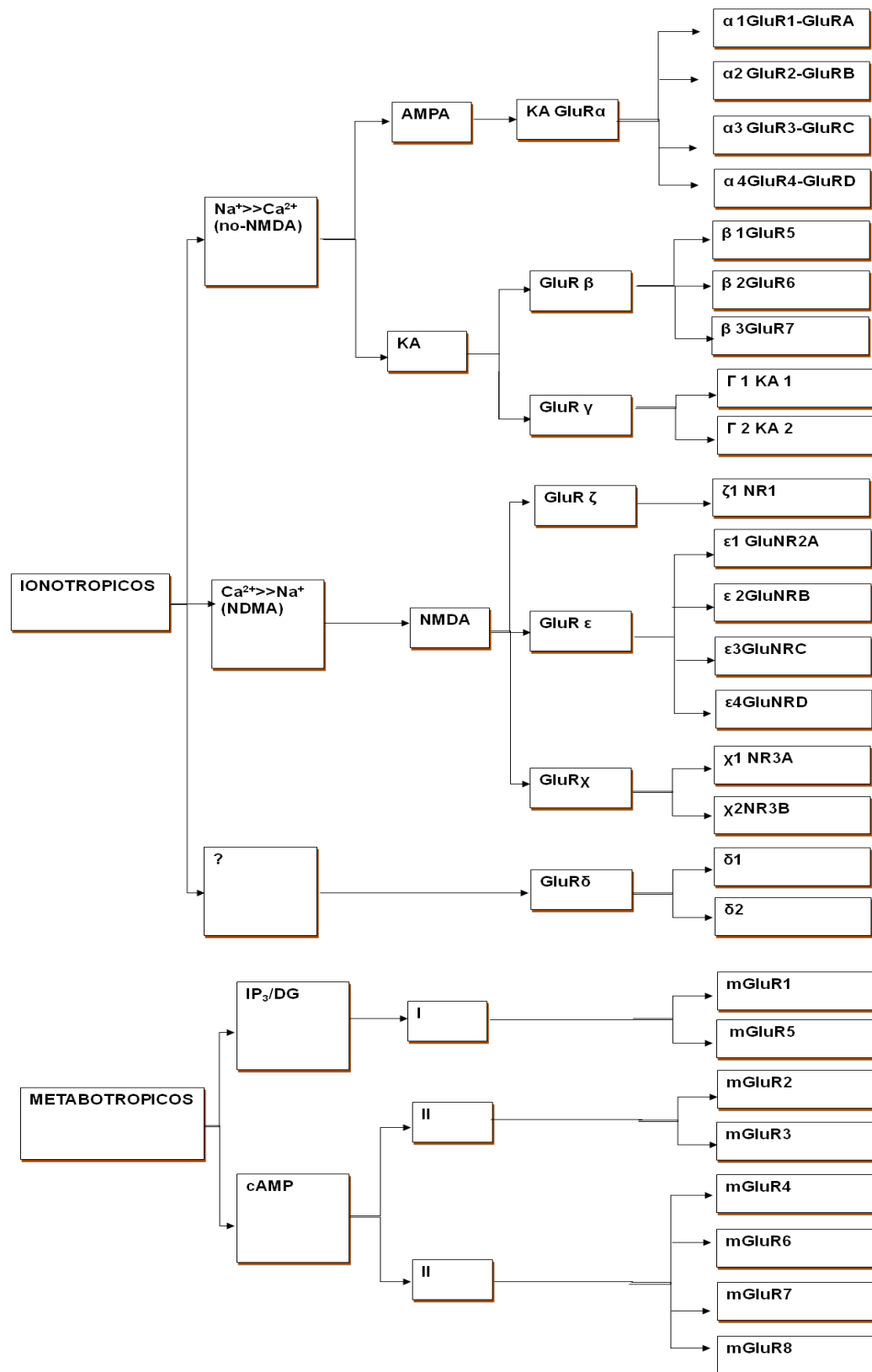


Figura 6. Árbol de receptores a glutamato (Tomado de González, 2009).

3.4.2. Rutas metabólicas del glutamato

En los mamíferos, la absorción y metabolismo de los aminoácidos es compleja y altamente integrada, con un flujo continuo dentro de y entre células corporales (Moughan, 2003). El glutamato se metaboliza extensamente para apoyar la energía y la homeostasis del N (Wu, 1998). El glutamato parece ser un precursor especialmente importante de la energía metabólica para los rumiantes, que sirve como fuente de combustible oxidable y de carbonos para apoyar la gluconeogénesis hepática y renal y para apoyar el control de la glucosa placentaria por el hígado fetal (Heitmann y Bergman, 1980; Howell *et al.*, 2001) (v. g. en el ganado lechero lactante alimentado con forraje) aproximadamente el 43% del glutamato se oxida a CO₂, cifra ligeramente mayor que la observada para el aspartato, la alanina y la glutamina (aproximadamente 28 a 35%), y es aproximada a la del acetato, propionato, y butirato. El glutamato también puede desempeñar un papel especialmente importante en el ciclo del N en los rumiantes, debido a la gran cantidad de NH₃ producido por la fermentación microbiana (Howell *et al.*, 2003).

Un problema al representar el metabolismo intermedio en la mucosa intestinal ha sido descrito como oxidación incompleta vs. completa (Watford, 1994). La forma está representada por el catabolismo parcial de un sustrato producto de 3-carbonos (por ej. piruvato, lactato y alanina). Desde luego, es obvio que cuando la glucosa es el sustrato metabólico, su oxidación completa necesariamente involucra el movimiento del carbono a través de la unión del piruvato. Sin embargo, cuando el glutamato es el sustrato oxidativo, sus carbonos entran en el metabolismo intermedio a través del α -

cetoglutarato, sintetizando uno u otro vía transaminación del glutamato o vía glutamato deshidrogenasa. Esto lleva a la síntesis directa del oxalacetato y, subsecuentemente, de citrato (Reeds *et al.*, 2000).

La importancia de la glucosa derivada de los precursores de aminoácidos y el papel del glutamato como una fuente principal de aminoácidos gluconeogénicos derivados de hidrocarburos es bien conocida en los rumiantes. En ovejas alimentadas con una dieta forrajera, el hígado es el principal productor de glutamato derivado de la glucosa, mientras que el riñón presenta una cantidad significativa de glutamato derivado de la glucosa de animales en ayunas y con acidosis (Howell *et al.*, 2001). En los no rumiantes, el glutamato es metabolizado por enzimas hepáticas y renales, mientras que el epitelio intestinal no es importante por tener una gran capacidad para metabolizar D-isómeros (Hollmann y Heinemann, 1994).

En un estudio realizado por Howell *et al.*, (2001), la concentración de glutamato en el epitelio ileal de ovejas fue mayor en comparación con el del hígado y la del riñón, lo que sugiere que el epitelio intestinal de los rumiantes, como el de los no rumiantes, posee una capacidad metabólica de glutamato relativamente baja, mientras que el glutamato fue detectado en el riñón de oveja, lo que también indica que los niveles diferentes de suplemento de glutamato y la capacidad para su metabolismo entre rumiantes y no rumiantes. Es decir, los animales expuestos a grandes cantidades de glutamato en la ingesta, como los rumiantes, pueden haber evolucionado para poseer una mayor capacidad para metabolizar el glutamato después de la absorción intestinal.

3.4.2.1. Transportadores de glutamato

De acuerdo con datos bioquímicos, estudios inmunocitoquímicos demostraron que el glutamato está ampliamente distribuido en el cerebro y no solo localizado en las neuronas glutamatérgicas, sino también en neuronas con otras señales transmisoras. Esto no es sorprendente, teniendo en cuenta la implicación del glutamato en varias funciones metabólicas como la síntesis de proteínas y el metabolismo intermedio y que es un precursor del GABA (Ottersen y Storm-Mathisen, 2000). La ubicación del glutamato y la incapacidad de los antiseros para diferenciar entre las fuentes metabólicas o transmisoras, abogan por un enfoque cuantitativo que podría funcionar en las terminales nerviosas. Como se indicó anteriormente, el glutamato no solo es un neurotransmisor, sino que también participa en una variedad de funciones metabólicas en el cerebro. Los transmisores del glutamato pueden ser sintetizados a través de diferentes rutas metabólicas y diferentes poblaciones de neuronas glutamatérgicas que pueden diferenciarse en ciertos aspectos del metabolismo del glutamato (Ottersen y Storm-Mathisen, 2000).

En los no rumiantes se han identificado las proteínas responsables de la captación de glutamato; tres sistemas de actividades de transporte de aminoácidos aniónicos (ASC, x^-_{Cl} y X^-_{AG}) capaces de mediar la absorción de glutamato, han sido perfilados por sus propiedades bioquímicas. En contraste con los sistemas ASC y x^-_{Cl} , la actividad del sistema X^-_{AG} (Na dependiente) es capaz de concentrar L-glutamato, y transportar L- y D-aspartato y está presente en las membranas basal y (o) apical de varios tipos de células,

incluyendo las células absorbentes intestinales y renales, los epitelios pancreáticos y de la placenta, y los hepatocitos (Hollmann y Heinemann, 1994; Howell *et al.*, 2001).

De las cinco proteínas de mamíferos capaces de la actividad del sistema X^-_{AG} que han sido clonadas, GLAST1, GLT-1, EAAC1, y EAAT4 son expresadas fuera del tejido cerebral y (o) de la retina. Se han descrito homólogos de la especie bovina de GLAST1 y EAAC1 de larga duración, y la expresión de estos transportadores se han identificado en el cerebro de ovejas y bovinos (Howell *et al.*, 2001). El sistema de actividad X^-_{AG} está restringido a las membranas apicales de los enterocitos, tanto en membranas basales a las caniculares de los hepatocitos pericentrales, y en las membranas apicales y en las basolaterales del epitelio proximal distal (Welbourne y Matthews, 1999). Con respecto a la capacidad del epitelio intestinal para la absorción de aminoácidos aniónicos, en ovejas se ha documentado que al disminuir cuantitativamente la ingesta del intestino delgado la aparición portal del aspartato y glutamato es relativamente menor así como niveles relativamente altos de desaparición duodenal (Howell *et al.*, 2003).

La existencia de un flujo positivo de L-glutamato (92.9 g /d) a través del hígado de los terneros (Koeln *et al.*, 1993) sugieren que los hepatocitos poseen una gran capacidad para el transporte del glutamato. El nivel del glutamato relativamente más bajo del hígado es coherente con la elevada actividad hepática de glutamato utilizando las enzimas: glutamina sintetasa, oxidasas D-AA, y glutamato cytotransferasa. Esta relación epitelio ileal – hígado - riñón, del perfil de concentración de glutamato es consistente con las concentraciones de glutamato medidas en los tejidos de animales no

rumiantes y es consistente con el concepto de que la concentración de glutamato es inversamente proporcional a la actividad de la D-aspartato oxidasa. La que se expresa en el tejido hepático y renal del ganado (Welbourne y Matthews, 1999). Esto sugiere que el sistema de las proteínas X_{AG}^- podría ser responsable de la absorción en el intestino y el hígado de glutamato y aspartato. De manera similar, las observaciones que EAAC1 y GLT -1 expresadas por el epitelio ruminal y el omasal, indicando el flujo neto de glutamato del tejido del estómago a la sangre (Remond *et al.*, 2000), es probablemente el resultado de la captación de glutamato de alta afinidad a partir de fluido ruminal por uno o ambos de estos transportadores localizados en la membrana apical granulosa (Howell *et al.*, 2001).

El patrón de GLAST1, GLT-1, y EAAC1 expresado por el tejido de ovejas y bovinos es similar al de los humanos, ratas, ratones y conejos, aparte de la obvia excepción del tejido pre estomacal. Además, el hecho de que exista una expresión del mRNA EAAC1 en el colon humano, y del mRNA EAAC1 y GLT-1 en el páncreas humano (Nakayama *et al.*, 1996), pero no exista en las ratas, ratones y conejos (Martínez-López *et al.*, 1998) sugiere que los rumiantes comparten más similitud de expresión del sistema transportador X_{AG}^- con los seres humanos que con otras especies. Sin embargo, son necesarios más estudios que profundicen en una comparación definitiva de alta afinidad de la expresión de transportadores de glutamato en ovinos y bovinos con la de otros animales de especies no rumiantes (Howell *et al.*, 2001).

3.5. Metabolitos sanguíneos

La importancia de determinar los perfiles metabólicos radica en la posibilidad de diagnosticar en forma temprana desórdenes metabólicos, antes que se vea afectada negativamente la capacidad productiva/reproductiva del animal, lo cual produciría pérdidas de importancia económica (Perveen y Usmani, 1993).

3.5.1. Proteínas

Las proteínas están formadas por aminoácidos esenciales y no esenciales, la mezcla de los aminoácidos absorbidos por los animales sirve para la síntesis de proteínas corporales. La eficiencia con la que se realiza dicha síntesis depende en parte, del grado en que se asemejan las mezclas de aminoácidos absorbidos a las de las proteínas corporales y, en parte, de la magnitud en que pueden modificarse esas proporciones. Por lo tanto, el valor biológico de las proteínas de los alimentos depende de la cantidad y el tipo de aminoácidos existentes en su molécula: cuanto más se parezca la composición en aminoácidos de la proteína de los alimentos a la de las proteínas corporales, mayor será el valor biológico. Los animales tienen poca capacidad para retener aminoácidos en estado libre, de modo que si algún aminoácido no se utiliza inmediatamente para la síntesis proteica, se degrada rápidamente y se transforma en otro aminoácido no esencial que precise el animal, o se utiliza como fuente de energía. Puesto que los aminoácidos esenciales no pueden sintetizarse con facilidad en el organismo, los desequilibrios en la ración suponen un derroche (McDonald *et al.*, 1988).

En el caso de los rumiantes, los microorganismos del rumen sintetizan todos los aminoácidos esenciales, por lo que teóricamente esta clase de animales es independiente de su presencia en la ración. Sin embargo, no pueden lograrse los máximos ritmos de crecimiento o de producción si la ración no aporta aminoácidos en la forma adecuada (McDonald *et al.*, 1988). El insuficiente consumo dietario de energía o proteína sitúan a un animal en un balance de energía negativo, cuando los gastos de energía para las funciones fisiológicas tales como la locomoción, producción de leche, reproducción y mantenimiento, son mayores que el aporte de energía con la alimentación (Scaramuzzi *et al.*, 2006). El balance de energía negativo se acompaña por pérdidas del peso vivo y de la condición corporal. El peso vivo de un animal está determinado por el tamaño corporal, la conformación y el engorde relativo; entonces, un animal con poco peso corporal puede tener o bien una condición corporal pobre o un cuerpo pequeño con una adecuada condición corporal (Dunn y Moss, 1992; Scaramuzzi *et al.*, 2006).

3.5.1.1. Degradación de proteínas

La velocidad y extensión de la degradación de las proteínas depende de la actividad proteolítica de la microbiota ruminal, del tipo de proteína de la dieta (Bach *et al.*, 2005), así como de la velocidad de recambio ruminal y de la presencia de inhibidores enzimáticos o de factores antinutricionales. Los péptidos y aminoácidos producidos en el rumen y los contenidos en esas formas en el alimento, se transportan hacia el interior de las células microbianas. Los péptidos pueden continuar degradándose a aminoácidos por la acción de las enzimas peptidasas y liberar los aminoácidos que los componen. Por último, los aminoácidos pueden ser desaminados y producir ácidos

grasos volátiles, CO₂ y amoníaco. También pueden ser reutilizados durante la síntesis de proteína microbiana. El destino de los aminoácidos y péptidos absorbidos depende de la disponibilidad de energía en el rumen. Si hay suficiente energía disponible, los microorganismos la utilizarán para la síntesis proteica, de lo contrario, la prioridad estará en las rutas catabólicas que produzcan ATP para cubrir las necesidades energéticas del resto de las funciones metabólicas del microorganismo (Rodríguez *et al.*, 2007).

Los factores más importantes que afectan la degradación microbiana de las proteínas de la dieta son el tipo de proteína, las interacciones con otros nutrientes, principalmente los compuestos energéticos y la población microbiana predominante, la cual depende del tipo de ración, la tasa de pasaje y el pH ruminal (Bach *et al.*, 2005). Los microorganismos ruminales degradan las proteínas dietarias a ácidos orgánicos, CO₂ y NH₃, y utilizan este último para la síntesis de nuevas proteínas. Si la dieta contiene proteínas de alta degradabilidad, puede generarse un exceso de amoníaco en el rumen que pasará a través de las paredes ruminales y, vía vena porta, llegará al hígado, donde será convertido en urea, provocando un incremento en la concentración de nitrógeno ureico en sangre (Rabaglino *et al.*, 2007).

3.5.1.2. Digestión de las proteínas

La digestión de las proteínas da lugar a la producción de aminoácidos y pequeños péptidos que se absorben por las vellosidades intestinales a la sangre portal. Son trasladados hasta el hígado, donde se incorporan al acervo de aminoácidos. Posteriormente, pueden emplearse en la síntesis de proteína o pueden llegar a la sangre

sistémica y unirse a los aminoácidos producidos como resultado del catabolismo tisular, para aportar la materia prima para la síntesis de proteínas y demás compuestos nitrogenados de importancia biológica. Los aminoácidos que superan las necesidades son transportados al hígado y degradados hasta amoníaco o cetoácidos. Estos últimos, pueden utilizarse para la síntesis de aminoácidos o para producir energía. Parte del amoníaco puede utilizarse en aminaciones, pero casi todo se convierte en urea y se excreta en la orina o se recicla en la saliva. En los rumiantes, puede absorberse gran cantidad de amoníaco del rumen, llegar a la circulación portal y transformarse en el hígado en urea, excretándose o reciclándose, vía saliva o por la pared del rumen (McDonald *et al.*, 1988).

3.5.2. Ciclo de la urea

El amoníaco es el intermediario central en la degradación y asimilación del N en el rumen. Los niveles de amoníaco en el rumen varían desde 0 a 130 mg de N/100 mL, según la fuente de N y el momento posprandial. La posibilidad de utilizar el amoníaco, permite a los microorganismos del rumen reciclar cantidades importantes de urea, provenientes del metabolismo intermediario del animal, como fuente de N para la síntesis de proteína microbiana, cuando se dispone de cantidades suficientes de energía. Otros compuestos nitrogenados también se pueden reciclar mediante la saliva o la pared ruminal, entre ellos los metabolitos de las purinas y las mucoproteínas. Esta adaptación evolutiva de los rumiantes reduce efectivamente el mínimo de N requerido e incrementa el período de supervivencia de los animales subalimentados (Rodríguez *et al.*, 2007).

Cuando debido a la extensa degradación de las proteínas la cantidad de amoníaco es elevada, el exceso de amoníaco se absorbe por medio de las paredes del tracto. Posteriormente, se convierte en urea en el hígado para reducir la circulación de este compuesto por el organismo, pues es tóxico para el animal. La urea producida se puede reciclar al rumen para utilizarse por parte de los microorganismos o se excreta en la orina del animal, con la consecuente pérdida de N (Bach *et al.* 2005; Rodríguez *et al.*, 2007). Este proceso, conocido como Ciclo de la Urea, es el resultado de la adaptación de los rumiantes al uso ineficiente de las proteínas en el rumen, para evitar la toxicidad de las moléculas de amoníaco y aprovechar el N que se libera posteriormente. Así, la disponibilidad de energía en el rumen permite su incorporación a la proteína microbiana. La síntesis de las moléculas de urea en el hígado requiere energía, por lo que es un proceso costoso y puede influir negativamente en la producción animal, ya que una parte de la energía disponible para el mantenimiento o para la producción de carne o leche, debe destinarse a compensar la situación que se crea por exceso de amoníaco en sangre (Rodríguez *et al.*, 2007).

Las bacterias ruminales también pueden incorporar directamente aminoácidos y péptidos de la dieta (Remond *et al.*, 2000). La baja concentración de los aminoácidos libres en el rumen indica que éstos se utilizan rápidamente, aunque el incremento que se produce en las primeras horas post-alimentación sugiere que la proteólisis transcurre a mayor velocidad que la utilización de los aminoácidos. Aproximadamente, el 30% del N de la dieta que se degrada en el rumen se incorpora a la proteína microbiana en forma de péptidos y aminoácidos (Darlis *et al.*, 2000).

El NH_3 es una molécula muy tóxica que se une al glutamato para su detoxificación, transformándose en glutamina por acción de la enzima glutamina sintetasa. Este compuesto sirve como un mecanismo de transporte no tóxico que lleva al NH_3 al hígado para la síntesis de urea. La glutamina puede ser utilizada como fuente de energía por diferentes células, entre ellas las de los tejidos reproductivos, resultando en la liberación de grandes cantidades de NH_3 . El NH_3 puede afectar la supervivencia celular debido a que produce una disminución del α -cetoglutarato al convertirlo en glutamato, y por lo tanto, interfiere con uno de los intermediarios del ciclo de Krebs produciendo una disminución en la formación de ATP por la célula (Rabaglino *et al.*, 2007).

El amonio, producto tóxico del catabolismo de las proteínas, es convertido a urea por el ciclo de la urea en el hígado de los mamíferos. La incorporación de dos átomos de nitrógeno dentro de la urea es catalizada por seis enzimas: (tres de las mitocondrias), N-acetilglutamato sintetasa, carbamoilfosfato sintetasa-1 y ornitotranscarbamilasa y otras tres citosólicas, argininosuccinato sintetasa, argininosuccinatlasi y arginasa-1 (Heibel *et al.*, 2012).

La NAGS cataliza la formación de N-acetil glutamato, un activador alostérico esencial de CPS1, en la matriz mitocondrial de los hepatocitos y en las células epiteliales del intestino delgado (Caldovic *et al.*, 2002). Dentro de los hepatocitos, la actividad de la NAGS y la abundancia del NAG son reguladas por la L-arginina, el amonio y el

consumo de proteína en la dieta, y por lo tanto, en respuesta a estos factores, el sistema NAGS/NAG puede jugar un papel crítico en la regulación de la ureogénesis (Heibel *et al.*, 2012).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del área de estudio

El estudio se realizó en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo, localizada en el municipio de Tlahualilo, Durango, entre las coordenadas geográficas 25° 53' 31.99'' LN y 103° 36' 11.23'' LO, a una altura de 1,117 metros. Las condiciones ambientales son de clima del tipo semidesértico extremo con oscilaciones térmicas muy extremas, con precipitación y temperatura media anual de 217.1 mm, y 22.3 °C, respectivamente. El mes más cálido es junio con temperaturas superiores a los 40°C y el mes más frío es enero con temperaturas mínimas de 4°C.

4.2. Animales, alimentación y período experimental

Se utilizaron 18 cabras prepúberes encastadas 7/8 Saanen – Alpino y 1/8 Criollo, de tres meses de edad y peso promedio de 16 kg. Las cabras fueron alimentadas dos veces al día: por la mañana (0700) con heno de alfalfa (14% PC, 1.14 ENm Mcal kg⁻¹) y ensilado de maíz (8.1% PC, 1.62 ENm Mcal kg⁻¹), y por la tarde (1800) maíz rolo (11.2% PC, 2.38 ENm Mcal kg⁻¹). Se ofreció agua limpia, sales minerales *ad libitum* y sombra durante todo el periodo experimental. Se registró el peso de los animales una vez por mes y previo a su alimentación, acondicionándose una balanza (modelo G-30) con una jaula que permitiera la inmovilización de las cabras. La condición corporal se midió mediante palpación dorsal y costal, utilizando una escala de 5 unidades de nivel de grasa

en la región lumbar que va desde 1 (muy flaca) a 5 (muy gorda), y se realizó cada mes, al mismo tiempo del registro del peso vivo.

4.3. Diseño de tratamientos y preparación de la solución buffer

Las cabras fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos con peso promedio y condición corporal homogéneos: 1) Amino ácido excitador (AAE, n=10; 16.52 ± 1.04 kg, 3.4 ± 0.12 CC). 2) Control, (CONT, n=8; 15.96 ± 0.98 kg PV, 3.15 ± 0.11 CC). Durante todo el periodo experimental, el grupo AAE recibió infusiones intravenosas de 7 mg kg^{-1} PV de L-glutamato los martes y viernes de cada semana, mientras que el grupo CONT recibió 0.08 mL kg^{-1} de infusión salina al tiempo de las infusiones de L-glutamato, a fin de provocar en ambos grupos el estrés al que fueron sometidas las cabras de este grupo.

Se pesaron 4 g de L-glutamato, -presentación en polvo- (Merck- $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ -art-289, Germany) en una balanza analítica y se disolvieron en 50 mL de agua destilada estéril. Es importante mencionar que dicho polvo se agrega lentamente al agua para lograr la disolución completa, de lo contrario, la disolución es prácticamente imposible. Posteriormente se procedió a llevar la solución a pH neutro. Todo el proceso de preparación se llevó a cabo en ambiente estéril. La solución preparada contenía $80 \text{ mg de L-glutamato mL}^{-1}$.

4.4. Muestreo sanguíneo intermitente

A partir del mes de junio, las muestras de sangre fueron colectadas de cada cabra mediante venopunción yugular una vez cada quince días, utilizando agujas estériles de 0.8 x 38 mm y tubos colectores estériles Vacutainer de 10 mL; dicho muestreo se realizó de junio a octubre. Una vez en el laboratorio, las muestras, se dejaron reposar a temperatura ambiente por un lapso de 30 minutos hasta que ocurriera la retroacción del coágulo, después de esto, fueron centrifugadas (1,500 *g* x 15 min), el suero fue colectado y almacenado con su réplica en tubos de propileno de 1.5 mL a una temperatura de 4° C.

4.5. Cuantificación de progesterona y determinación del inicio de la pubertad

Se utilizaron las 40 muestras por cabra colectadas durante el sangrado intermitente para evaluar su contenido de P4, mediante RIA. La prueba fue modificada y validada para el uso en suero de rumiantes, de acuerdo con los procedimientos señalados por Schneider y Halford (1996). Los análisis se efectuaron en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Ciencia Animal, de la Universidad Estatal de Nuevo México, Las Cruces, NM, EUA, observando un coeficiente de variación intra-ensayo de 9.8% y un límite de detección de 0.2 ng mL. Las concentraciones séricas de P4 >1 ng mL⁻¹ en dos muestras consecutivas por cabra, fueron clasificadas como indicativo de inicio de la pubertad (Cushwa *et al.*, 1992).

4.6. Cuantificación de metabolitos sanguíneos

Las muestras de sangre fueron analizadas por su contenido de metabolitos sanguíneos (proteína total y urea) mediante análisis espectrofotométricos (Coleman 15 Junior II). La concentración sérica de proteína total fue determinada mediante un kit basado en el ácido bicínico, considerando como estándar a la albúmina sérica bovina 16 (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA), mientras que la urea en suero fue cuantificada mediante el uso del kit 640-A basado en la ureasa-18 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

4.7. Análisis estadístico

El peso vivo, la condición corporal y la concentración sérica de proteína total y urea fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA), en un diseño completamente al azar, con bloques divididos y muestras repetidas a través del tiempo (Snedecor y Cochran, 1969). El tiempo de muestreo y la interacción del tratamiento por tiempo fueron incluidos en el bloque menor, utilizando el cuadrado medio residual para probar sus diferencias. La diferencia significativa de los valores de las medias minimocuadráticas (LSMEANS) entre grupos experimentales fue obtenida con el procedimiento GLM (PROC GLM) del SAS (Littell *et al.*, 1991). La comparación de medias se realizó mediante la opción PDIFF. Debido a que los datos para proteína total y urea mostraron una alta variabilidad, se realizó su transformación mediante la raíz cuadrada con objeto de homogenizar las varianzas y proceder a hacer los análisis estadísticos pertinentes (Bland y Douglas, 1996). La proporción de cabras que presentan o no el inicio de la pubertad fué comparada con una prueba de ji-cuadrada.

4.8. Modelos estadísticos

Los modelos estadísticos utilizados para desarrollar el modelo experimental fueron los siguientes:

Modelo 1) Para peso vivo (PV) y condición corporal (CC):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde los componentes de la ecuación representan:

Y_{ij} = Respuesta de la j-ésima cabra con el i-ésimo tratamiento

μ = Media general, común a todas las unidades experimentales antes de aplicar los tratamientos

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento $i=1,2$ (AAE, CONT)

E_{ij} = Error experimental en la j-ésima repetición del tratamiento i-ésimo

Modelo 2) Para la concentración sérica de proteína total y urea

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + ID_{j(i)} + t_k + Tt_{(ik)} + E_{ijk}$$

Donde los componentes de la ecuación representan:

Y_{ijk} = Concentración de Proteína total

Y_{ijk} = Concentración de Urea

μ = Media general, común a todas las unidades experimentales antes de aplicar los tratamientos

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento $i=1,2$ (AAE, CONT)

$ID_{j(i)}$ = Efecto de la j-ésima cabra en cada i-ésimo tratamiento (error A) $j=1,\dots,10$ ($n=10$ cabras por tratamiento)

t_k = Efecto del k-ésimo tiempo de muestreo. $K=1,\dots,6$ (tiempos de muestreo)

$Tt_{(ik)}$ = Efecto de la interacción tiempo muestreo y tratamiento

E_{ijk} = Error experimental $E_{ijk} \sim \text{NID}(0, \sigma_e)$ (error B)

Modelo 3) χ^2 para la determinación del % de cabras en pubertad

$$\chi^2_0 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^c = \frac{(n_{ji} - E_{ij})}{E_{ij}}$$

Donde los componentes de la ecuación representan:

χ^2_0 = Estadístico de prueba para probar H_0

n = Tratamiento (AAE, CONT)

c = Tiempo de muestreo (1,...,15)

n_{ij} = Concentración de Progesterona de la i-ésima cabra en el j-ésimo tratamiento.

E_{ij} = Valores esperados de concentración de progesterona bajo el supuesto de homogeneidad de poblaciones de grupos de tratamiento para la i-ésima cabra grupo genético del j-ésimo tratamiento.

Calculados mediante:

$$E_{ij} = \frac{(n_i - c_j)}{n}$$

Donde los componentes de la ecuación representan:

n_i = Número de cabras por tratamiento

c_j = Número de cabras muestreadas por tiempo

n = Número total de cabras

Se plantearon las siguientes hipótesis:

H_0 : Los dos tratamientos muestran las mismas concentraciones de progesterona en dos muestras consecutivas, sin diferencias en el tiempo para el inicio y el porcentaje de la pubertad.

H_1 : Los dos tratamientos muestran diferentes concentraciones de la progesterona en dos muestras consecutivas, con diferencias en el inicio y el porcentaje de la pubertad, favoreciendo al grupo suplementado con glutamato.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El promedio inicial para PV y CC fue de 16.65 kg y 3.31 unidades, con valores finales para estos promedios de 23.2 ± 0.72 kg y 3.37 ± 0.10 unidades respectivamente, sin existir diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos a lo largo del período experimental. En el mismo sentido, no se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos con respecto a los promedios séricos globales para proteína total ($P > 0.51$) y urea ($P > 0.94$). Sin embargo, existió efecto de tratamientos con respecto al porcentaje de cabras mostrando pubertad ($P < 0.05$), observando un 70% del grupo suplementado con glutamato mostrando pubertad (7/10 cabras), mientras que solo el 25% de las cabras en el grupo control logró el inicio de la pubertad (2/8 cabras) (Cuadro 1, Figura 9).

El grupo de los AAE mostró no solamente un inicio anticipado de la pubertad sino un mayor porcentaje de cabras mostrando pubertad con respecto al grupo control. Sin embargo, no existieron diferencias ($P > 0.05$) ni en las concentraciones séricas promedio de PT (65.28 ± 2.46 mg mL⁻¹) y U (23.42 ± 0.95 µg dL⁻¹), ni con respecto a las concentraciones séricas de PT y U a través del tiempo ($P > 0.05$).

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados para peso vivo (kg), condición corporal (unidades), proteína total (g/Lt), urea (µg/dl) y pubertad (%) en cabras suplementadas con glutamato (AAE) y cabras control (CONT) en el norte de México (26° Norte, n=18)

Variables	AAE	CONT	P > F	EE
Peso vivo	23.75 ^a	22.76 ^a	0.34	0.72
Condición corporal	3.69 ^a	3.38 ^a	0.06	0.10
Proteína total	8.02 ^a	8.08 ^a	0.51	0.36
Urea	4.81 ^a	4.82 ^a	0.94	0.22
Pubertad	70.0 ^a	25.0 ^b	0.05	46.00

AAE= Grupo Glutamato, CONT= Grupo Control, EE= Error Estándar

^{a, b} = Valores con diferente literal en la misma fila difieren ($P < 0.05$)

P>F, nivel de significancia observado

Respecto a la edad de inicio de pubertad el grupo AAE mostró un inicio más anticipado de la pubertad (207 ± 9 días comparado con 225 ± 12 días; $P < 0.05$). De acuerdo al fotoperiodo observado durante el tiempo de muestreo en el sitio del experimento, el máximo nivel de luz se presenta aproximadamente en mes de julio con un valor de 13.57 horas de luz, mostrando una disminución gradual hasta presentar los valores mínimos en el mes de noviembre con 11.3 horas de luz. Estos resultados sugieren que durante el inicio de la época teórica de reproducción la suplementación con glutamato impacta en el desarrollo folicular, mostrando una actividad ovulatoria anticipada (Figura 9).

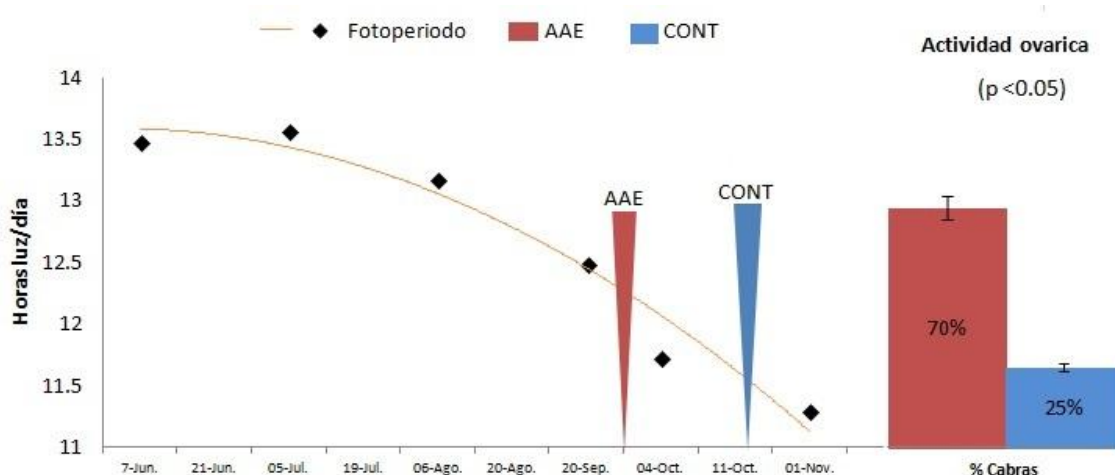


Figura 9. Comportamiento reproductivo de cabras suplementadas con glutamato (AAE) y grupo control (CONT); las flechas muestran el inicio de la pubertad (AAE= 207 ± 9 d y CONT= 225 ± 12 d), los histogramas de la derecha muestran el porcentaje de pubertad (AAE=70% y CONT=25%) bajo un fotoperiodo natural decreciente en el norte de México (26° Norte, $n=18$).

Las diferencias del porcentaje de cabras que mostraron pubertad no se relacionaron con el patrón de secreción de PT con respecto al tiempo, puesto que no existieron diferencias ($P > 0.05$) entre los grupos experimentales en los diferentes tiempos de muestreo (Figura 10).

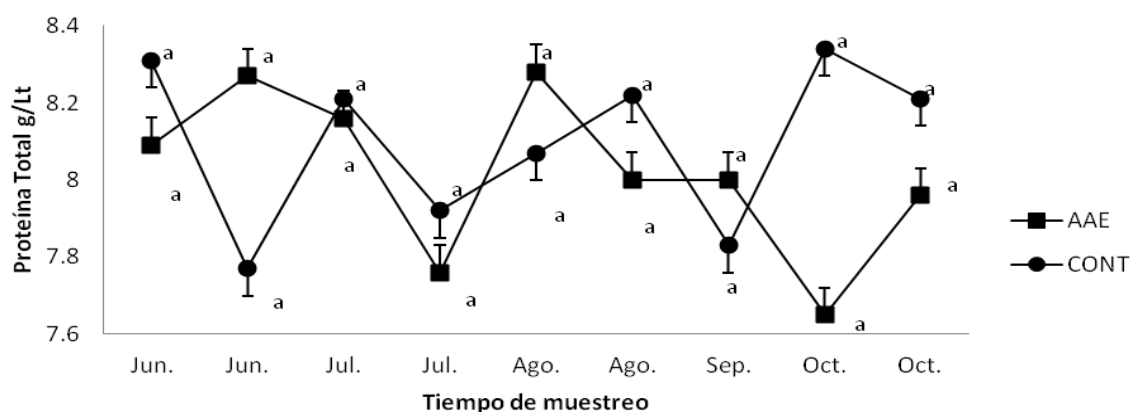


Figura 10. Concentraciones séricas de proteína total a través del tiempo de muestreo para el grupo glutamato (AAE) y el grupo control (CONT) durante el periodo experimental junio – octubre, en cabras peripúberes (n=18).

El patrón de secreción de urea con respecto al tiempo no mostró diferencia ($P=0.39$) entre tratamientos durante el periodo experimental. En general, los valores más bajos de urea se observan en el grupo glutamato. En algunos de los meses en los que existieron los niveles altos para proteína total entre tratamientos se observaron los niveles más bajos para urea (Figura 11). Los resultados indican que no existen diferencias entre los grupos control y el sometido al tratamiento con respecto a PV y CC, ni en los promedios séricos de proteína total y urea, así como tampoco se observa relación con cambios en los niveles séricos de proteína total y urea a través del tiempo durante el periodo experimental.

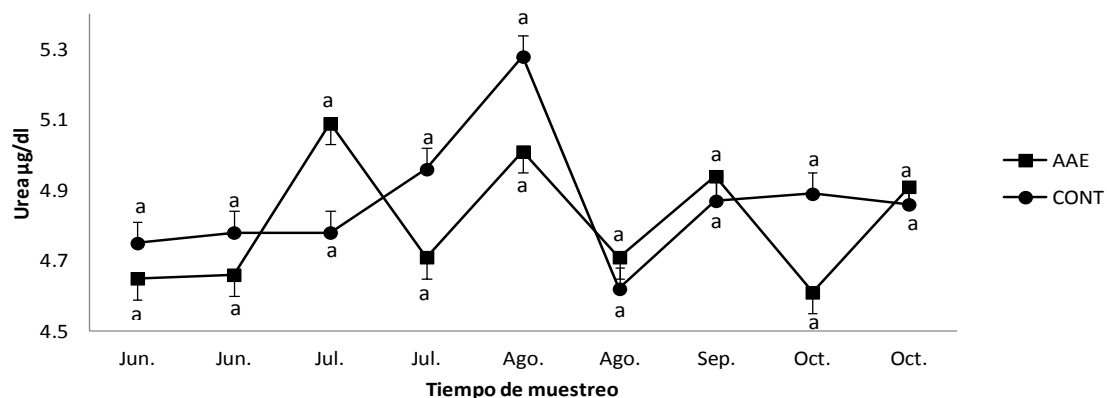


Figura 11. Concentraciones séricas de urea a través del tiempo de muestreo para el grupo glutamato (AAE) y el grupo control (CONT) durante el periodo experimental junio – octubre, en cabras peripúberes (n=18).

La hipótesis planteada al inicio del estudio, postulaba que la suplementación con glutamato promovería un inicio más temprano y un mayor porcentaje de cabras en pubertad, y que dicho escenario estaría positivamente relacionado con el aumento de los niveles de proteína y la disminución de los niveles de urea en el suero sanguíneo. De acuerdo a la evidencia del estudio, la hipótesis planteada es parcialmente aceptada, ya que las hembras suplementadas con glutamato mostraron, tanto un mayor porcentaje, como un inicio más precoz de la pubertad, pero dicho comportamiento no fue paralelo a la variación en los niveles séricos de proteína total ni de urea, así como tampoco se mostraron diferencias en los niveles séricos de proteína total y de urea a través del tiempo en las cabras suplementadas.

Los aminoácidos excitadores incrementan su efecto estimulador sobre la secreción de GnRH-LH durante la maduración sexual, mediante el incremento en la liberación de aspartato y glutamato, aminoácidos excitadores involucrados en la liberación de GnRH (Meza-Herrera, 2008). En particular, el glutamato ofrece un

marcado efecto estimulador sobre el eje reproductivo, particularmente al momento de la pubertad. En el mismo sentido, previamente se reportó un efecto positivo de la suplementación con glutamato, sobre la actividad ovárica en cabras, medida por el número de cuerpos lúteos (Meza-Herrera *et al.*, 2007; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2010; Meza-Herrera *et al.*, 2011).

Los sistemas neurotransmisores y neuromoduladores que regulan la secreción y liberación de GnRH transmiten información con respecto al nivel de combustibles metabólicos y reservas de energía corporal. Tanto el estado metabólico como la disponibilidad de nutrientes son algunos de los principales factores ambientales necesarios para el establecimiento de la función reproductiva. Al respecto, el sistema KiSS-1-GPR54-kisspeptinas opera como un sensor del estado energético del organismo, responsable de la modulación de la activación del eje reproductor en la pubertad por factores metabólicos y/o nutricionales. Estudios realizados recientemente proponen que las kisspeptinas han sido identificadas en neuronas glutamatérgicas y están involucradas en el control glutamatérgico de las neuronas de GnRH a la pubertad, aumentando la transmisión en las neuronas de GnRH de una manera dependiente de estradiol (Ottersen y Storm-Mathisen, 2000; Meza-Herrera *et al.*, 2010, 2011; Hammed *et al.*, 2011; Roa *et al.*, 2011).

Otro factor ambiental importante en cuestión reproductiva es el fotoperiodo. De acuerdo a Foster (1994), en los animales peripuberales, la pubertad generalmente se presenta durante los días en que se reducen las horas luz. Lo anterior adquiere mayor

importancia al observar que, en el presente estudio, los animales suplementados con glutamato mostraron una actividad ovulatoria anticipada; dicho comportamiento puede ser posible debido a que el sitio de acción de la melatonina sobre el hipotálamo es compatible con la localización de la expresión de gen KiSS-1, el cual recientemente, ha sido identificado en neuronas glutamatérgicas, involucradas en el control de las neuronas de GnRH en la pubertad (Meza-Herrera *et al.*, 2010, 2012).

Ciertamente, se ha establecido que los incrementos en la neurotransmisión glutamatérgica constituyen uno de los principales eventos excitatorios trans-sinápticos que estimulan el inicio de la pubertad (Meza-Herrera, 2008; Meza-Herrera *et al.*, 2009; Meza-Herrera *et al.*, 2011), debido a que los receptores del glutamato están localizados en una variedad de núcleos hipotalámicos esenciales para la reproducción y la función neuroendocrina. Sin embargo, aunque poco se sabe acerca de los mecanismos responsables de las reacciones del metabolismo intermedio en rumiantes (Howell *et al.*, 2001), con los resultados obtenidos en el presente estudio se plantea que si bien la administración exógena del glutamato no promovió un incremento de proteína total en el suero, si originó un inicio más precoz de la pubertad en cabras.

Dicho escenario fisiológico pareciera involucrar un mecanismo independiente de los niveles séricos de proteína total, posiblemente mediante modificaciones en el metabolismo intermedio, debido a que a nivel hepático el glutamato además de intervenir en la síntesis de proteínas, es considerado como un precursor especialmente importante en el balance energético, al ser una fuente primordial de combustible en la

activación de la gluconeogénesis, así como para mantener la homeostasis de la síntesis de proteína (Heitmann y Bergman, 1980; McDonald *et al.*, 1988; Wu, 1998; Howell *et al.*, 2001; Tapiero *et al.*, 2002).

En el contexto de la utilización de la energía corporal, los requerimientos de proteína para eventos reproductivos tales como crecimiento o la pubertad, son muy importantes y significativos (Meza-Herrera *et al.*, 2004; Scaramuzzi *et al.*, 2006; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2011). Consecuentemente, existe una relación clara entre el balance de energía, la disponibilidad de combustible metabólico y la eficiencia reproductiva. De esta manera, los cambios en los niveles circulantes de metabolitos y de hormonas metabólicas son señales importantes que informan, de manera eficiente al SNC, respecto al estado nutricional del organismo y de su capacidad para reproducirse, generando así la activación del eje hipotalámico-hipofisial-gonadal (Blache *et al.*, 2006; Meza-Herrera, 2008; Scaramuzzi *et al.*, 2006). Al respecto, Annison *et al.* (2002) y Blache *et al.* (2006) mencionan que los sistemas endócrino y nervioso se activan en respuesta al estado metabólico así como a los niveles adecuados de los metabolitos en sangre.

En rumiantes, los regímenes de alimentación en los que la energía es limitante, con exceso de proteína, aumentan la expresión de transportadores de glutamato, promoviendo de esta forma una mayor capacidad para influir positivamente en el estado de energía en todo el animal mediante el aumento de suministro de sustratos gluconeogénicos. En efecto, durante la desaminación oxidativa, el grupo nitrogenado se

desprende como amoníaco y es eliminado principalmente como urea. Las cadenas carbonadas siguen diferentes rutas, que las llevan a alimentar el ciclo del ácido cítrico o de Krebs para oxidarse completamente en él hasta CO_2 y H_2O y producir energía (McDonald *et al.*, 1988; Howell *et al.*, 2001; Varas *et al.*, 2007).

Por lo anterior, cuando existe un exceso de proteína, la producción hepática neta del glutamato decrece, sugiriendo un incremento en la transaminación de glutamato para producir aspartato, contribuyendo a la alta tasa de síntesis de urea hepática. Una explicación alternativa para el decrecimiento de la liberación de glutamato en el hígado, es la propuesta por Maltby *et al.*, (2005), en la cual una disminución en la síntesis de glutamato puede ser el resultado de una baja en la tasa de conversión de NADP a NADPH debido a la activación de amonio por la ruta del pirofosfato, o por un decrecimiento en la transaminación de ornitona a glutamato. La urea convertida por el hígado puede ser reciclada al intestino a través de la sangre y saliva, o excretada en la orina (Rodríguez *et al.*, 2007).

VI. CONCLUSIONES

La administración endovenosa de glutamato en cabras peripúberes promovió no solamente un inicio más temprano de la pubertad, sino un mayor porcentaje de cabras mostrando pubertad. Dicho escenario fisiológico no estuvo relacionado con diferencias en el peso vivo, la condición corporal, o los promedios séricos globales para proteína total o urea. De manera similar, tampoco se observaron diferencias a través del tiempo en el patrón de concentración de proteína total a favor del grupo suplementado con glutamato.

La relación entre inicio de pubertad y la suplementación con glutamato, que muestra un rol significativo como sustrato gluconeogénico, posiblemente influyó positivamente en el estado energético del animal, promoviendo una mejor comunicación entre los componentes del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal, generando así un mejor ambiente neuroendócrino para la activación del desarrollo y la esteroidogénesis folicular, originando la primo-ovulación en las cabras suplementadas con glutamato en una ruta independiente de los niveles séricos de proteína total y urea; dichos resultados destacan una importancia no solo clínica sino productiva.

VII. LITERATURA CITADA

- ACPA, Asociación Cubana de Producción Animal. 2005. Manual del caprinocultor. 392. IV Edición. Ciudad de la Habana.
- Annison E.F., Lindsay D.B., Nolan J.V. 2002. Digestion and metabolism. In: Freer M, Dove H, Sheep nutrition, CAB. 95-118.
- Aréchiga C.F., Aguilera J.I., Rincón R.M., Méndez de Lara S., Bañuelos V.R., Meza-Herrera C.A. 2008. Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la globalización. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Trop Subtrop Agroecosys, 9:1 – 14.
- Arendt J. 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. Rev Reprod, 3: 13-22.
- Arroyo J. 2011. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. Trop Subtrop Agroecosys, 14: 829-845.
- Bach A., Calsamiglia S., Stern M.D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. J Dairy Sci, 88: 1
- Barrell G.K., Thrun L.A., Brown M.E., Viguié C., Karsch F.J. 2000. Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. Biol Reprod, 63: 769-774.
- Bergles D.E., Diamond J.S., Jahr C.E. 1999. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. Curr Opin Neurobiol, 9:293-8.
- Blache D., Zhang S., Martin G.B. 2006. Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. Reprod Nut Develop, 46:379-390.
- Bland J.M., Douglas G.A. Traducido y modificado por Martínez R. B. 1996. Transformando datos. Brit Med J. 312: 770-771. <http://patoral.umayor.cl/anestbas/transf/transf.html>, revisado el día 20/09/2011.
- Böhm S., Grady E., Bunnett N. 1997. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. Biochem J, 322: 1-18.
- Brann D.W., Mahesh Virendra B., 1997. Exitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. Endocrine Rev, 18: 678-700.
- Caldovic L., Morizono H., Yu X., Thompson M., Shi D. 2002. Identification, cloning and expression of the mouse N-acetylglutamate synthase gene. Biochem J, 364: 825–831.
- Castellano J.M., Navarro V.M., Roa J., Pineda R., Sanchez-Garrido M.A., Garcia-Galiano D., Vigo E., Dieguez C., Aguilar E., Pinilla L., Tena-Sempere M. 2009. KiSS-1 system in experimental diabetes: early changes and functional consequences. Endocrinology, 150: 784-794.

- Clarkson J., Chin B.W., Simpson E.R., Herbison A.E. 2009. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology*, 150:3214–3220.
- Claypool L.E., Foster D.L. 1990. Sexual differentiation of the mechanism controlling pulsatile secretion of luteinizing hormone contributes to sexual differences in the timing of puberty in sheep. *Endocrinology*, 126: 1206–1215.
- Conn P.J. 2003. Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann N y Acad Sci*, 1003:12-21.
- Cushwa W.T., Bradford G.H., Stabenfeldt Y.M., Berger M., Rally M.R. 1992. Ram influence on ovarian and sexual activity in anestrus ewes: effects of isolation of ewes from rams before joining and date of ram introduction. *J Anim Sci*, 70:1195-1200.
- Darlis N., Abdullah R.A., Halim S., Jalaludin, Ho Y.W. 2000. Rumen parameters and urea kinetics in goats and sheep. *Asian-Aus. J Anim Sci*, 13:7 922-928.
- Delgadillo J.A. 2005. Inseminación artificial en caprinos. (1^{ra} edición) México: Editorial Trillas. p. 91
- Dunn T.G., Moss G.E. 1992. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *J Anim Sci*, 70:1580-1593.
- Ebling J.F., 2005. The neuroendocrine timing of puberty. *Reprod.*, 129: 675–683.
- Escareño L., Salinas-Gonzalez H., Wurzinger M., Iñiguez L., Sölkner J., Meza-Herrera C. 2012. Dairy goat production systems. Status quo, perspectives and challenges. *Trop Anim Health Prod*. DOI 10.1007/s11250-012-0246-6.
- Estienne M.J., Barb C.R., Kraeling R.R. 2000. Neuroendocrine regulation of reproduction in male domestic animal species: Role of excitatory amino acids. *J Anim Sci*, 77:1-10.
- FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm> (traducción de la versión original en ingles, 2007).
- FAOSTAT. 2011. <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=569&lang=es#ancor> Revisado el día 15/12/12.
- Fernandez-Fernandez R., Martini A.C., Navarro V.M., Castellano J.M., Dieguez C., Aguilar E., Pinilla L., Tena-Sempere M. 2006. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol*, 25: 127-132.
- Foster D.L. 1994. Puberty in the sheep. In: E. Knobil; J. D. Neil (eds.) *The Physiology of Reproduction*. Second edition. Raven Press, New York, 411-451.
- González M.J. 2009. Aminoácidos excitadores, machos caprinos, circunferencia escrotal, fotoperiodos crecientes e insulina en un muestreo intermitente. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Bermejillo, Dgo., México.

- Gonzalez-Bulnes A., Meza-Herrera C.A., Rekik M., Ben Salem H., Kridli R.T. 2010. Limiting factors and strategies for improving reproductive outputs of small ruminants reared in semi-arid environments. In: *Semi-arid environments: Agriculture, water supply and vegetation*.
- Gonzalez-Bulnes A., Meza-Herrera C.A., Rekik M., Ben Salem H., Kridli R.T. 2011. *Semi-Arid Environments Agriculture, Water Supply and Vegetation*. Kara M Degenovine, Editor. Pulished by Nova Science Publishers, Inc. New York, 41-62.
- Goodman R.L. Coolen L.M., Anderson G.M., Hardy S.L., Valent M., Connors J.M., Fitzgerald M.E., Lehman M.N. 2004. Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology*, 145: 2959–2967.
- Hameed S., Jayasena C.N., Dhillon W.S. 2011. Kisspeptin and fertility. *Journal of Endocrinology*, 208: 97–105
- Heibel S.K., Lopez G.Y., Panglao M., Sodha S., Marino-Ramírez L. 2012. Transcriptional regulation of n-acetylglutamate synthase. *PLoS ONE* 7(2): e29527. doi:10.1371/journal.pone.0029527.
- Heitmann R.N., Bergman E.N. 1980. Transport of amino acids in whole blood and plasma of sheep. *Am J Physiol*, 239: 242–247.
- Hernández-Valenzuela L.C., Meza-Herrera C.A., González-Sánchez L., Vicente-Pérez R., González-Bulnes A., Veliz-Deras F.G., Mellado-Bosque M., Wurzinger M. 2009. Suplementación exógena de Betacaroteno, inicio de la pubertad y niveles séricos de insulina en cabras peripuberales. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 8: 215-221.
- Hollmann M., Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17: 31-108.
- Howell J.A., Matthews A.D., Swanson K.C., Harmon D.L., Matthews J.C. 2001. Molecular identification of high-affinity glutamate transporters in sheep and cattle forestomach, intestine, liver, kidney, and pancreas. *J Anim Sci*, 79: 1329–1336.
- Howell J.A., Matthews A.D., Welbourne T.C., Matthews J.C. 2003. Content of ileal EAAC1 and hepatic GLT-1 high-affinity glutamate transporters is increased in growing vs. nongrowing lambs, paralleling increased tissue d- and l-glutamate, plasma glutamine, and alanine concentrations. *J Anim Sci*, 81: 1030-1039.
- Jackson L.M., Timmer K.M., Foster D.L. 2009. Organizational actions of postnatal estradiol in female sheep treated prenatally with testos-terone: programming of prepubertal neuroendocrine function and the onset of puberty. *Endocrinology*, 150: 2317–2324.
- Keisler D.H. 2007. Sheep breeding strategies. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Elsevier, 649–661.
- Koehn L.L., Schlagheck T.G., Webb K.E. 1993. Amino acid flux across the gastrointestinal tract and liver of calves. *J Dairy Sci*, 76: 2275–2285.
- Lecznar-Liguz M., Krasmska-Skangiel J. 2007. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): The three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp*, 67: 207- 218.

- Lerma J. 1997. Receptores Postsinapticos de Neurotransmisores. *Rev. R. Acad Cienc Exact Fis Nat*, 3(4): 271-277.
- Lerma J. 2003. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci*, 4(6):481-495.
- Littell C.R., Freud J.R., Philip C. 1991. *Sas[®] system for linear models*, third edition, Cary, NC, SAS Institute Inc., 329.
- López-Medrano J.I., Meza-Herrera C.A., Gonzalez-Bulnes A., Torres-Moreno M., Mellado-Bosque M., Wurzing M., Trejo-Calzada R. 2009. Effect of exogenous glutamate supply on the onset of puberty in goats. II. Serum levels of triiodothyronine. *Tropic Subtrop Agroecos*, 11(1):197-200.
- Malpaux B., Thiéry J.C., Chemineau P. 1999. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nut Develop*, 39: 355-366.
- Malpaux B., Tricoire H., Mailliet F., Daveau A., Migaud M., Skinner D.C., Pelletier J., Chemineau P., 2002. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reprod Suppl*, 59: 167–217.
- Maltby S.A., Reynolds C.K., Lomax M.A., Beever D.E. 2005. Splanchnic metabolism of nitrogenous compounds and urinary nitrogen excretion in steers fed alfalfa under conditions of increased absorption of ammonia and l-arginine supply across the portal-drained viscera. *J Anim Sci*, 83: 1075-1087.
- Martinez-Lopez I., Garcia C., Barber T., Vina J.R., Miralles V.J. 1998. The L-glutamate transporters GLAST (EAAT1) and GLT- 1 (EAAT2): expression and regulation in rat lactating mammary gland. *Mol Membr Biol*, 15:237–242.
- McDonlad P., Edwards R., Greenhalgh J.F.D. 1988. *Nutrición animal*. 4º Edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España.
- Mellado B.M., Valdés O.F. 1998. *Guía para el manejo productivo en las explotaciones caprinas del norte de México*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Subdirección de Desarrollo.
- Meza-Herrera C.A. 2008. Mecanismos reguladores de la pubertad en la cabra: Actualización de Algunos Conceptos. *Trop Subtrop Agroecos*, 9: 29–38.
- Meza-Herrera C.A. 2012. Puberty, kisspeptin and glutamate: A ceaseless golden braid. In: *Advances in Medicine and Biology*, Ed: Benhardt, L.V. Nova Science Publishers, NY, USA, 52(3): 97-124.
- Meza-Herrera C.A., Gonzalez-Bulnes A., Kridli R.T., Mellado M., Arechiga-Flores C.F., Salinas H., Luginbuhl J.M. 2009. Neuroendocrine, metabolic and genomic cues signalling the onset of puberty in females. *Reprod Dom Anim* doi: 10.1111 0936-6768.
- Meza-Herrera C.A., Ross T., Hallford D., Hawkins D., Gonzalez-Bulnes A. 2007. Effects of body condition and protein supplementation on LH secretion and luteal function in sheep. *Reprod Dom Anim*, 42(5):461-465.

- Meza-Herrera C.A., Sanchez J.M., Chavez-Perches J.G., Salinas H., Mellado M., 2004. Protein supplementation, body condition and ovarian activity in goats. Preovulatory serum profile of insulin. *South African J Anim Sci*, 34(1): 223-226.
- Meza-Herrera C.A., Tena-Sempere M. 2012. Interface between nutrition and reproduction: the very basis of production. In: *Animal Reproduction in Livestock*. [eds. S. Astiz, A. Gonzalez-Bulnes], in *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, under the auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [<http://www.eolss.net>].
- Meza-Herrera C.A., Torres-Moreno M., Lopez-Medrano J.I., Gonzalez-Bulnes A., Veliz F.G., Mellado M., Wurzinger M., Soto-Sanchez M.J., Calderon-Leyva M.G. 2011. Glutamate supply positively affects serum release of triiodothyronine and insulin across time without increases of glucose during the onset of puberty in female goats. *Anim Rep Sci*, 125: 74-80.
- Meza-Herrera C.A., Veliz-Deras F.G., Wurzinger M., Lopez-Ariza B., Arellano-Rodriguez G., Rodriguez-Martinez R. 2010. The kiss-1, kisspeptin, gpr-54 complex: A critical modulator of GnRH neurons during pubertal activation. *J Appl Biomed*, 8: 1-9.
- Michaelis E.K. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol*, 54:369-415.
- Moreno-González G., Zarain-Herzberg A. 2006. Papel de los receptores de glutamato durante la diferenciación neuronal. *Salud Mental*, 29(5): 38-48.
- Moughan P.J. 2003. Simulating the partitioning of dietary amino acids: New directions. *J Anim Sci*, 81: 60-67.
- Nakayama T., Kawakami H., Tanaka K., Nakamura S. 1996. Expression of three glutamate transporter subtype mRNAs in human brain regions and peripheral tissues. *Mol Brain Res*, 36: 189-192.
- Ojeda S.R., Roth C., Mungenast A., Heger S., Mastronardi C., Parent A.S., Lomniczi A., Jung H. 2006. Neuroendocrine mechanisms controlling female puberty: new approaches, new concepts. *Int. J Androl*, 29: 286-290.
- Ottersen O.P., Storm-Mathisen J. 2000. Glutamate. 18: 1-291. ISBN: 978-0-444-50286-5.
- Perveen S., Usmani R. 1993. Peripartum profiles of certain haematological and biochemical parameters in normally calving buffaloes. *J Anim Health Prod*, 12(13): 55-60.
- Polkowska J., Lerrant Y., Wankowska M., Wojcik- Gladysz A., Starzec A., Counis R. 2003. The effect of dietary protein restriction on the secretion of LH and FSH in pre-pubertal female lambs. *Anim Reprod Sci*, 76: 53-56.
- Rabaglino M.B., Magariños M.J., Orias F. 2007. Efectos de los altos niveles de urea en el fluido uterino sobre el tejido endometrial en vacas vacías. *Taurus*, 9(35): 8-15.
- Rawlings N.C., Evans A.C., Hoaramooz A., Bartlewski P.M. 2003. Antral follicle growth and endocrine changes in prepuberal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci*, 78: 259-270.

- Redmond G.S., Macedo G.G., Velez I.C., Caraty A., Williams G.L., Amstalden M., 2011. Kisspeptin activates the hypothalamic–adenohypophyseal–gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reprod*, 14: 541–548.
- Reeds P.J., Burrin D.G., Stoll B., Jahoor F. 2000. Intestinal glutamate metabolism. *J Nutr*, 130: 978–982.
- Remond D., Bernard L., Poncet C. 2000. Amino acid flux in ruminal and gastric veins of sheep: Effects of ruminal and omasal injections of free amino acids and carnosine. *J Anim Sci*, 78:158–166.
- Roa J., García-Galiano D., Castellano J.M., Gaytan F., Pinilla L., Tena-Sempere M. 2010. Metabolic control of puberty onset: New players, new mechanisms. *Mol Cell Endocrin*, 324: 87–94.
- Roa J., Navarro V.M., Tena-Sempere M. 2011. Kisspeptins in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments. *Biol Reprod*, 85: 650–660.
- Rodríguez R., Sosa A., Rodríguez Y. 2007. La Síntesis de Proteína Microbiana en el Rumen y su Importancia para los Rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41(4): 303-311.
- Scaramuzzi R.J., Campbell B.K., Downing J.A., Kendall N.R., Khalid M., Muñoz Gutierrez M., Somchit A. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Fert Develop*, 46: 1-16.
- Schneider F.A., Hallford D.M. 1996. Use of rapid progesterone radioimmunoassay to predict pregnancy and fetal numbers in ewes. *Sheep Goat Res*, 12: 33–38.
- Simonneaux V., Ansel L., Revel F.G., Klosen P., Pévet P., Mikkelsen J.D. 2009. Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. *Peptides*, 30(1): 146–153.
- Smith J.T. 2012. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. *Dom Anim Endocri*, 43(2): 75–84
- Smith J.T., Clarke I.J. 2010. Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. *Mol Cell Endocri*, 324: 102–109.
- Snedecor G.W., Cochran W.G. 1969. *Statistical Methods*. 6th ed. The Iowa State Univ. Press, Ames.
- Suttie J.M., Kostyo J.L., Ebling F.J., Wood R.I., Bucholtz D.C., Skottner A., Adel T.E., Towns R.J., Foster D.L. 1998. Metabolic interfases between growth and reproduction. IV. Chronic pulsatile administration of growth hormone and the timing of puberty in sheep. *Endocrinology*, 129: 2024-2032.
- Tapiero H., Mathé G., Couvreur P., Tew K. 2002. II. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother*, 56: 446–457.
- Tena-Sempere M. 2006. KISS-1 and reproduction: Focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinol*, 83: 275-281.

- Tena-Sempere M. 2010. Kisspeptin signaling in the brain: Recent developments and future challenges. *Mol Cell Endocri*, 314: 164–169.
- Valasi I., Chadio S., Fthenakis G.C., Amiridis G.S. 2012. Management of pre-pubertal small ruminants: Physiological basis and clinical approach. *Anim Reprod Sci*, doi:10.1016.
- Valasi I., Menegatos I., Papanikolaou T., Goulas P., Amiridis G.S., 2006. Oocyte pick-up in juvenile lambs affects neither onset of puberty nor their future fertility. *Theriogenology*, 66: 2144–2151.
- Varas M., Ricarte R.A., Chagra. 2007. Concentraciones de metabolitos sanguíneos en cabras criollas con sistemas extensivos de producción en el SO de La Rioja, Argentina. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Cusco, Perú.
- Viguié C., Thibault J., Thiéry J.C., Tillet Y., Malpaux B. 1997. Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship to the changes in luteinizing hormone and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Endocrinology*, 138: 499-506.
- Watford M. 1994. Glutamine metabolism in rat small intestine: synthesis of three-carbon products in isolated enterocytes. *Biochim Biophys*, 1200: 73–78.
- Welbourne T., Matthews J. C. 1999. Glutamate transport and renal function. *Am J Physiol*, 277: 501-505.
- Wu G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr*, 128: 1249–1252.