

11663
1
20

INTERACCION DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES ENDOGENOS CON LA
PROGESTERONA Y EL ESTRADIOL, DURANTE EL ANESTRO POSPARTO
EN LA VACA CEBU.

Tesis presentada ante la Division de
Estudios de Posgrado de la
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtencion del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Área: REPRODUCCION ANIMAL

por

JESUS ALEJANDRO ARREGUIN AREVALO

Marzo de 1993

Asesor: M.V.Z. M.Sc. Ph.D. ALEJANDRO VILLA GODDY

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi esposa Debbie y a mi hija Andrea

Por la cascada de emociones que han despertado en mí, lo que ha dado un nuevo y comprometido sentido a mi vida.

A mis padres:

Juana Arévalo Castellanos y

Raúl Arreguín Díaz

Por su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos:

Norma, Leticia, Laura y Raúl

Como una muestra de afecto.

A mis primos:

Leonardo, Miguel Angel y Beatriz

Como una muestra de fraternidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alejandro Villa Godoy, por su actitud y aptitud para transmitir sus conocimientos y su experiencia, rodeados de su entusiasmo por la investigación y guiados por su sentido crítico. Gracias por contar con su apoyo, su confianza y su amistad.

Al Dr. Moisés Montaña Bermúdez por su valiosa orientación, colaboración y paciencia en la realización de la presente tesis. Gracias por brindarme tu amistad y tu confianza.

Al M.V.Z. M.Sc. Eugenio Villagómez Amézcua Manjarrez por tu amistad y acertada colaboración en la cuantificación de hormonas.

Al Dr. Heriberto Román Ponce por brindarme la oportunidad de realizar los estudios de Maestría.

De igual manera agradezco al I.N.I.F.A.P.-SARH y al CONACYT por otorgarme el apoyo económico durante mis estudios.

INDICE

DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE DE CUADROS.....	iv
INDICE DE GRAFICAS.....	v
RESUMEN.....	vi
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	3
a. Introducción a la revisión de literatura.....	3
b. Efectos de la restricción del amamantamiento y la terapia con hormonas esteroides ovaricas sobre el retorno a la ciclicidad.....	3
c. Perfil endocrino durante el anestro posparto.....	5
d. Efecto de los esteroides exógenos sobre la secreción de la LH durante el anestro posparto.....	8
e. Mecanismo de acción de los esteroides ováricos.....	9
f. Efecto de los péptidos opioides endógenos sobre la liberación de la LH.....	12
g. Distribucion de los opioides endógenos en el cerebro.....	14
h. Posibles mecanismos de acción de los péptidos opioides endógenos.....	15
i. Interaccion de los péptidos opioides endógenos con los esteroides ováricos.....	15
j. Interacción de los péptidos opioides endógenos con el amamantamiento durante el anestro posparto.....	18
k. Sumario de la revision de literatura.....	19
III. HIPOTESIS.....	21
IV. OBJETIVO GENERAL.....	21
V. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	21
VI. MATERIALES Y METODOS.....	22
a. Modelo animal y metodologia general.....	22

b. Tratamientos.....	22
c. Coleccion y análisis de muestras sanguíneas.....	24
d. Variables de respuesta.....	25
e. Diseños y análisis estadísticos.....	25
VII. RESULTADOS Y DISCUSION.....	26
VIII. CONCLUSIONES.....	40
IX. BIBLIOGRAFIA.....	41

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.	Calendario de aplicación de naloxona (N), progesterona (P), estradiol (E) y solución salina (S) a vacas cebú en anestro posparto.....	23
CUADRO 2.	Frecuencia de pulsos de la LH en los periodos previos y posteriores a cada aplicación de naloxona (número de pulsos/2 h) en la vaca cebú en anestro posparto.....	27
CUADRO 3.	Efecto de una o varias (1ª, 2ª y 3ª) aplicaciones de naloxona (400 mg/inyección) sobre la concentración basal de la LH sérica (ng/ml), en la vaca cebú en anestro posparto.....	28
CUADRO 4.	Efecto de una o varias (1ª, 2ª y 3ª) aplicaciones de naloxona (400 mg/inyección) sobre la concentración media de la LH sérica (ng/ml), en la vaca cebú en anestro posparto.....	29
CUADRO 5.	Efecto de una o varias (1ª, 2ª y 3ª) aplicaciones de naloxona precedidas de progesterona, estradiol y su combinación, sobre la concentración basal de la LH sérica (ng/ml), en la vaca cebú en anestro posparto.....	31
CUADRO 6.	Efecto de una o varias (1ª, 2ª y 3ª) aplicaciones de naloxona precedidas de progesterona, estradiol y su combinación, sobre la concentración media de la LH sérica (ng/ml), en la vaca cebú en anestro posparto.....	32
CUADRO 7.	Interacción de la progesterona (P) ry el estradiol (E) sobre la concentración basal y media de la LH sérica (ng/ml), en la vaca cebú en anestro posparto.....	34
CUADRO 8.	Efecto de la aplicación de PEN y PES sobre la concentración basal y media de la LH sérica (ng/ml), en la vaca cebú en anestro posparto.....	37
CUADRO 9.	Efecto de los tratamientos sobre el inicio de la actividad lútea (IAL) y el primer cuerpo lúteo (ICL) en la vaca cebú en anestro posparto.....	39

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA 1. Modelo hipotético de la interacción de los esteroides ovaricos y los péptidos opioides endógenos (POE) en la vaca en anestro posparto.....	13
GRAFICA 2. Interacción de la progesterona (P) y el estradiol (E) sobre la concentración basal de la LH sérica, en la vaca cebú en anestro posparto.....	35
GRAFICA 3. Interacción de la progesterona (P) y el estradiol (E) sobre la concentración media de la LH sérica, en la vaca cebú en anestro posparto.....	36

ARREGUIN AREVALO J. ALEJANDRO. Interacción de los péptidos opioides endógenos con la progesterona y el estradiol, durante el anestro posparto en la vaca cebú. (Bajo la dirección de ALEJANDRO VILLA-GODOY).

En este escrito la forma de citar se apega al formato de la revista *Endocrinology* (1990) 127:373.

RESUMEN

El estudio fue realizado en el Campo Experimental "Playa Vicente", Ver. cuyo clima es tropical Am (1). El objetivo fue determinar el efecto de aplicaciones repetidas de naloxona (N), precedidas o no de hormonas esteroides exógenas sobre la liberación de la hormona luteinizante (LH), así como su efecto sobre el retorno a la actividad ovárica y la presencia del primer cuerpo lúteo después del parto, en vacas cebu durante el anestro posparto y sujeta al control del amamantamiento. Los tratamientos (n= 4 o 5) fueron: SN, aplicación de solución salina (S) del día 25 al 30 y N (400 mg/inyección de naloxona hidrociorhidrica por vía intravenosa; 3 inyecciones en total) fue aplicada a intervalos de 12 h iniciando el día 30 posparto a las 22:00 h; SPN, una inyección de S el día 25 y una inyección de progesterona (P) del día 26 al 30, seguidas de N como en el tratamiento anterior; SEN, una inyección de S del día 25 al 29 y estradiol (E) el día 30, seguidas de N como en los anteriores; PEN, una aplicación de P del día 25 al 29, más E el día 30, seguidas de N como se ha descrito; PES, como en el tratamiento PEN, pero S sustituye a N y SS, como en el tratamiento SN, pero S sustituye a N. La P (25 mg/inyección) y el E (cipionato de estradiol, 2 mg/inyección) fueron administrados por vía intramuscular a las 10:00 h. Para determinar el efecto de una aplicación y aplicaciones repetidas de N sobre la liberación de la LH, al igual que el efecto de una y varias aplicaciones de N, precedidas de la administración de P, E y su combinación sobre la liberación de la LH, se usó un diseño de parcelas divididas para cada aplicación de N o S. Para determinar el efecto de la aplicación de P, E y su combinación sobre la liberación de la LH se usó el mismo diseño pero con un arreglo factorial. El efecto de aplicaciones repetidas de N; precedidas o no de P, E y P más E, sobre la duración de los intervalos del tratamiento al inicio de la actividad lútea y al primer cuerpo lúteo posparto fue analizado en un diseño completamente al azar. Los datos fueron analizados en una serie de análisis de variancia y las diferencias entre las medias de los tratamientos se compararon por contrastes no ortogonales. Solamente la primera aplicación de N, cuando no fue precedida por la administración de hormonas esteroides ováricas, indujo un incremento en la concentración basal (0.37 ± 0.02 ng/ml, antes de N vs. 0.45 ± 0.02 ng/ml, después de N; $P < 0.08$) y en la concentración media (0.49 ± 0.02 ng/ml, antes de N vs. 0.59 ± 0.02 , después de N; $P < 0.02$) de la LH. Ninguna de las aplicaciones de N, precedida de la administración de la P, el E y su combinación afectó la concentración basal ni la concentración media de la LH ($P > 0.10$). Sin embargo, al determinar el efecto de la P, el E y su combinación

sobre la liberación de la LH se observó una interacción ($P < 0.08$) en los efectos de los factores de estudio (P y E) sobre la concentración basal y la concentración media de la LH, durante los periodos relacionados con la primera (periodo 1) y la segunda (periodo 2) aplicación de N (cada periodo se refiere al muestreo iniciado 2 h antes y finalizado 2 h después de N). La interacción indicó que la aplicación de la P más el E indujo un aumento en la concentración basal y media de la LH en los periodos 1 y 2; en tanto que la aplicación de la P o el E, indujeron una disminución en la concentración basal durante el periodo 1 (Periodo 1: 0.39, 0.27, 0.29 y 0.65 \pm 0.03 ng/ml; Periodo 2: 0.39, 0.29, 0.31, 0.88 \pm 0.02 ng/ml para SN, SPN, SEN y PEN, respectivamente) y en la concentración media durante el periodo 2 (Periodo 1: 0.53, 0.39, 0.46 y 1.01 \pm 0.04 ng/ml; Periodo 2: 0.56, 0.40, 0.48 y 1.13 \pm 0.02 ng/ml para SN, SPN, SEN y PEN, respectivamente) de la LH. Al analizar el efecto de los tratamientos sobre el retorno a la ciclicidad se encontró que los tratamientos SN, SPN, PEN y PES ($P < 0.01$) disminuyeron el intervalo del tratamiento al inicio de la actividad lútea (10.0, 18.3, 10.8 y 19.8 \pm 5.5 días para SN, PN, EN y PEN, respectivamente vs. 44.2 \pm 5.5 días para SS). Solamente los tratamientos SPN y PEN disminuyeron ($P < 0.08$) el intervalo del tratamiento a la formación del primer cuerpo lúteo posparto (22 y 15.3 \pm 8.8 días para SPN y PEN, respectivamente vs. 44.2 \pm 8.8 días para SS). Se concluye que en la vaca en anestro posparto sujeta al control del amamantamiento, sólo la primera aplicación de N aumento la concentración serica de la LH. Este estímulo temporal produjo un incremento transitorio en la actividad lútea, sin afectar el intervalo a la formación del primer cuerpo lúteo posparto. No se encontraron evidencias de una inhibición opioide sobre la liberación de la LH inducida por la administración de hormonas esteroides ováricas. La aplicación de la P más el E produjo un efecto estimulante sobre la liberación de la LH. La presencia de la combinación P y N estimuló la actividad lútea y disminuyó el intervalo a la presencia del primer cuerpo lúteo posparto.

I. INTRODUCCION

El anestro posparto es una de las principales causas que limitan la productividad en el ganado productor de carne (2). En E.U.A. se ha estimado que el anestro posparto produce una pérdida potencial del 20 por ciento de la cosecha de becerros (3). En el trópico mexicano el 57 por ciento de los problemas reproductivos del ganado cebu y sus cruza son atribuidos a esta condición (4).

El amamantamiento del becerro es un factor central en la etiología del anestro posparto (5, 6, 7, 8). La longitud del anestro es afectada por la intensidad y la frecuencia de los eventos de amamantamiento (2, 3) y por interacciones entre la vaca y el becerro que son independientes a dicho estímulo (9, 10). Si bien el control de la lactancia tiene efectos positivos sobre el reinicio de la actividad reproductiva (7, 11), esta práctica por sí sola, no permite alcanzar resultados óptimos sobre la reducción del intervalo posparto (IPP: 12, 13, 14).

Los esteroides sexuales juegan un importante papel en el reinicio de la actividad ovarica: por ello, el tratamiento con estas hormonas en vacas productoras de carne ha sido ampliamente practicado (15). Sin embargo, los efectos del tratamiento esteroide sobre la duración del intervalo posparto, sobre la síntesis y la secreción de las gonadotropinas y sobre la inducción de la ovulación, son variables e inconsistentes (8, 16, 17, 18). Existen evidencias sobre el efecto modulador que ejerce el amamantamiento sobre los mecanismos de retroalimentación, producidos por los esteroides ováricos, en el eje hipotálamo-hipofisario (HH; 5, 6, 19). Por ello, la frecuencia del estímulo del amamantamiento puede ser un factor principal que determine la respuesta al tratamiento con P y E exógenos (5, 8, 20, 21).

Con relación a los mecanismos fisiológicos que median la condición del anestro posparto, es una característica común, en varias especies, la baja concentración sérica y la baja frecuencia pulsátil de la LH (2, 22, 23). Para que las vacas reinicien sus ciclos estrales después del parto, es necesario que la frecuencia de pulsos de la LH aumente gradualmente hasta alcanzar un ritmo cercano a un pulso por hora, similar al detectado en las vacas que se encuentran ciclando y que se aproximan a la ovulación (22, 24, 25, 26). A este respecto, se ha documentado ampliamente el efecto supresor que ejerce el amamantamiento sobre la secreción de la LH (6, 8, 26, 27, 28). Los péptidos opioides endógenos (POE) han sido identificados como mediadores del efecto supresor que el amamantamiento ejerce sobre la liberación de la LH (29, 30, 31). La actividad del sistema opioidérgico es afectada por la concentración de esteroides ováricos circulantes (19, 32, 33, 34), lo que indica que los POE están involucrados, por lo menos en parte, en los efectos de retroalimentación negativa producida por los esteroides ováricos sobre la liberación de la LH (33,35).

La aplicación de N, antagonista de los opioides por ocupar sus receptores, produce un incremento de corta duración en la

secrecion de la LH (19, 31, 36, 37). La respuesta a N depende de la intensidad del estímulo del amamantamiento (19, 36, 38) y del medio endógeno esteroidal (19, 35, 39). Sin embargo, se desconoce si el incremento en la liberación de la LH, provocada por una (19, 31, 37) o varias aplicaciones de N, es capaz de inducir el retorno a la ciclicidad. No obstante, la gran cantidad de estudios sobre los cambios hormonales y ovaricos observados durante el anestro posparto, el entendimiento sobre los mecanismos endocrinos involucrados en el reinicio de la actividad ovárica es incompleto.

II. REVISION DE LITERATURA

a. INTRODUCCION A LA REVISION DE LITERATURA.

Debido a los objetivos de este estudio y a la considerable cantidad de informacion sobre el tema, esta revision no incluye los efectos de la nutricion sobre la duracion de la condicion de anestro despues del parto. Para una aproximacion a este tema se sugiere la lectura de una revision pertinente (2). En el primer capitulo de esta revision se presenta informacion de los efectos que ejerce el amamantamiento, asi como los efectos de las diferentes practicas en el control del amamantamiento y los tratamientos con hormonas esteroides ovaricas, sobre el retorno a la ciclicidad en la vaca productora de carne. Con estos antecedentes la revision fue orientada a presentar el panorama endocrino de la vaca amamantadora y no amamantadora durante el estado de anestro posparto y el efecto de la aplicacion de las hormonas esteroides ovaricas sobre la secrecion de las gonadotropinas. Debido a la poca informacion sobre los mecanismos de accion de los esteroides ovaricos en la vaca en anestro posparto, se considero oportuno presentar parte la informacion disponible en otras especies y obtenida en varios modelos de experimentacion. Lo anterior se aplica a las siguientes apartados de la revision, donde se documentó el efecto y los posibles mecanismos de accion de los POE sobre la liberación de la LH y su relacion con los esteroides ovariicos y el amamantamiento.

b. EFECTOS DE LA RESTRICCION DEL AMAMANTAMIENTO Y LA TERAPIA CON HORMONAS ESTEROIDES OVARICAS SOBRE EL RETORNO A LA CICLICIDAD.

En el ganado productor de carne, el amamantamiento es considerado como el principal modulador del anestro posparto. En las vacas que amamantan a sus crias, la primera ovulacion se presento entre 50 y 100 dias despues del parto (40, 41, 42, 43, 44) y el primer estro es manifiesto entre 65 y 104 dias despues del parto (40, 45,). En este tipo de ganado, la remocion permanente del becerro, realizada entre los dias 21 a 35 posparto, disminuyó entre 10 y 54 dias la duracion del intervalo del parto al primer estro (5, 8, 21, 40) y de 27 a 43 dias la duracion del intervalo del parto a la concepcion (21, 40). El destete precoz, realizado entre 30 y 105 dias posparto, incremento de 20 a 40 puntos porcentuales el indice de concepcion (21, 46, 47, 48). Por otra parte, las evidencias indican que el ordeño no esta implicado en la duracion del IPP. En Nueva Zelanda y en Michigan, E.U.A., se ha observado que en vacas de raza Holstein y Jersey el amamantamiento aumenta el intervalo al primer estro posparto y a la primera ovulacion comparado al observado en las vacas que han sido separadas de su becerro o en aquellas que son ordeñadas (8, 22). Además, el incremento en el número de ordeñas al día (4 ordeñas vs. 1 ordeña) no aumenta el IPP (22).

El efecto del control del amamantamiento sobre el IPP ha sido investigado bajo diferentes esquemas de manejo (2). La

restricción del amamantamiento, a un periodo de una hora al día, disminuyó el IPP (7, 11) y aumento los porcentajes de estro (7, 11, 49) y concepción (11, 15). Resultados similares se han observado al restringir el amamantamiento a dos periodos de una hora al día (50, 51). La combinación del amamantamiento controlado (una o dos veces al día) y el destete temporal por 48 o 72 h, disminuyó el IPP y aumento los porcentajes de estro y gestación, en comparación con la fertilidad obtenida en vacas sujetas a amamantamiento *ad libitum* o al manejo tradicional de la vaca y su cría en el ganado de doble proposito (44, 52, 53). En varios trabajos donde se comparo el efecto de varias modalidades en el control del amamantamiento sobre la fertilidad, se observo un aumento en el porcentaje de gestación unicamente cuando se permitio el amamantamiento del becerro una vez al día o cuando esta práctica se combino con el destete temporal (15, 52, 54, 55). No obstante, otros investigadores no observaron aumento en la fertilidad con ninguna de las practicas mencionadas (14, 50, 56, 57, 58).

Las evidencias indican que el efecto supresor, inducido por el amamantamiento sobre el retorno a la ciclicidad, no es mediado por estímulos sobre los somatosensores mamarios (59, 60) ni por una vía neural directa desde la glándula mamaria (2, 61). Por otra parte, independientemente del estímulo del amamantamiento, la presencia física del becerro afecta negativamente el intervalo al primer estro posparto (59); ya que en vacas mastectomizadas, la presencia física del becerro aumento el IPP y disminuyó el índice de concepción (9, 10).

El efecto del tratamiento intramuscular con hormonas esteroides ováricas sobre el reinicio de la ciclicidad es muy variable. El tratamiento convencional de P más E, el cual consiste en la aplicación de 25 mg de P por 5 días más 2 mg de cipionato de E el sexto día, aplicado a vacas con becerro entre los días 30 a 130 posparto, aumento los porcentajes de estro y gestación (62, 63, 64). Resultados similares se observaron al utilizar acetato de melengestrol por vía oral (MGA; 65), norgestomet en forma de implante auricular (SMB; 45) y con dispositivos intravaginales con progestágenos combinados con valerato de estradiol y gonadotropinas (8, 15, 21). En otro estudio, la aplicación de P o E no aumento el porcentaje de gestación y solo su combinación mejoro la fertilidad (64). Los resultados antes citados no son consistentes con los observados en otras investigaciones, donde la fertilidad de la vaca amamantante no fue afectada por el tratamiento con P más E (66, 67) o con otros esquemas donde se usaron esteroides ováricos (64, 67). Por ejemplo, en vacas en anestro posparto, la administración de MGA, sólo o combinado con E, aumento la sincronización de estros pero no afecto el intervalo a la primera ovulación ni el índice de concepción (16, 17, 68). De manera similar, la administración de MGA, combinado con otros progestágenos y valerato de E o con prostaglandina, mejoro la respuesta a la sincronización de estros pero sin aumentar el porcentaje de gestación (69, 70).

Como fue mencionado, la frecuencia del estímulo del amaman-

tamiento puede ser el principal factor que determine la respuesta a la terapia con hormonas esteroides exógenas. La combinación de la restricción del amamantamiento (una vez al día más el destete temporal por 48 h) y el tratamiento convencional de F más E, aumentó el porcentaje de gestación en relación al obtenido con el control del amamantamiento (71). De manera similar, la combinación del destete temporal (por 48 h) y SMB, aumentó el porcentaje de gestación comparado con el tratamiento con SMB (72). La combinación del destete temporal por 48 o 96 h y la aplicación de SME (54, 73) u otros progestágenos (74, 75), disminuyó el intervalo al primer estro posparto y a la gestación, comparado con el intervalo obtenido con estas prácticas por separado. Sin embargo, otros investigadores no observaron un efecto adicional con el destete temporal sobre el IPF cuando se administró SME (76) o FRID más el factor liberador de gonadotropinas (GnRH: 77). En otros estudios, la combinación del amamantamiento controlado (una o dos veces al día) y un implante de F y valerato de E (15, 78), así como la combinación del destete temporal más GnRH, no aumentaron el porcentaje de estro y gestación, comparado con las vacas no tratadas y amamantando *ad libitum* (79).

La inconsistencia en la respuesta al tratamiento con hormonas esteroides y a su combinación con la restricción del amamantamiento, puede ser el resultado de la interacción de varios factores, como son: la duración del tratamiento (80), la dosis administrada (20, 80), la combinación de las hormonas esteroides utilizadas (80), el periodo posparto en el cual son administradas (20, 54), la concentración de hormonas esteroides endógenas (20) que está relacionada con el grado de ciclicidad del hato (45) y sobre todo, de la condición corporal de la vaca (81). Una característica común, en la mayor parte de los trabajos donde la aplicación de hormonas esteroides, solas o combinadas con el manejo del amamantamiento, no mejoró la fertilidad del hato fue la pobre condición corporal de las vacas (48, 64, 67, 71, 78).

c. PERFIL ENDOCRINO DURANTE EL ANESTRO POSPARTO.

En varios estudios se ha determinado que la concentración del GnRH en el hipotálamo, es similar entre uno a 45 días después del parto (82, 83) y no es afectada por el estímulo del amamantamiento (84). Esto sugiere que la capacidad del hipotálamo para sintetizar GnRH no es un factor limitante en el retorno a la ciclicidad durante el anestro posparto (84).

En la vaca (35, 85, 86, 139) y la oveja (87), es característico que durante la gestación se detecte una baja concentración de la LH en el plasma y en la pituitaria. Después del parto, persiste la baja concentración de la LH en la pituitaria (23, 83, 86, 88) y aumenta entre la segunda y tercera semana después del parto (2, 23, 89) hasta alcanzar (entre la tercera y cuarta semana posparto) concentraciones similares a las detectadas en las pituitarias de animales que se encuentran ciclando (2, 23, 82, 83). Esto ha permitido sugerir que durante el posparto temprano, el contenido de la LH en la pituitaria es insuficiente para

inducir la ovulación y mantener la función lútea normal (90). Al parecer, después de este periodo de restablecimiento, el amamantamiento no afecta la concentración de la LH en la pituitaria (2, 26, 84); por lo tanto, la capacidad de la pituitaria para sintetizar LH parece no ser un factor determinante de la condición de anestro.

Durante el periodo previo al restablecimiento de la capacidad sintética de la pituitaria, la concentración plasmática de la LH es menor a 1 ng/ml y se detecta escasa actividad pulsátil (1 pulso/ 8 h; 85, 88, 91, 92). Existe una alta correlación ($r=.89$) entre la frecuencia pulsátil de la LH y su concentración en la pituitaria (23). A su vez, la síntesis (93) y la secreción pulsátil de la LH (94) es el resultado de la actividad del pulso generador del GnRH. En las vacas con becerro, aun después del restablecimiento de la capacidad sintética de la pituitaria, la concentración plasmática de la LH permanece baja y la frecuencia pulsátil es menor a la observada en las vacas sin becerro o en aquellas que se encuentran ciclando (6, 24, 26, 84, 90).

Al aumentar el intervalo posparto, ocurre un incremento en la sensibilidad de la pituitaria a la aplicación de GnRH exógeno (91, 92, 95). Sin embargo, el incremento en la secreción de la LH, inducida por la aplicación de GnRH, es menor en las vacas que amamantan a sus crías que en aquellas que no están amamantando (8, 26, 84). Además, la administración de GnRH, a intervalos de una o dos horas durante dos a cuatro días, iniciando el día 30 posparto, aunque aumenta la liberación de la LH, produce resultados inconsistentes sobre el intervalo a la primera ovulación (96, 97). Por el contrario, en las vacas sin becerro el implante o la administración pulsátil de GnRH aumenta la concentración plasmática de la LH y disminuye el intervalo a la primera ovulación, sin afectar el intervalo al primer estro (98).

Después del parto, en las vacas amamantadoras se observa una disminución en el número y en el tamaño de los folículos ováricos, acompañada de una disminución en el número de folículos saludables y en su concentración de E comparada con la observada en las vacas sin becerro (99). Este retraso de la actividad esteroidogénica es acompañado de una disminución en la concentración de receptores a gonadotropinas en los folículos grandes (80, 100). La administración de GnRH o la práctica del destete, inducen un aumento de la concentración de receptores para la LH en las células de la granulosa y en las células de la teca y producen un aumento en la concentración de E en el fluido folicular de los folículos grandes (26, 100, 101). Sin embargo, aunque las vacas sin becerro presentan actividad ovárica durante la tercera semana después del parto (102) es frecuente que el primer cuerpo lúteo presente una vida media de corta duración y no sea precedido de estro (103). De manera similar, la respuesta a la aplicación de LH, en los cuerpos lúteos inducidos por aplicaciones repetidas de GnRH, procedentes de vacas amamantantes, es menor a la observada en los cuerpos lúteos desarrollados normalmente (104).

Lo anterior ha permitido postular al amamantamiento como la llave inhibitoria que continúa la supresión de la secreción de la LH (27, 28), al disminuir la actividad del generador de pulsos de GnRH (2) y modular la sensibilidad de la pituitaria al estímulo producido por el GnRH (26). Sin embargo, debido a la falta de consistencia sobre el reinicio de la actividad ovárica, observada con la administración pulsátil de GnRH, se ha sugerido que la inhibición del generador de pulsos de GnRH no es el único mecanismo involucrado en el anestro posparto (2). Posiblemente el grado de desarrollo folicular al momento del tratamiento determine la respuesta ovulatoria a la aplicación de GnRH (96).

La concentración plasmática de los esteroides ováricos está involucrada en el reinicio de la actividad cíclica. Durante la gestación, las concentraciones plasmáticas de la P y del E alcanzan concentraciones máximas, 3.5 ng/ml y 215 pg/ml, respectivamente (35). Después del parto, la concentración plasmática de la P es menor a 1 ng/ml (84, 105, 106) y en las vacas sin becerro aumenta de 0.5 a 1.6 ng/ml entre los días 20 a 30 después del parto (91). En tanto que la concentración plasmática del E es de 4 pg/ml (91, 92, 98, 107) y en las vacas sin becerro se eleva ($r=.64$) durante las tres primeras semanas después del parto (92). En las vacas que amamantan al becerro, la concentración plasmática de la P es menor a la detectada en las vacas sin becerro (84, 105, 106) y la concentración del E es consistentemente más alta en las vacas que están próximas a iniciar su ciclicidad, comparada con la concentración de aquellas que permanecen acíclicas por un largo periodo de tiempo (107, 108). Además, se ha asociado la magnitud en la liberación de la LH, inducida por GnRH exógeno, con una mayor concentración de E endógeno (91, 92).

Después del parto, una mayor proporción de vacas en amamantamiento comparada con vacas sin becerro presenta un incremento (> 1 ng/ml) en la concentración plasmática de la P durante uno a cuatro días, previos al reinicio de la ciclicidad (24, 105, 106, 109). La magnitud del pico de P fue mayor en las vacas con becerro que en las vacas sin becerro (3.9 vs. 1.5 ng/ml) y estuvo positivamente asociada con la duración del intervalo posparto (106). Con menos frecuencia se ha observado un aumento en la concentración plasmática del E antes del incremento transitorio de la P (107). El incremento en la concentración plasmática de la P ha sido atribuido a una estructura lútea con capacidad esteroideogénica insuficiente, producto de un folículo con desarrollo inadecuado, debido a una deficiencia en la concentración plasmática de la LH y/o a una disminución en el número de receptores para la LH en el ovario (24). Durante el posparto de las ovejas, se encontró una correlación positiva entre la concentración de la LH en la pituitaria y la concentración plasmática de la P (83).

Con relación a la hormona estimulante de los folículos (FSH), las evidencias indican que la concentración de esta gonadotropina no es un factor limitante en el retorno de la ciclicidad (88). La concentración de la FSH en la pituitaria es similar en diferentes periodos del posparto y es similar entre los animales que se encuentran ciclando y en aquellos que permanecen en anes-

tro (88). Independientemente de la presencia del estímulo del amamantamiento, la concentración de la FSH en el plasma se recupera cinco días después del parto y no sufre cambios posteriores (84, 109). Sin embargo, cuando la aplicación de E, en vacas en anestro posparto, induce un incremento paralelo en la secreción de la LH y la FSH se observa una mayor proporción de vacas en estro (110). Además, en las vacas en amamantamiento se ha observado una mayor asincronía entre los pulsos de la LH y de la FSH que en las vacas sin becerro (103).

d. EFECTO DE LOS ESTEROIDES EXÓGENOS SOBRE LA SECRECIÓN DE LA LH DURANTE EL ANESTRO POSPARTO.

Uno de los modelos propuestos y de mayor aceptación que intenta explicar el control hormonal durante el anestro posparto, sugiere que el estímulo del amamantamiento incrementa la sensibilidad de los centros tónicos hipotalámicos al efecto de retroalimentación negativa inducida por la baja concentración de estrógenos circulantes; lo que produce una disminución en la liberación pulsátil de GnRH y en consecuencia disminuye la secreción de la LH. El insuficiente estímulo gonadotrópico a los folículos ováricos, resulta en una baja producción de estrógenos plasmáticos que no alcanza la concentración umbral necesaria para estimular el centro preovulatorio de la LH en el hipotálamo (5). Al eliminar el estímulo del amamantamiento, disminuye la sensibilidad del hipotálamo al efecto de la retroalimentación negativa inducida por la baja concentración de estrógenos circulantes. Lo que resulta en un aumento en la liberación pulsátil del GnRH y en consecuencia aumenta la frecuencia pulsátil de la LH. El incremento del estímulo gonadotrópico en los folículos ováricos resulta en un aumento de la concentración de estrógenos circulantes, que alcanzan la concentración umbral necesaria para estimular el centro preovulatorio de la LH en el hipotálamo (5).

Entre las evidencias que apoyan el modelo mencionado se encuentra las siguientes: a) en las vacas amamantadoras y con ovarios, la concentración plasmática de la LH es menor a la detectada en las vacas no amamantadoras con ovarios y en las vacas amamantadoras ovariectomizadas (OVX); mientras que en las vacas sin becerro OVX se presenta la mayor concentración de LH plasmática (19, 86); b) una vez que se restablece la capacidad sintética de la pituitaria y a medida que progresa el IPP (6, 8) aumenta la sensibilidad del eje HH al estímulo de retroalimentación positiva producido por el E (3, 6, 25, 110, 111). Sin embargo, el umbral necesario para que se produzca el estímulo óptimo del E sobre el eje HH, sólo se alcanza después de establecerse un patrón pulsátil de LH cercano a un pulso por hora (3, 25, 110); c) en las vacas sin becerro, la aplicación de E indujo un incremento paralelo en la secreción de la LH y la FSH cuando fue aplicado después de 20 días posparto (110). De manera similar, el implante con E en las vacas sin becerro OVX, produjo un aumento en la frecuencia pulsátil de la LH (5), mientras que el implante con E en las vacas con becerro, con o sin ovarios, disminuyó la frecuencia de pulsos de la LH (5, 103); d) una mayor proporción

de vacas sin becerro presentaron una oleada preovulatoria de LH en respuesta a la aplicación de E, comparada a la observada en vacas amamantadoras (6), en las que fue necesaria una dosis mayor de E para inducir una oleada de LH similar a la preovulatoria (20, 112). Sin embargo, el incremento en la secreción de la LH no afectó el IPP (112). Algunos autores consideran que el retraso en el estímulo de retroalimentación positiva producida por el E puede ser el factor dominante que retrasa el reinicio de la ciclicidad, más que su efecto de retroalimentación negativa (8, 113); e) el implante con P en las vacas sin becerro, indujo un incremento en la frecuencia de pulsos de la LH y la FSH y aumento la sincronía entre pulsos de dichas gonadotropinas y tal efecto no se observó en las vacas amamantadoras (105). En un estudio donde la aplicación de la P mas el E indujo actividad ciclica en vacas amamantadoras, se observó una oleada preovulatoria de la LH sin afectar su concentración basal. Sin embargo, la vida media del cuerpo lúteo inducido fue menor a 12 días (42). Estos resultados apoyan el concepto del efecto modulador que ejerce el amamantamiento sobre la sensibilidad del eje HH al estímulo de retroalimentación positiva y negativa producida por los esteroides ováricos.

e. MECANISMOS DE ACCION DE LOS ESTEROIDES OVARICOS.

Los efectos estimulantes e inhibitorios que ejercen los esteroides ováricos sobre la síntesis y la secreción de la LH han sido estudiados en diferentes modelos. La administración de E en hembras OVX (vacas, vaquillas, ovejas y ratas), produce un efecto bifásico sobre la secreción de la LH. Seis horas después de una aplicación de E, se observa una disminución en la concentración plasmática de la LH y en la amplitud de sus pulsos; de 13 a 20 h después de la aplicación de E se produce un rápido incremento en la concentración plasmática de la LH (114, 115, 116), el cual es precedido por un aumento en la concentración de receptores para GnRH en la pituitaria (116). Aunque el E es el responsable del aumento en el número de receptores para GnRH, es necesario el estímulo producido por GnRH para que se induzca la liberación de la LH (117). Lo anterior puede explicarse, por lo menos en parte, el efecto permisivo del E sobre la secreción de la LH inducida por la administración del GnRH (118, 119). Además, la aplicación de E a ratas OVX, induce un incremento en la actividad de la enzima proteincinasa C en las células gonadotropas de la pituitaria. Esta enzima ha sido involucrada en los mecanismos posttranscripcionales (120). En la misma especie, la aplicación de E durante el periodo de retroalimentación positiva (en la mañana del segundo día del diestro) induce un aumento en la síntesis de RNAm específico para el GnRH y aumenta la liberación del GnRH y de la LH en el plasma (121). Por otra parte, en la rata y en primates se observó que la presencia de E aumenta la permanencia de GnRH en el plasma y en cultivos de células de la pituitaria, lo que puede incrementar la secreción de gonadotropinas en condiciones fisiológicas donde el E se encuentre en altas concentraciones (122).

Como fue mencionado, en la pituitaria de las vacas (139) y de las ovejas gestantes (87, 123) la concentración de la LH permanece baja. El mismo fenómeno se observa en las vacas OVX tratadas con P más E, en dosis similares a las detectadas durante la gestación (35) y en las ovejas OVX (124, 125) tratadas con esteroides ováricos durante periodos prolongados (69 días). En las vacas OVX tratadas con P más E (19 días), la concentración plasmática de la LH alcanza su concentración pretratamiento de siete a 14 días después del cese de la terapia con esteroides (35). De manera similar, la aplicación crónica de E (10 a 21 días) en dosis menores a las detectadas durante la gestación, produce una franca inhibición sobre la secreción de la LH (126, 127). Tanto en las vacas gestantes (128) como en las ovejas OVX (125) tratadas con dosis altas de esteroides ováricos (166) o con dosis moderada (127) pero administrada de manera crónica (21 días) se observa una respuesta reducida en la secreción de la LH al estímulo con GnRH exógeno. En la oveja gestante (87, 123) y en la oveja OVX tratada con E y P más E (124, 125) se ha asociado el bajo contenido de la LH con una baja concentración de RNAm para las subunidades alfa y beta de la LH en las células gonadotropas de la pituitaria. Después del parto, la concentración de RNAm y de la LH en la pituitaria comienzan a elevarse paralelamente entre los ocho y los 12 días posparto (87). En otro estudio, la administración crónica del E, además de producir los efectos mencionados, indujo una disminución en la concentración de GnRH en el hipotálamo (128). En el estudio citado, la concentración de RNAm para las subunidades alfa y beta de la LH alcanzaron su concentración pretratamiento hasta ocho días después del cese de la aplicación del E, en tanto que la concentración de la LH en la pituitaria fue restablecida después de 32 días. Al parecer, el efecto inhibidor de la síntesis de la LH se debe al E, ya que la administración de la P sin el E no afectó la concentración de la LH en la pituitaria (129, 130, 131) ni el contenido de RNAm para las subunidades de la LH (129).

Con relación a los efectos de la P sobre la síntesis y la secreción de la LH, se ha observado que la aplicación de P a ovejas OVX, durante 10 a 21 días, en dosis que producen una concentración plasmática de 3.5 a 4.7 ng/ml, induce una disminución en la frecuencia de pulsos y en la concentración plasmática de la LH (127, 129, 130, 131, 132). No obstante, la aplicación de P en las vacas y las ovejas OVX no afectó la concentración de RNAm para las subunidades de la LH, la concentración de la LH en la pituitaria ni el número de receptores para GnRH, así como la concentración del GnRH en el hipotálamo (116, 133). Sin embargo, en estudios *in vitro* la presencia de P a cultivos de pituitarias de ovejas indujo una disminución en la longitud del RNAm por acortar la cadena en la cola Poly (A), lo que sugiere que la P puede estar involucrada en una inhibición post-transcripcional (134). Por otra parte, al utilizar a la oveja OVX con separación quirúrgica del hipotálamo con la pituitaria y mantenida con pulsos de GnRH, la aplicación de P no disminuyó la secreción de LH, lo que sugiere que la P no afecta la secreción de la LH por una acción directa en la pituitaria (114).

En varios estudios se ha documentado la interacción de la F y el E sobre la secreción de la LH. En las ovejas que fueron ovariectomizadas un mes antes del inicio de la administración crónica del E, no se afectó la concentración de la LH en la pituitaria (126). De manera similar, la aplicación de F en animales ovariectomizados dos meses antes del tratamiento no afectó la concentración plasmática de la LH (135). Por el contrario, la aplicación de E en animales ovariectomizados cuatro o cinco días antes de la aplicación de E, produjo los efectos inhibitorios sobre la LH mencionados en párrafos anteriores (134). Sin embargo, independientemente del tiempo transcurrido entre la OVX y el tratamiento con esteroides, la presensibilización con E potencializa el efecto inhibitor de la F sobre la secreción de la LH (126, 132, 136) y el mismo efecto se observa cuando ambos esteroides son administrados simultáneamente (130, 131). Otras evidencias, además de apoyar el concepto de la interacción de las hormonas esteroides ováricas sobre la secreción de la LH, sugieren su participación en el efecto de GnRH sobre la liberación de la LH. En estudios *in vivo* en ovejas y ratas OVX y en estudios *in vitro* en cultivos de células de pituitaria de ovejas y de vacas, la administración de F evitó el incremento en la secreción de la LH inducido por el GnRH (118, 119, 130, 133) y el inducido por el E (115, 116), así como la presensibilización producida por el E sobre la secreción de la LH estimulada por el GnRH (118). Por otra parte, también existe un efecto permisivo de la F sobre la secreción de la LH inducida por el E, ya que en las ovejas OVX con separación quirúrgica del hipotálamo con la pituitaria mantenidas con pulsos de GnRH, la aplicación de E a animales presensibilizados durante cuatro días con F, produjo un aumento en la frecuencia y en la amplitud de los pulsos de la LH de mayor magnitud que el detectado en los animales no presensibilizados con F (114).

La información citada permite sugerir que el estímulo inducido por el patrón pulsátil de GnRH (frecuencia y amplitud) es indispensable para la síntesis del RNAm de las subunidades de las gonadotropinas y por tanto para su síntesis y secreción (137). Con relación a la influencia negativa de los esteroides sobre la LH, es aparente que la F es un potente inhibidor de la síntesis y la secreción de las gonadotropinas, al disminuir la actividad del pulso generador de GnRH (114) y alterar un mecanismo postranscripcional en la pituitaria (134). En tanto que el E deprime la síntesis y la secreción de la LH por un efecto directo sobre la pituitaria al disminuir la síntesis de RNAm para la LH (127, 130, 131) y por un efecto directo en el hipotálamo al disminuir la concentración de RNAm específico para GnRH (138). Por otra parte, los efectos estimulantes del E sobre la secreción de la LH ocurren a varios niveles ya que inducen un aumento en la síntesis de RNAm para GnRH (121), así como un incremento en la concentración de receptores para el GnRH en la pituitaria (116), un aumento en la actividad de la proteína cinasa C en las células de la pituitaria (120) y posiblemente una disminución en el catabolismo del GnRH en la pituitaria (122). Finalmente, el efecto permisivo de la F sobre el aumento de la secreción de la LH inducida por el E puede ocurrir a nivel de la pituitaria por un

mecanismo no conocido (112). En la Gráfica 1 se presentan los posibles sitios de acción de la P y el E y sus efectos estimulantes e inhibitorios sobre la secreción de GnRH y LH durante el anestro posparto y durante el retorno a la ciclicidad.

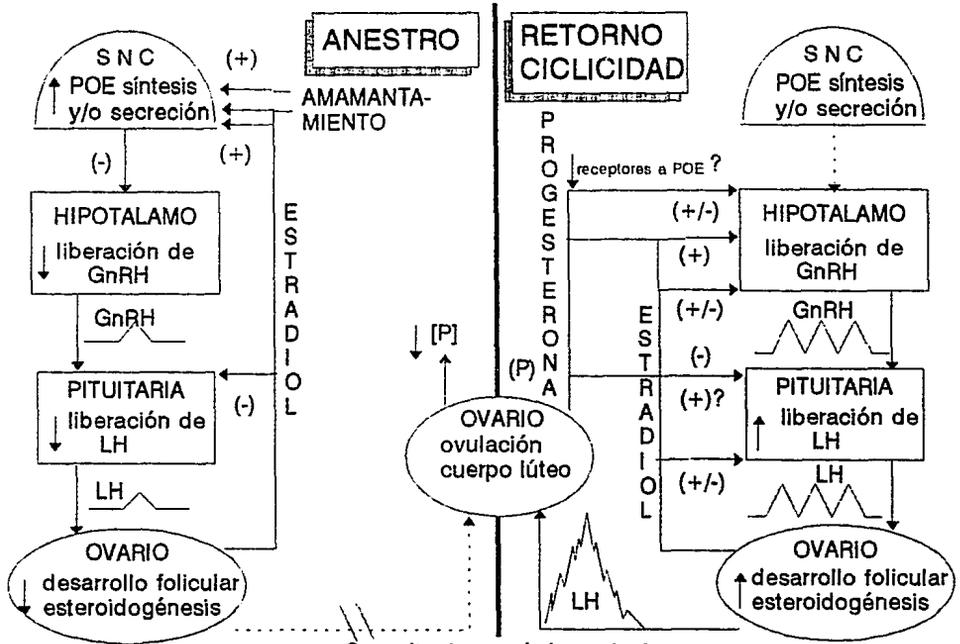
f. EFECTOS DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES ENDOGENOS SOBRE LA SECRECIÓN DE LA LH.

Los POE pertenecen a una de tres familias de genes que producen un precursor común para cada familia de péptidos. Estas familias son nombradas con base en su precursor común como pro-opiomelanocortina, proencefalina y prodinorfina (41) y dan origen a las endorfinas, encefalinas y dinorfinas, respectivamente. Se conocen por lo menos tres subtipos de receptores (μ , δ y κ) cuya clasificación depende de su afinidad relativa a los ligandos endógenos y a la acción producida por varios agonistas y antagonistas de los opioides endógenos (43). Al parecer, los receptores κ tienen mayor afinidad por ligandos de la familia de la prodinorfina y los receptores δ por ligandos de la familia de la proencefalina. En tanto que los receptores μ , conocidos como los receptores que median el efecto supresor sobre la liberación de la LH, inducido por la administración de morfina (140), no presentan mayor afinidad por alguna de las familias de los POE (12). No obstante, los POE pueden interactuar con todos los subtipos de receptores cuando las concentraciones del ligando son altas (43). Se ha demostrado que uno o más opioides endógenos de cada familia pueden inhibir la liberación de la LH (141) y los tres subtipos de receptores pueden mediar la inhibición de la liberación de la LH (142). En las ovejas, la infusión intracerebral de suero anti beta-endorfina y de suero anti meta-encefalina aumentan la secreción de la LH, pero su efecto es de menor magnitud que el producido por la administración de N (143).

Cada una de las familias de los POE son sintetizadas en diferentes sistemas neuronales, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central. En el hipotálamo se localizan opioides endógenos de las tres familias genéticas (141, 144) y en ciertos núcleos hipotalámicos se encuentra una cercana asociación entre las neuronas opioidérgicas y las neuronas secretoras del GnRH (141, 145).

El efecto inhibitorio de los POE sobre la secreción de la LH ha sido registrado en las especies domésticas (33, 38, 146), en roedores (32, 147), en los primates (148) y en el humano (149). La mayor parte de los estudios concuerdan en ubicar al hipotálamo como el principal sitio de acción de los POE (150, 151), los cuales inducen una disminución en la liberación del GnRH (38, 152). La adición de metionina-encefalina a cultivos de células hipotalámicas de rata, disminuye la liberación de GnRH inducida por la dopamina (153) y la aplicación de N [antagonista de POE (154) 10 a 15 veces más afin a receptores μ] restablece su liberación (155). En estudios *in vivo*, la administración de GnRH bloquea el efecto inhibitorio producido por la morfina sobre la secreción de la LH (156), mientras que la infusión de N en

GRAFICA 1. MODELO HIPOTETICO DE LA INTERACCION DE LOS ESTEROIDES OVARICOS Y LOS PEPTIDOS OPIOIDES ENDOGENOS (POE) EN LA VACA EN ANESTRO POSPARTO.



Consultar los capítulos e, i y j.

ovejas, incrementa la liberación del GnRH al sistema porta-hipofisiario, lo que produce un incremento en la secreción de la LH (157). La aplicación de un antagonista de los receptores del GnRH bloquea la liberación de la LH inducida por N (158). Además, en la oveja el efecto supresor de la liberación de LH, producida por la infusión intravenosa de FK 33-824 (un agonista de los POE) es bloqueado por la infusión de N (159).

Por otra parte, algunas investigaciones apoyan la posibilidad de un efecto directo de los POE sobre la hipófisis (144, 150). Por el sistema porta-hipofisiario se liberan grandes cantidades de opioides endógenos al lóbulo anterior de la pituitaria (160) en donde se han localizado beta-endorfina, metionina-encefalina (144, 161) y receptores para opioides (162). En cultivos de células hipofisarias, la aplicación de metionina-encefalina disminuye la liberación de la LH (163); en tanto que la aplicación de N ha producido resultados inconsistentes sobre la secreción de la LH (164). Alternativamente, los POE localizados en la pituitaria pueden ejercer sus efectos a nivel hipotalámico, por la posibilidad del transporte retrogrado de hormonas hipofisarias por la vasculatura del tallo pituitario (165).

g. DISTRIBUCION DE LOS OPIOIDES ENDOGENOS EN EL CEREBRO.

En las ovejas, el aumento en la secreción de la LH, inducido por la infusión intracerebral de gammaglobulinas contra opioides endógenos depende de la región del cerebro donde son aplicados y del tipo de opioide contra el cual se inmuniza. Esto ha permitido proponer la presencia de una mayor concentración de beta endorfina en el área preóptica y en el núcleo accumbens (áreas rostrales del cerebro); en tanto que la metionina-encefalina se encuentra distribuida principalmente en el hipotálamo medio basal y en el área hipotalámica anterior (143). En la misma especie se detectó una mayor concentración de sitios de unión a N marcada con tritio, en el cerebro medial anterior que la detectada en el hipotálamo y en el área preóptica (166).

En el hipotálamo de vacas amamantadoras, se encontró una mayor concentración de GnRH, de beta endorfina y de metionina-encefalina en la eminencia media del hipotálamo en relación a la detectada en el hipotálamo de vacas sin becerro (141). En las vacas en anestro y en aquellas que se encuentran ciclando, el número de sitios de unión a N marcada, es mayor en el cerebro basal anterior que en el área preóptica y en el hipotálamo anterior (38).

En estudios inmunocitoquímicos, realizados en hipotálamos de vacas, se determinó la presencia de GnRH y de beta endorfina en neuronas localizadas en la eminencia media y en el área preóptica (152). En estas áreas, se detectaron receptores para N marcada con tritio. Además, la infusión de N en las áreas mencionadas aumentó la liberación de GnRH (152).

h. POSIBLES MECANISMOS DE ACCION DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES ENDOGENOS.

Los POE son parte de un complejo sistema de neurotransmisores que regulan la secreción de las gonadotropinas durante el anestro posparto (167). El conocimiento acerca de la fisiología de los péptidos opioides es derivado principalmente de las investigaciones mediante la inmunoneutralización de opioides endógenos (143), así como del uso de antagonistas (12) y agonistas (157) de los POE, los cuales actúan mediante su unión con los receptores de los POE. Esto ha permitido relacionar al subtipo de receptores mu, como el principal componente en el control de la secreción de GnRH (168). Aunque la N puede unirse a diferentes subtipos de receptores (169), las evidencias indican que su mayor efecto antagónico es mediado por receptores del subtipo mu (43, 154). La falta de conocimiento sobre la tasa de recambio de los péptidos opioides ha impedido identificar a los ligandos endógenos específicos para los receptores del subtipo mu (12).

La liberación del GnRH, inducida por el potasio, depende de la entrada de calcio a las terminales nerviosas por canales dependientes de voltaje (170). Se ha observado que la adición de POE disminuye la liberación de GnRH inducida por el potasio (171), lo que sugiere que este efecto es producido por una disminución en la permeabilidad al calcio en las terminales nerviosas (172). Otros autores han propuesto que la acción de los POE es mediada por sus receptores, al producir un cambio en la permeabilidad de la membrana para el ion calcio (144, 173). En adición, la aplicación de morfina a monas rhesus ovariectomizadas bloquea la manifestación electrofisiológica del pulso generador de GnRH y su actividad es reestablecida con la administración de N (174). Esto ha permitido sugerir que los POE producen hiperpolarización en la membrana de las neuronas secretoras de GnRH, inhibiendo la propagación de los potenciales de acción a lo largo de la neurona (175).

En estudios inmunohistoquímicos se ha asociado la presencia de los POE con las terminales nerviosas, lo que sugiere que los opioides endógenos pueden ser neurotransmisores que a su vez controlan la liberación de otros transmisores (144).

i. INTERACCION DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES ENDOGENOS Y LOS ESTEROIDES OVARIOS.

En varias especies se han asociado los cambios en la concentración plasmática de los esteroides ováricos con cambios en la concentración de los POE en el hipotálamo y en el sistema porta hipofisiario (32, 39, 123, 176, 177). En las neuronas secretoras de beta-endorfina se han detectado receptores para la P y el E (150), lo que sugiere que los posibles efectos de la P y el E sobre los POE son de carácter fisiológico. En primates OVX y durante la menstruación, la concentración de beta-endorfina alcanza niveles mínimos en la sangre porta hipofisiaria (178), mientras que en los primates durante la fase lútea o en aquellos

OVX pretratados con esteroides ovaricos, se detecta la mayor concentración de beta-endorfina en el sistema porta-hipofisiario y una disminución en la concentración plasmática de la LH (178). La administración de N en los primates y en las mujeres durante la fase lútea y la fase folicular tardía, aumenta la liberación de la LH (148, 149). Sin embargo, en los primates OVX la administración de N no altera la actividad electrofisiológica de las neuronas secretoras de GnRH, lo que sugiere que los POE no juegan un papel significativo en la modulación de la actividad del pulso generador del GnRH en ausencia de hormonas de origen gonadal (174).

En la rata, la administración de esteroides ovaricos evita la elevación post-castración de la LH en el plasma y la administración de la N aumenta parcialmente su secreción (34). De manera similar, en las ratas preimplantadas con F, E y su combinación, se encontró un efecto aditivo sobre la liberación de LH en respuesta a la aplicación de N, en comparación a lo observado en ratas no pretratadas con esteroides (146, 173, 179). En la misma especie, el bloqueo de los efectos inhibitorios de la F sobre la secreción de la LH, mediante el uso de anticuerpos específicos, con pentobarbital o con antagonistas de la F, aumenta la frecuencia de pulsos de la LH en forma similar al incremento observado con la administración de N (180). De manera similar, en las vacas en anestro posparto la respuesta de la LH a la aplicación de N es menor en las vacas OVX que en las vacas intactas (19). Además, la administración de N en las ratas prepuberales, favorece el desarrollo del mecanismo de retroalimentación positiva de las hormonas esteroides ováricas sobre la secreción de la LH y potencializa este mecanismo después de su maduración (181). En estudios *in vitro* (182) e *in vivo* (83) la liberación de GnRH en respuesta a la N es mayor en las ovejas durante la fase lútea que en las ovejas OVX. La infusión de antagonistas de receptores de opioides en ovejas OVX pretratadas con F, sola o combinada con E aumenta la frecuencia de pulsos de la LH (159, 166, 183).

Por otra parte, los POE han sido involucrados en el efecto inductor de los esteroides ovaricos sobre la hipersecreción de la LH (180). Como se mencionó en el capítulo correspondiente, la aplicación de F en ratas OVX presensibilizadas con benzoato de E, induce un incremento de mayor magnitud en la secreción de LH comparado con el inducido por benzoato de E solo (184). En este modelo animal, la F ha sido asociada con una disminución en el número de los sitios de unión a la N marcada con tritio en el hipotálamo, antes del inicio del surgimiento preovulatorio de la LH (185). De manera similar, el pretratamiento con E disminuye el número de sitios de unión a la N marcada y la combinación del E más la F disminuye aun más el número de sitios de unión a la N en diferentes áreas del hipotálamo (186). Al parecer, en la oveja OVX el efecto supresor de la F sobre la secreción de la LH no es mediado por variaciones en la concentración de receptores para opioides, ya que el tratamiento con F más E no afectó la concentración de receptores para la N marcada con tritio, detectada en diferentes regiones del hipotálamo (187).

En las vacas maduras que se encuentran ciclando no hay evidencias sobre un papel de los opioides como mediadores de la supresión de la LH inducida por los esteroides ováricos (188). Sin embargo, en las vaquillas de aproximadamente 10 meses de edad, la aplicación de N o de quadazocina (antagonista de receptores para opioides del subtipo μ , κ y δ) durante la fase folicular, incrementan la amplitud de los pulsos de la LH sin afectar su secreción durante la fase lútea (188, 189). Esto sugiere que a diferencia de los roedores, los primates, los humanos y las ovejas, en las vacas y en las vaquillas que se encuentran ciclando no existe un mecanismo opioide que medie la supresión de la LH inducida por la P. Sin embargo, un mecanismo opioide puede estar involucrado en la modulación de la LH durante la fase folicular en las vaquillas (189).

En las vacas gestantes (nueve días antes del parto) y en las vacas OVX pretratadas con P más E, en concentraciones similares a las observadas durante la gestación, la aplicación de N no aumentó la secreción de la LH y la respuesta de la LH al GnRH exógeno fue mínima; en estas vacas, siete días después de terminado el tratamiento con esteroides, la aplicación de N aumentó la secreción de la LH y un mayor número de ellas respondieron a un estímulo con N cuando ésta fue aplicada 14 días después de terminado el tratamiento con esteroides ováricos (35). De manera similar, en las ovejas en anestro posparto pretratadas con E, la liberación de la LH inducida por la aplicación de N fue mayor a mediada que aumentó el intervalo posparto en el cual fue administrada (190). Lo anterior indica que después del parto, la concentración de esteroides ováricos durante la gestación, ejerce efectos reciduales sobre la liberación de la LH durante el posparto temprano (61). En adición, la falta de efecto de N, posiblemente es debido a una reducción de la sensibilidad de la pituitaria al GnRH, lo que es apoyado por la liberación reducida de la LH en respuesta a GnRH exógeno (35).

Durante el anestro posparto de la oveja, la infusión intracerebral de N produjo un incremento en la secreción de la LH de mayor magnitud que el observado en la oveja ciclando (143). Este incremento fue mayor cuando las ovejas en anestro fueron pretratadas con P (191). Por otra parte, la aplicación de N en vacas ovariectomizadas seis meses antes del inicio del estudio, no indujo un incremento en la liberación de la LH (192). Sin embargo, en vacas amamantadoras ovariectomizadas el día tres después del parto, la aplicación de N en los días 14 y 28 posparto, indujo un aumento en la liberación de la LH y este incremento fue mayor que el observado en vacas amamantadoras con ovarios (19). Lo anterior sugiere: 1) que en ausencia de esteroides ováricos durante un periodo prolongado de tiempo, desaparece el tono inhibitorio opioide sobre la liberación de la LH; 2) que durante el periodo temprano del posparto persisten los efectos reciduales de los esteroides ováricos sobre la liberación de la LH y 3) que durante el posparto temprano en las vacas amamantantes, las hormonas esteroides endógenas inducen una inhibición opioide de tal magnitud que reduce la liberación de la LH producida por la aplicación de N.

j. INTERACCION DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES ENDOGENOS Y EL AMAMANTAMIENTO DURANTE EL ANESTRO POSPARTO.

En la vaca, la oveja y la rata, se ha observado que el amamantamiento produce un incremento en la concentración de beta-endorfina en el hipotálamo y en el sistema porta-hipofisiario (147, 193, 194) y 48 h después de la separación de la vaca y el becerro disminuye la concentración de beta-endorfina en el hipotálamo (194). En diferentes regiones del hipotálamo, el número de sitios de unión para N marcada con tritio, es mayor en vacas y ovejas amamantadoras comparada con el detectado en las vacas ciclando (38, 191, 195) y conforme aumenta el período del posparto (del día 28 al 56) disminuye su concentración (195). Por lo anterior, se ha propuesto que es necesaria una disminución en la concentración de los receptores de opicoides para el retorno de la ciclicidad (30, 191).

En varias especies domésticas, incluida la vaca amamantadora, la aplicación de N aumenta la concentración plasmática de la LH (29, 31, 196, 197). Al eliminar el estímulo del amamantamiento, la aplicación de N es menos efectiva para aumentar la concentración plasmática de la LH (31, 38). Sin embargo, en las vacas donde el destete no aumenta la secreción de la LH, la aplicación de N induce un incremento en la concentración plasmática de dicha hormona (31).

Una inyección de N en dosis de 400 a 800 mg, aplicada entre 14 y 48 días después del parto, produce un incremento (>1 ng/ml) en la concentración media de la LH en el plasma (196, 197). Este incremento se inicia en 15 minutos y regresa a concentraciones basales 60 minutos después de su administración (31, 37, 197). Con dosis de 200 mg de N, la respuesta en la secreción de la LH es inconsistente, ya que en algunos estudios se indujo un incremento en la secreción de la LH al aplicar 200 mg de N en los días 28, 38 y 48 después del parto (31, 197), mientras que en otros esta dosis no afectó la secreción de la LH al ser aplicada el día 14 (37, 195) o el día 28 después del parto (198). No obstante, cuando la administración de N indujo un incremento en la secreción de la LH, la duración y la magnitud de la respuesta no fue afectada por la dosis o por el día de su administración (19, 196, 197).

Como fue mencionado, no todas las vacas amamantantes responden a la aplicación de N con un incremento en la secreción de la LH (37, 196, 198). La falta de respuesta puede ser una consecuencia de un insuficiente almacén de LH en la pituitaria y/o una disminución en la sensibilidad de las células de la pituitaria al estímulo del GnRH (38).

Las evidencias mencionadas señalan al sistema opioidérgico como el mediador del efecto supresor en la secreción de la LH producido por el estímulo del amamantamiento. Sin embargo, en las vacas mastectomizadas con presencia física del becerro la administración de N aumenta la liberación de la LH (9), lo que sugiere que, además del efecto mencionado, los PDE están involu-

crados en la mediación de un efecto supresor en la secreción de la LH, inducido por interacciones entre la vaca y el becerro que son independientes del estímulo de amamantamiento. En la Gráfica 1 se presenta, en un modelo hipotético, la interacción del amamantamiento, las hormonas esteroides ováricas y los POE en el anestro posparto y en el tránsito al estado cíclico.

k. SUMARIO DE LA REVISIÓN DE LITERATURA.

Los POE han sido identificados como mediadores del estímulo inhibitorio producido por el amamantamiento sobre la liberación de la LH. El efecto de una aplicación de N sobre la liberación de la LH ha sido estudiado en diferentes intervalos del periodo de anestro posparto en vacas amamantadoras y en vacas sin becerro y usando diferentes dosis. Los hallazgos más relevantes indican que en vacas que amamantan *ad libitum*, la aplicación de N induce un incremento transitorio en la concentración sérica de la LH; después del destete, cuando se produce un aumento en la liberación de la LH, la aplicación de N es inefectiva para aumentar su concentración sérica. Esto sugiere que destete produce una disminución o ausencia del tono inhibitorio opioide sobre la liberación de la LH. Sin embargo, se desconoce el efecto de aplicaciones repetidas de N sobre la liberación de la LH y su posible efecto sobre el retorno de la actividad ovárica, en particular cuando el estímulo del amamantamiento se encuentra disminuido.

En la vaca en anestro posparto el amamantamiento es considerado como el principal factor que determina la respuesta de la LH a la aplicación de hormonas esteroides ováricas. Entre las evidencias destacan las siguientes: a) el implante con E en vacas amamantadoras produce una disminución en la frecuencia de pulsos de la LH, en tanto que en vacas sin becerro produce un aumento en la liberación de la LH; b) una menor proporción de vacas amamantadoras presentan un incremento en la concentración sérica de la LH, similar a la preovulatoria, en respuesta a la aplicación de E, comparada a la observada en las vacas sin becerro, no obstante este incremento en la liberación de la LH no afectó el IFP; c) el implante con F en vacas amamantadoras no afectó la concentración sérica de la LH, mientras que en vacas sin becerro aumento la frecuencia de pulsos de la LH y d) la aplicación de F más E en vacas amamantadoras, aunque no afectó la concentración basal de la LH produjo un incremento en la concentración sérica de la LH, similar a la preovulatoria, lo que resultó en la formación de un CL de vida media corta.

Los POE están involucrados, por lo menos en parte, en el efecto inhibitorio inducido por las hormonas esteroides endógenas sobre la liberación de la LH. En la vaca en anestro posparto la respuesta de la LH a la aplicación de N es menor en las vacas OVX que en las vacas con ovarios intactos. Son pocos los trabajos donde se ha estudiado la interacción de los POE con las hormonas esteroides ováricas. En las vacas OVX pretratadas con F más E, en concentraciones similares a las detectadas durante la gestación, la aplicación de N no aumentó la concentración sérica de la LH;

en estas vacas, la aplicación de N el día siete o 14 después de terminado el tratamiento con esteroides aumento la concentración sérica de la LH. Sin embargo, no existe información de la posible participación de los PDE en el efecto de la P y el E sobre la liberación de la LH, cuando estos esteroides son aplicados en las dosis usualmente usadas como inductoras de la ciclicidad y en un modelo animal donde el estímulo del amamantamiento (principal modulador de la acción inhibitoria producida por los esteroides ováricos) se encuentra disminuido.

III. HIPOTESIS

Después de cada aplicación de N, se produce un incremento de igual magnitud en la secreción de la LH. Estos estímulos temporales no afectan el reinicio de la actividad ovárica.

La aplicación de E aumenta el efecto de la retroalimentación negativa producida por los estrógenos sobre el eje HH, mediado por lo menos parcialmente, por un incremento en la síntesis y la liberación de los POE. Por lo tanto, en las vacas tratadas con E: 1) disminuye la liberación de la LH y 2) aumenta el efecto de aplicaciones repetidas de la N sobre la liberación de la LH. Como consecuencia del efecto negativo del E sobre la secreción de la LH se retrasa el reinicio de la actividad ovárica.

La aplicación de P disminuye la sensibilidad del eje HH a los efectos de retroalimentación negativa producidos por el E endógeno, posiblemente por disminuir la acción depresora del sistema opioide. Por lo tanto, en las vacas tratadas con P: 1) aumenta la liberación de la LH y 2) disminuye el efecto de aplicaciones repetidas de N sobre la liberación de la LH. Como consecuencia se estimula el reinicio de la actividad ovárica.

La administración de P, por los efectos antes mencionados, favorece que la subsecuente aplicación del E estimule al eje HH, produciendo una mayor liberación de la LH. La suma de estos estímulos esteroidales disminuyen en mayor grado la acción inhibitoria del sistema opioide. Por lo tanto, en las vacas tratadas con la P más el E: 1) aumenta la secreción de la LH y 2) disminuye el efecto de aplicaciones repetidas de N sobre la liberación de la LH. En consecuencia, se estimula el reinicio de la actividad ovárica, en mayor grado que con la aplicación de P sin E.

IV. OBJETIVO GENERAL

Este trabajo fue realizado en vacas cebú durante el anestro posparto, sujetas al control del amamantamiento; con el objetivo de determinar el efecto de aplicaciones repetidas de N, precedidas o no de hormonas esteroides exógenas sobre la liberación de la LH, así como su efecto sobre el reinicio de la actividad ovárica y la formación del primer cuerpo lúteo posparto.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

a) Determinar el efecto de una aplicación y de aplicaciones repetidas de N sobre la liberación de la LH.

b) Determinar el efecto de una y varias aplicaciones de N, precedidas de la administración de P, E y su combinación, sobre la liberación de la LH.

c) Determinar el efecto de la aplicación de P, E y su combinación.

sobre la liberación de la LH.

d) Determinar el efecto de aplicaciones repetidas de N; precedidas o no de P, E y P más E, sobre la duración de los intervalos del tratamiento al inicio de la actividad lútea y del tratamiento a la formación del primer cuerpo lúteo posparto.

VI. MATERIALES Y METODOS

a. MODELO ANIMAL Y METODOLOGIA GENERAL.

Se usaron 25 vacas Cebu, de dos a cinco partos que al momento del parto presentaron una condición corporal buena o excelente. Las vacas tuvieron un parto normal y permanecieron clínicamente sanas durante el experimento. Los partos sucedieron entre el 1^o de enero y el 10 de abril de 1989.

Las vacas fueron manejadas en un régimen de amamantamiento controlado, que consistió en el amamantamiento del becerro durante una hora por la mañana y una hora por la tarde (07:00 y 18:00 h). El resto del tiempo, las vacas y los becerros permanecieron separados. Los animales pastaron en zacate Estrella de Africa (*Cynodon plectostachyus*). Además, las vacas tuvieron acceso a sales minerales y agua a libertad, más 2 kg/animal/día de un suplemento con 70% de total de nutrientes digestibles y 14% de proteína cruda. El suplemento fue suministrado desde un mes antes del parto hasta el fin del experimento (90 días después del parto). Durante este período los animales fueron pesados cada 14 días.

Para la detección de estros, las vacas fueron observadas dos veces al día durante períodos de una hora (06:00 y 17:00 h) desde el día del parto hasta el final del estudio. El criterio de estro fue cuando una vaca aceptó la monta homosexual.

b. TRATAMIENTOS.

La P (25 mg/inyección en un volumen de 0.5 ml) fue administrada durante cinco días, comenzando el día 25 después del parto. El E (cipionato de estradiol, 2 mg/inyección en un volumen de 1 ml) fue administrado el día 30 después del parto. Ambas hormonas fueron aplicadas a las 10:00 h y por la vía intramuscular. La N (400 mg/inyección de naloxona hidroclorehidrica por vía intravenosa en un volumen de 10 ml) fue aplicada en tres veces con un intervalo de 12 h, comenzando el día 30 posparto a las 20:00 h. Esta dosis de N incrementa la frecuencia y la amplitud de pulsos de la LH en vacas en anestro posparto y amamantando al becerro (31, 36, 37). Los tratamientos simulatorios consistieron en solución salina fisiológica (S) y fueron aplicados por la vía y en el volumen correspondiente. Los tratamientos se describen en el Cuadro 1.

CUADRO 1. CALENDARIO DE APLICACION DE NALOXONA (N), PROGESTERONA (P), ESTRADIOL (E) Y SOLUCION SALINA (S) A VACAS CEBU EN ANESTRO POSPARTO.

TRATAMIENTO	TIEMPO POSPARTO (día)								
	25m*	26m	27m	28m	29m	30m	30p	31m	31p
SN*	S	S	S	S	S	S	N	N	N
SPN	S	P	P	P	P	P	N	N	N
SEN	S	S	S	S	S	E	N	N	N
PEN	P	P	P	P	P	E	N	N	N
PES	P	P	P	P	P	E	S	S	S
SS	S	S	S	S	S	S	S	S	S

* m= aplicación a las 10:00 h; p= aplicación a las 22:00 h.

** n= 4 para SN, SPN, SEN y PEN; n= 5 para PES y SS.

c. COLECCION Y ANALISIS DE MUESTRAS SANGUINEAS.

Con la finalidad de confirmar la condicion de anestro, se tomo una muestra de sangre por puncion de la vena coccigea del dia 14 al dia 24 posparto. El criterio de anestro fue el mantenimiento de concentraciones de P inferiores a 1 ng/ml de suero. Tres muestras consecutivas con concentraciones de P superiores a 1 ng/ml causaron la eliminacion de la vaca para los analisis. De la misma manera, se colecto una muestra diaria, del dia 25 al 31 despues del parto, para corroborar el incremento en la concentracion serica de la P en los animales que recibieron P (grupos SFN, PEN y PES) y para comprobar el mantenimiento de concentraciones de P menores a 1 ng/ml, en los grupos donde no fue administrada (grupos SN, SEN y SS).

Con la finalidad de cuantificar LH, se tomaron muestras sanguineas cada 15 minutos durante 2 h antes y 2 h despues de cada aplicacion de N o S.

Para determinar el inicio de la actividad lútea y la formacion del primer cuerpo lúteo posparto, se tomó una muestra sanguínea cada cuatro días, del día 31 al día 90 después del parto. La concentracion basal de la P fue considerada como la concentracion promedio de las muestras colectadas el dia 14 posparto con menos de 1 ng de P/ml de suero.

La P fue cuantificada en suero sanguíneo, por medio del radioinmunoanálisis (RIA), validado en el laboratorio de Reproducción del CENI-Fisiologia INIFAP (199). La concentracion de P en los controles usados en los ensayos de P fue de 2.18 ± 0.38 ng/ml y los coeficientes de variacion (CV) intra e inter análisis (n = 29) fueron; 6.1 y 15.1 %, respectivamente. La sensibilidad minima de los ensayos fue de 0.17 ± 0.17 ng/ml. La LH fue cuantificada por la técnica de RIA en el laboratorio de Hormonas Protéicas del Instituto Nacional de la Nutricion Dr. Salvador Zuvirán, con las siguientes modificaciones de la técnica de D. R. Niswender (200): a) se usó un antisuero contra LH ovina (CSU204), obtenido en la Universidad Estatal de Colorado, en una dilucion final para el ensayo de 1:30000. b) la LH marcada se utilizó diluyendo el eluido de una columna de Sephadex G 50-150 (Sigma Chem.) con PBS-0.1% BSA, de tal manera que en el ensayo se obtuvieran 20,000 cpm en cada una de las alícuotas. c) para la separacion de los complejos LH-anti-LH solubles, se utilizó un antisuero contra gamaglobulinas de conejo, obtenido en ovino a una dilucion final de 1:20. Los CV intra analisis para los controles con concentracion baja (1.03 ± 0.10 ng/ml), media (12.92 ± 0.95 ng/ml) y alta (29.71 ± 3.22 ng/ml) para los ensayos de LH fueron; 5.5, 4.2 y 6.3 %, respectivamente. Los CV inter analisis (n = 4) para los controles de concentracion baja, media y alta para los ensayos de LH fueron; 13.5, 10.4 y 15.3 %, respectivamente.

d. VARIABLES DE RESPUESTA.

- Concentración basal de LH: fue la concentración sérica de LH más baja, detectada en cada vaca, dentro de cada periodo de muestreo. Cuando la concentración más baja estuvo fuera de la sensibilidad mínima del ensayo ésta última fue considerada como la concentración basal.

- Concentración media de LH: fue el promedio de la LH cuantificada en todas las muestras sanguíneas de cada periodo de muestreo.

- Frecuencia de Pulsos de LH: número de puleos/2 h. Un pulso fue definido como un incremento en la concentración sérica de la LH, superior en por lo menos tres desviaciones estándar a la concentración basal, seguido por una o dos concentraciones ascendentes y por lo menos dos concentraciones descendentes.

- Amplitud de pulso de LH: diferencia entre la concentración máxima de la LH en un pulso y la concentración basal (201).

- Intervalo del fin del tratamiento al inicio de la actividad lútea: la actividad lútea fue definida como el incremento en la concentración de P, superior a la concentración basal más tres desviaciones estándar en tres muestras sanguíneas consecutivas, tomadas cada cuatro días (siete días de duración).

- Intervalo del fin del tratamiento al inicio del primer cuerpo lúteo posparto: el cuerpo lúteo fue definido como el incremento en la concentración de P, superior a la concentración basal más tres desviaciones estándar en por lo menos cuatro muestras sanguíneas consecutivas, tomadas cada cuatro días (10 días de duración). En los casos donde en dos o tres muestras previas al fin del experimento se detectó un aumento en la concentración de P, se consideró indicativo de actividad lútea y cuerpo lúteo, respectivamente, si el promedio del incremento detectado fue igual o mayor al promedio de la concentración de P correspondiente a las muestras identificadas como actividad lútea o como cuerpo lúteo.

e. DISEÑOS Y ANALISIS ESTADISTICOS.

Para responder a los objetivos específicos a, b y c, se usó un diseño de parcelas divididas para cada aplicación de N o S. Las parcelas fueron los animales que fueron azarizados a uno de seis tratamientos, mientras que las subparcelas fueron los periodos de muestreo previo (2 h) o posterior (2 h) a la aplicación de N o S. Los datos fueron examinados en una serie de análisis de varianza, usando el procedimiento General Linear Model (202). Las diferencias entre las medias de los tratamientos se compararon por contrastes no ortogonales.

Para el objetivo a, se compararon los tratamientos SN y SS. Para el objetivo b, se contrastaron los tratamientos SPN, SEN, PEN y SS. Para el objetivo c, los diseños tuvieron un arreglo

factorial, donde los factores fueron F y E y se usaron los tratamientos SN, SPN, SEN y PEN; además, en otros diseños de parcelas divididas se compararon los tratamientos PEN y PES.

Con el fin de responder al objetivo d, se usó un diseño completamente al azar en el cual se compararon los seis tratamientos.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

Durante el periodo experimental, se observó una disminución en el peso corporal de las vacas (290 ± 0.071 gr al día), similar entre los tratamientos ($P > 0.79$). La magnitud de las pérdidas de peso no afectó el reinicio de la ciclicidad ya que al comparar mediante análisis de varianza los animales con mayor, contra los de menor pérdida de peso, independientemente de los tratamientos, no se encontró diferencia sobre el reinicio de la actividad ovárica ($P > 0.27$). Lo anterior descarta la posibilidad de efectos confundidos debido a variaciones de la pérdida de peso durante el periodo experimental sobre el retorno de la ciclicidad.

En la mayoría de los trabajos similares al presente, no se comprobó el estado de anestro mediante la cuantificación de la concentración sérica de la P (31, 36, 37, 195), por el contrario, nuestro criterio de anestro fue corroborado en todas las vacas del experimento, por lo que fue posible determinar los efectos de interés en el modelo apropiado. Durante el periodo previo al inicio de los tratamientos, la concentración sérica de la P fue de 0.48 ± 0.14 ng/ml y la concentración basal fue de 0.41 ± 0.25 ng/ml. En las vacas tratadas con P su concentración sérica se elevó a 1.92 ± 0.19 ng/ml en los días de su aplicación y disminuyó a 0.70 ± 0.07 ng/ml dos días después de la última inyección.

Debido al escaso número de pulsos de la LH, observados en la mayor parte de las vacas, independientemente de los tratamientos, no fueron analizadas las variables frecuencia de pulsos y amplitud de pulsos. En el Cuadro 2 se presenta el número de pulsos detectados en los periodos de muestreo previos y posteriores a cada aplicación de N o S.

Con relación al efecto de la N sobre la liberación de la LH (Cuadros 3 y 4); durante el periodo previo a la primera aplicación de N o S, la concentración basal ($P < 0.08$) y la concentración media ($P < 0.02$) de la LH fueron mayores en el grupo SS que en el SN y solamente la primera aplicación de N indujo un incremento en la concentración basal ($P < 0.08$) y en la concentración media ($P < 0.02$) de la LH. Como se menciona en la revisión de literatura; en la vaca amamantando *ad libitum*, una aplicación de N induce un incremento rápido y transitorio en la concentración sérica de la LH (19, 31, 37, 196, 197). En dichos estudios, el rango de la concentración media de la LH antes de la aplicación de la N fue de 0.22 a 1.8 ng/ml y la aplicación de N indujo un incremento de 0.7 a 3.3 ng/ml con una duración de 30 a 60 minutos. En nuestro estudio, al usar a la vaca en anestro posparto

CUADRO 2. FRECUENCIA DE PULSOS DE LA LH EN LOS PERIODOS PREVIOS Y POSTERIORES A CADA APLICACION DE NALOXONA* (número de pulsos/2 h) EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO.

TRATAMIENTO**	*** ANTES DE NALOXONA			DESPUES DE NALOXONA		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
SN	0,00	0,00	0,25	0,25	0,25	0,25
SPN	0,25	0,25	0,75	0,25	0,50	0,00
SEN	1,00	1,25	1,25	1,00	0,75	0,75
PEN	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,25
PES	0,50	0,00	0,75	0,25	0,25	0,25
SS	0,50	0,25	0,50	0,50	0,50	0,00

* Debido al escaso número de pulsos, las medias entre los tratamientos no fueron comparadas.

** n=4 para SN, SPN, SEN y PEN; n=5 para PES y SS.

*** N= naloxona; P= progesterona; E= cipionato de estradiol; S= solución salina fisiológica.

*** El error estándar global fue de 0.02

CUADRO 3. EFECTO DE UNA O VARIAS (1ª, 2ª Y 3ª) APLICACIONES DE NALOXONA (400 mg/aplicación), SOBRE LA CONCENTRACION BASAL DE LA LH SERICA EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO.

TRATAMIENTO ^{**}	1ª ^{****}		2ª		3ª	
	PRE	POS	PRE	POS	PRE	POS
SN ^{***}	0,37 ^a	0,45 ^b	0,40 ^a	0,40 ^a	0,42 ^a	0,46 ^a
SS	0,43 ^b	0,45 ^b	0,42 ^a	0,44 ^a	0,57 ^a	0,58 ^a
error estándar	0,02		0,02		0,02	

* Las inyecciones se aplicaron a intervalos de 12 h, iniciando el día 30 posparto a las 2200 h.

** n = 4 para SN; n = 5 para SS. Un análisis estadístico por aplicación de N o S.

*** N = naloxona; S = solución salina fisiológica.

**** PRE y POS se refiere al promedio durante las 2 h que precedieron y las 2 h que siguieron a cada aplicación de naloxona, respectivamente.

a,b literales distintas diferencia entre medias ($P < 0.08$). Las comparaciones se hicieron dentro de aplicación.

CUADRO 4. EFECTO DE UNA O VARIAS (1^a, 2^a Y 3^a) APLICACIONES DE NALOXONA (400 mg/aplicación), SOBRE LA CONCENTRACION MEDIA DE LA LH SERICA EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO.

TRATAMIENTO ^{**}	1 ^a ^{****}		2 ^a		3 ^a	
	PRE	POS	PRE	POS	PRE	POS
SN ^{***}	0,49 ^a	0,59 ^b	0,56 ^a	0,56 ^a	0,62 ^a	0,65 ^a
SS	0,65 ^c	0,59 ^b	0,58 ^a	0,61 ^a	0,72 ^a	0,71 ^a
error estándar	0,02		0,03		0,03	

* Las inyecciones se aplicaron a intervalos de 12 h, iniciando el día 30 posparto a las 2200 h.

** n = 4 para SN; n = 5 para SS. Un análisis estadístico por aplicación de N o S.

*** N = naloxona; S = solución salina fisiológica.

**** PRE y POS se refiere al promedio durante las 2 h que precedieron y las 2 h que siguieron a cada aplicación de naloxona, respectivamente.

a,b,c literales distintas indican diferencias entre medias (P < 0,02). Las comparaciones fueron hechas dentro de aplicación.

sujeta al control del amamantamiento, la concentración media de la LH, previa a la aplicación de N fue de 0.49 ng/ml y la aplicación de N indujo un incremento de 0.10 ng/ml durante los 120 minutos posteriores a su aplicación. La respuesta de menor magnitud observada en nuestro estudio, puede ser interpretada como una consecuencia de la reducción del estímulo del amamantamiento, lo que disminuye el tono inhibitorio opioide sobre la liberación de la LH. En apoyo a esta interpretación, en otros estudios se observó que al separar al becerro de las vacas se produjo un incremento en la concentración sérica de la LH y la aplicación de N fue inefectiva para aumentar la concentración sérica de la LH (31, 38, 198). De manera similar, en las vacas donde se restringió el amamantamiento a cuatro periodos al día, la aplicación de N no indujo un aumento significativo en la concentración sérica de la LH (198). Es posible que la disminución del tono inhibitorio opioide sea mediado por una reducción en la concentración de receptores para péptidos opioides; ya que durante el tránsito del estado de anestro al estado cíclico se detectó una disminución en la concentración de sitios de unión para la N marcada con tritio en diferentes regiones del cerebro (30).

Debido a que no se encontró información sobre el efecto de aplicaciones repetidas de N sobre la liberación de la LH en vacas en anestro posparto, se usó la información disponible en otras especies para intentar dilucidar este fenómeno. En la rata, se observó que el periodo de ocupación a receptores de opioides por sus antagonistas es crítico para la manifestación de su respuesta (203). En dicha especie, el implante de lenta liberación de N aumentó ligeramente la secreción de la LH el día del implante y fue inefectiva tres y siete días después del inicio del tratamiento (204). Los autores sugieren la posibilidad del desarrollo de un mecanismo de tolerancia a los efectos de la N. Esto fue comprobado en otro estudio, efectuado en la misma especie, donde se observó una marcada reducción en la liberación de la LH en respuesta a una segunda aplicación de N cuando el intervalo entre aplicaciones fue de 2 a 4 h (205). Una respuesta similar entre aplicaciones se detectó cuando el intervalo entre las aplicaciones fue de 6 h o mayor (205). Desconocemos si en nuestro modelo animal, con un intervalo entre aplicaciones de 12 h, el desarrollo de un mecanismo de tolerancia a la N sea la causa de la falta de efecto de aplicaciones repetidas de N sobre la liberación de la LH.

Con relación al efecto de la N, precedida por la administración de la P, el E o su combinación, ninguna de las aplicaciones de N ($P > 0.10$) afectó la concentración basal (Cuadro 5) ni la concentración media (Cuadro 6) de la LH. De estos resultados se sugiere la ausencia de un mecanismo opioide inducido por la administración de hormonas esteroides ováricas. Si consideramos que el estímulo del amamantamiento es un modulador de la acción supresora de los esteroides ováricos sobre la liberación de la LH (5, 6, 42, 113) donde los POE han sido involucrados por lo menos en parte, como mediadores de este efecto (19, 33, 34, 35); es posible que la restricción del amamantamiento, presente en nuestro modelo animal, disminuyera el tono inhibitorio opioide

CUADRO 5. EFECTO DE UNA O VARIAS (1ª, 2ª Y 3ª) APLICACIONES DE NALOXONA, PRECEDIDAS DE PROGESTERONA, ESTRADIOL O SU COMBINACION, SOBRE LA CONCENTRACION BASAL DE LA LH SERICA (ng/ml), EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO.

TRATAMIENTO*	1ª***		2ª		3ª	
	PRE	POS	PRE	POS	PRE	POS
SPN**	0,27	0,29	0,31	0,26	0,33	0,37
SEN	0,29	0,28	0,29	0,33	0,63	0,41
PEN	0,70	0,69	0,90	0,86	1,02	0,98
SS	0,43	0,45	0,42	0,44	0,57	0,58
error estándar	0,04		0,03		0,06	

* n = 4 para SPN, SEN y PEN; n = 5 para SS. Un análisis estadístico para cada aplicación de N o S.

** N= naloxona; P= progesterona; E= cipionato de estradiol y S= solución salina fisiológica.

*** PRE y POS se refiere al promedio durante las 2 h que precedieron y las 2 h que siguieron a cada aplicación de naloxona, respectivamente.

No se detectaron diferencias dentro de aplicaciones ni entre tratamientos (P > 0.10)

CUADRO 6. EFECTO DE UNA O VARIAS (1ª, 2ª Y 3ª) APLICACIONES DE NALOXONA, PRECEDIDAS DE PROGESTERONA, ESTRADIOL O SU COMBINACION, SOBRE LA CONCENTRACION MEDIA DE LA LH SERICA (ng/ml), EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO.

TRATAMIENTO *	1ª***		2ª		3ª	
	PRE	POS	PRE	POS	PRE	POS
SPN**	0,39	0,39	0,41	0,40	0,53	0,50
SEN	0,52	0,41	0,49	0,49	1,17	0,58
PEN	0,96	1,10	1,16	1,10	1,22	1,29
SS	0,65	0,59	0,58	0,61	0,72	0,71
error estándar	0,06		0,04		0,13	

* n= 4 para SPN, SEN y PEN; n= 5 para SS. Un análisis estadístico para cada aplicación de N o S.

** N= naloxona; P= progesterona; E= cipionato de estradiol y S= solución salina fisiológica.

*** PRE y POS se refiere al promedio durante las 2 h que precedieron y las 2 h que siguieron a cada aplicación de naloxona, respectivamente.

No se detectaron diferencias dentro de aplicaciones ni entre tratamientos (P > 0.10)

inducido por los esteroides ovaricos. Esto concuerda con lo discutido en relacion a la menor respuesta en la liberacion de la LH inducida por la aplicacion de N, cuando no fue precedida de la administracion de hormonas esteroides ovaricas. Por otra parte, es posible que la P ejerza un efecto indirecto sobre el tono inhibidor opioide al disminuir el numero de receptores para POE. En un estudio se detecto una menor concentracion de sitios de union a N marcada con tritio en el cerebro de vacas amamantantes que presentaron una mayor concentracion plasmatica de P (vacas ciclando), comparada con la detectada en el cerebro de vacas que presentaron una menor concentracion plasmatica de P (vacas en anestro; 30). Aunque en el estudio citado no se puede discernir si la disminucion en el numero de sitios de union a N es la causa o la consecuencia del incremento en la concentracion de la P, en otra investigacion llevada a cabo en ratas OVX pretratadas con E, la aplicacion de P, antes de la elevacion preovulatoria de la LH, indujo una disminucion en el hipotalamo del numero de sitios de union a N marcada con tritio (185). Si un mecanismo semejante esta presente en la vaca en anestro postparto y en particular en el modelo animal usado en nuestro estudio, puede contribuir a explicar la falta de efecto de la N sobre la liberacion de la LH en los animales pretratados con P. No obstante lo anteriormente discutido, no se descarta la posibilidad de que en el tratamiento EN, la aplicacion de E indujera un aumento en el tono inhibidor opioide de tal magnitud que la dosis usada de N fuera insuficiente para antagonizar los efectos supresores de los POE. Esto es posible dado que en otro estudio, la aplicacion de N indujo una mayor liberacion de la LH en vacas en amamantamiento que fueron OVX de 11 a 25 dias antes de N, comparada con la inducida en vacas con ovarios (19), lo que sugiere que la presencia de esteroides ovaricos aumento el tono inhibidor opioide sobre la liberacion de la LH. Consideramos poco probable que la aplicacion de P produjera un aumento en el tono inhibidor opioide por las razones que se discutiran mas adelante.

Al determinar el efecto de la P, el E y su combinacion sobre la liberacion de la LH, se observo una interaccion ($P < 0.08$) en los efectos de los factores de estudio (P y E) sobre la concentracion basal (Cuadro 7 y Grafica 1) y la concentracion media (Cuadro 7 y Grafica 2) de la LH, durante los periodos de muestreo relacionados con la primera y la segunda aplicacion de N (los periodos incluyeron el promedio de la concentracion de LH obtenida en los muestreos previo y posterior a la 1^a y la 2^a aplicacion de N, respectivamente). La interaccion indico que la aplicacion de la P más el E indujo un aumento en la concentracion basal y media de la LH en los periodos 1 y 2; en tanto que la aplicacion de la P o el E, indujeron una disminucion en la concentracion basal de la LH durante el periodo 1 y una disminucion en la concentracion media de la LH durante el periodo 2. Además, en otro análisis se observó que la concentración basal y media (Cuadro 8) de la LH en los tratamientos PEN y PES fue similar durante los periodos mencionados ($P < 0.10$). Es posible que la administración de la P produjera un cambio en la sensibilidad del eje HH, lo que produjo un efecto estimulante del E sobre la liberación de la LH. En la oveja OVX se observó un efecto per-

CUADRO 7. INTERACCION DE LA PROGESTERONA (P) Y EL ESTRADIOL (E) SOBRE LA CONCENTRACION BASAL Y MEDIA DE LA LH SERICA (ng/ml), EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO.

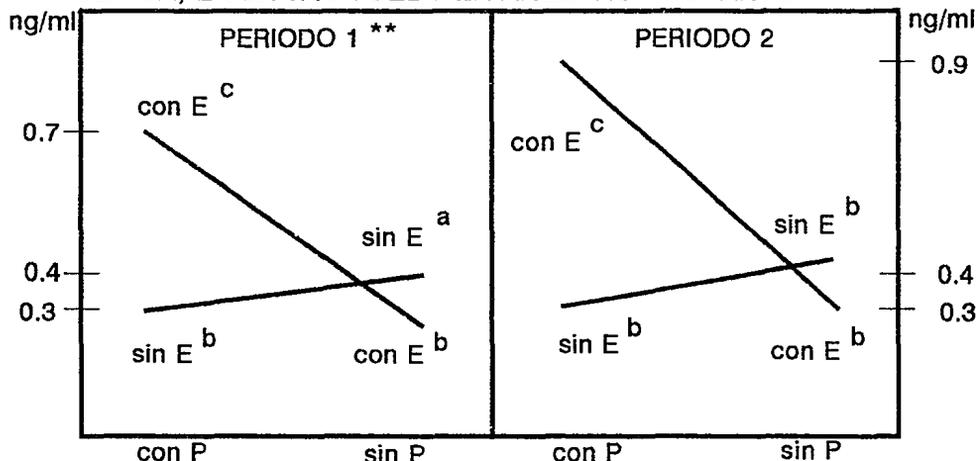
FACTORES P E	TRAT *	CONCENTRACION BASAL PERIODOS **			CONCENTRACION MEDIA PERIODOS		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
- -	SN	0,41 ^a	0,40 ^b	0,44 ^a	0,54 ^b	0,56 ^a	0,63 ^a
+ -	SPN	0,28 ^b	0,29 ^b	0,35 ^a	0,39 ^b	0,40 ^b	0,52 ^a
- +	SEN	0,29 ^b	0,31 ^b	0,55 ^a	0,46 ^b	0,48 ^b	0,88 ^a
+ +	PEN	0,69 ^c	0,88 ^c	1,00 ^a	0,88 ^c	1,13 ^c	1,26 ^a
Error estándar ***		0,03	0,02	0,05	0,06	0,03	0,09
PROBABILIDAD		<0,08	<0,08	>0,10	<0,08	<0,08	>0,10

* n=4. N= naloxona; P= progesterona; E= cipionato de estradiol y S= solución salina fisiológica.

** Los periodos incluyen el promedio de la concentración de LH obtenida en los muestreos previo y posterior a la 1^a, 2^a y 3^a aplicación de naloxona, respectivamente.

*** Un diseño de parcelas divididas con arreglo factorial para cada aplicación de N o S. Efecto de la interacción.

GRAFICA 2. INTERACCION DE LA PROGESTERONA (P) Y EL ESTRADIOL (E) SOBRE LA CONCENTRACION BASAL DE LA LH SERICA, EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO.*

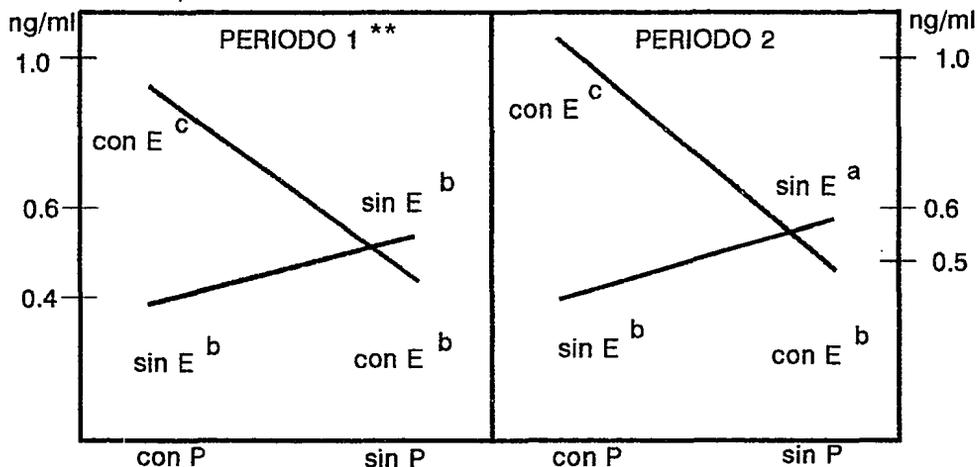


* n=4. Los tratamientos incluidos fueron: SN, SPN, SEN y PEN.

** Los periodos incluyen la media obtenida en los muestreos previo y posterior a la 1ª y la 2ª aplicación de naloxona, respectivamente. Un análisis estadístico para cada periodo.

a,b,c literales distintas indican diferencia entre medias ($P < 0.08$). Error estándar 0.03 y 0.02 para los periodos 1 y 2, respectivamente.

GRAFICA 3. INTERACCION DE LA PROGESTERONA (P) Y EL ESTRADIOL (E) SOBRE LA CONCENTRACION MEDIA DE LA LH SERICA, EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO. *



* n=4. Los tratamientos incluidos fueron: SN, SPN, SEN y PEN.

** Los periodos incluyen la media obtenida en los muestreos previo y posterior a la 1^a y la 2^a aplicación de naloxona, respectivamente. Un análisis estadístico para cada periodo.

a,b,c literales distintas indican diferencia entre medias ($P < 0.08$). Error estándar 0.06 y 0.03, para los periodos 1 y 2, respectivamente.

CUADRO 8. EFECTO DE LA APLICACION DE PEN Y PES SOBRE LA CONCENTRACION BASAL Y MEDIA DE LA LH SERICA (ng/ml), EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO.

TRATAMIENTO *	CONCENTRACION BASAL PERIODOS **			CONCENTRACION MEDIA PERIODOS		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
PES	0,35 ^a	0,35 ^a	0,33 ^a	0,46 ^a	0,52 ^a	0,56 ^a
PEN	0,70 ^a	0,88 ^a	1,00 ^a	0,88 ^a	1,13 ^a	1,26 ^a
Error estándar	0,04	0,02	0,05	0,07	0,03	0,05
PROBABILIDAD***	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10

n=5 para PES; n=4 para PEN.

* N= naloxona; P= progesterona; E= cipionato de estradiol y S= solución salina fisiológica.

** Los periodos incluyen el promedio de la concentración de LH obtenida en los muestreos previos y posterior a la 1^a, 2^a y 3^a aplicación de naloxona, respectivamente.

*** Un diseño de parcelas divididas para cada aplicación de N o S.

misivo de la P sobre la liberación de la LH inducida por el E (114). Además, la disminución de la concentración sérica de la LH producida por el E permite sugerir que en ausencia del efecto permisivo de la P, persiste el efecto de retroalimentación negativa del E sobre la liberación de la LH. Consideramos que la disminución en la concentración sérica de la LH producida por la administración de la P no refleja el efecto final de la misma sobre la liberación de la LH. Es conocido que durante la aplicación de P se observa una disminución en la concentración sérica de la LH, la cual aumenta una vez que disminuye la concentración sérica de la P (131). En nuestro estudio, los muestreos para la cuantificación de la LH se realizaron antes que disminuyera la concentración sérica de la P en los tratamientos donde fue administrada.

Al analizar el efecto de los tratamientos sobre el retorno a la ciclicidad se encontró que SN, SPN, PEN y PES (Cuadro 9) disminuyeron el intervalo del tratamiento al inicio de la actividad lútea ($P < 0.01$) y solamente los tratamientos SPN y PEN (Cuadro 9) lograron disminuir el intervalo del tratamiento al inicio del primer cuerpo lúteo posparto ($P < 0.08$). Los resultados indican que si bien la aplicación de N sin la administración de hormonas esteroides al igual que la aplicación de P más E sin la inyección de N lograron disminuir la duración del intervalo del tratamiento al inicio de la actividad lútea, fue necesaria la combinación de P y N para que el estímulo fuera de tal magnitud que lograra disminuir el intervalo del tratamiento a la formación del primer cuerpo lúteo posparto.

En varios trabajos se ha relacionado un incremento en la concentración plasmática de la P con el tránsito del estado de anestro al estado cíclico en las vacas con becerro (3, 105, 106). Como fue mencionado, durante los periodos de muestreo no se observaron evidencias que indicaran la participación de un mecanismo opioide en los animales tratados con hormonas esteroides ováricas. Desconocemos el mecanismo por el cual, la aplicación de N en los tratamientos que recibieron P y P más E disminuyera el intervalo al inicio del primer cuerpo lúteo posparto. Por lo anterior es incierta la participación de la N en la disminución de la duración de dicho intervalo. Sin embargo, si consideramos que en el tratamiento SN la liberación de la LH fue menor a la observada en otras investigaciones y aceptamos la posibilidad de una disminución en el número de sitios de unión a FDE inducida por la administración de P; es factible que la respuesta a N en los animales pretratados con P, fuera de tal magnitud que el análisis de la LH no detectara dicho incremento y que aun así fuera suficiente para disminuir el periodo acíclico de la vaca después del parto.

CUADRO 9. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL INICIO DE LA ACTIVIDAD LUTEA (IAL) Y EL PRIMER CUERPO LÚTEO (ICL) EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO (días)*.

TRATAMIENTO **	IAL	ICL
SN	10,0 ^b	35,5 ^a
SPN	18,3 ^b	22,0 ^b
SEN	53,5 ^a	53,5 ^a
PEN	10,8 ^b	15,3 ^b
PES	19,8 ^b	32,5 ^a
SS	44,2 ^a	44,2 ^a
error estándar	5,5	8,8

* IAL= días del tratamiento al incremento de la P sérica (>1 ng/ml) en dos muestras consecutivas; ICL= días del tratamiento al incremento de la P sérica (>1 ng/ml) en por lo menos tres muestras consecutivas.

** n= 4 para SN, PN, EN, PEN y PES; n= 5 para SS, ver Cuadro 1.

a,b literales distintas indican diferencia entre medias. Para IAL (P < 0.01); para ICL (P < 0.08).

VIII. CONCLUSIONES

Sólo la primera aplicación de N produjo un pequeño aumento en la concentración sérica de la LH. Lo que indica que en la vaca en anestro posparto sujeta al control del amamantamiento existe una disminución del tono inhibitorio opiode sobre la liberación de la LH.

La aplicación de N en las vacas pretratadas con hormonas esteroides ováricas no indujo un aumento en la concentración sérica de la LH por lo que, en el modelo animal usado, no se encontraron evidencias de una acción opiode inhibitoria sobre la liberación de la LH inducida por esteroides ováricos.

La aplicación de P más N o de E más N disminuyeron la concentración sérica de la LH, pero al combinarlos, se observó un aumento en su concentración basal y media, por lo que otra conclusión es que la aplicación de P seguida de E, estimula la liberación tónica de la LH en vacas en anestro posparto sujetas al control del amamantamiento.

La aplicación de N indujo un incremento transitorio en la concentración sérica de la F, pero no afectó el intervalo a la formación del cuerpo lúteo. Consecuentemente, se concluye que el aumento temporal de la LH, inducido por la N, incrementó la actividad lútea sin acelerar la formación del primer cuerpo lúteo posparto.

Finalmente, la presencia de la combinación de P y N estimuló la actividad lútea y disminuyó el intervalo a la formación del primer cuerpo lúteo posparto, por mecanismos no aclarados en este estudio ni previstos en la literatura disponible.

BIBLIOGRAFIA

1. Tamayo JL. (1962). Geografía general de México, 2ª. edición. Instituto Mexicano de Investigaciones Económicas. 2:148.
2. Short RE, Bellows RA, Staigmiller RB, Berardinelli JG and Custer EE. (1990). Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J Anim Sci* 68:799.
3. Williams GL. (1990). Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: A review. *J Anim Sci* 68:831.
4. Avila MB, Barrera RA, Delgado ZE, Figueroa FI y Martínez CL. (1984). Situación reproductiva del ganado bovino de doble propósito en la región de Tierra Caliente, Guerrero y Michoacán. *X Cong Nal Buiatría*. p 272.
5. Acosta B, Tarnavsky GK, Plat TE, Hamernik DL, Brown JL, Schoenemann HM and Reeves JJ. (1983). Nursig enhances the negative effect of estrogen on LH release in the cow. *J Anim Sci* 57:1530.
6. Radfort HM, Nancarrow CD and Mattner FE. (1978). Ovarian function in suckling and non suckling beef cows post partum. *J Reprod Fertil* 54:49.
7. Randel RD. (1981). Effect of once-daily suckling on postpartum interval and cow-calf performance of first-calf Brahman X Herford heifers. *J Anim Sci* 53:755.
8. Smith JF, Payne E, Tervit HR, Mc Cowan LT, Fairclough R, Kilgour R. (1981). The effect of suckling upon the endocrine changes associated with anestrus in identical twin dairy cows. *J Reprod Fert (Suppl 1)* 30:241.
9. Viker SD and Kiracofe GH. (1989). The effect of naloxone in mastectomized cows with calf-induced postpartum anestrus. *J Anim Sci (Suppl 1)* 68:458.
10. Viker SD, McGuire WJ, Wright JM, Beeman KB and Kiracofe GH. (1989). Cow-calf association delays postpartum ovulation in mastectomized cows. *Theriogenology* 32:467.
11. Bluntzer JS, Forrest DW, Harms FG, Beverly JR and Long CR. (1989). Effect of suckling manipulation on postpartum reproduction in primiparous brahman-cross cows. *Theriogenology* 32:893.
12. Beattie CW and Corbin A. (1975). The differential effects of diestrus progesterone administration on proestrus gonadotropin levels. *Endocrinology* 97:885.
13. Koppel E, Hernández JJ y Roman FH. (1981). Efecto de tres sistemas de amantamiento sobre el comportamiento reproducti-

vo de vacas Suizo Pardo y el desarrollo de sus cías. Mem XV Reunión Anual, INIP p 77.

14. Lozano DRR, Montaño BM y González PE. (1978). Efecto de dos prácticas de manejo de lactación sobre la eficiencia reproductiva de vacas cebú en clima tropical. *Téc Fecu Mex* 25: 212.
15. De los Santos S, Taboada JJ, Martínez E y Ruiz R. (1976). Efecto de la lactancia controlada, de implantes del progestágeno SC21009, del valerato de estradiol y progesterona en la inducción y sincronización del estro en ganado bovino productor de carne. Mem XIII Reunión Anual, INIP. p 68.
16. Britt JH, Huertasvega E and Ulberg LC. (1972). Managing reproduction in dairy cattle: I. Progestogens for control of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci* 55:598.
17. Britt JH, Morrow DA, Kittok RJ and Seguin BE (1974). Uterine involution, ovarian activity, and fertility after melengestrol acetate and estradiol in early postpartum cows. *J Dairy Sci* 57:89.
18. Foote W.D. Endocrine changes in the bovine during the postpartum period. (1971). IX Biennial Symposium on Anim Reprod. *J Anim Sci (Suppl 1)* 32:73.
19. Rund LA, Leshin LS, Thompson FN, Rampacek GB and Kiser TE. (1989). Influence of the ovary and suckling on luteinizing hormone response to naloxone in postpartum beef cows. *J Anim Sci* 67:1527.
20. Forrest PK, Rhodes III RC and Randel RD. (1980). Effect of variable suckling intensity and estrogen administration upon serum luteinizing hormone in Brahman cows. *Theriogenology* 13:333.
21. Smith LE Jr and Vincent CK. (1972). Effects of early weaning and exogenous hormone treatment on bovine postpartum reproduction. *J Anim Sci* 35:1228.
22. Carruthers TD and Hafs HD. (1980). Suckling and four-times daily milking: influence on ovulation, estrus and serum luteinizing hormone, glucocorticoids and prolactin in postpartum Holsteins. *J Anim Sci* 50:919.
23. Nett TM, Cermak D, Braden T, Manns J and Niswender G. (1988). Pituitary receptors for GnRH and estradiol, and pituitary content of gonadotropins in beef cows. II. Changes during the postpartum period. *Dom Anim Endocrinol* 5:81.
24. Lamming GE, Walters DC and Peters AR. (1981). Endocrine patterns of the postpartum cow. *J Reprod Fert (Suppl 30)*: 155.

25. Schallenberg E. (1985). Gonadotrophins and ovarian steroid and cattle. III. Pulsatile changes of gonadotrophin concentrations in the jugular vein post partum. *Acta Endocrinol (Copenh)* 109:37.
26. Walters DL, Short RE, Convey EM, Staigmiller RB, Dunn TG and Kaltentbach CC. (1982). Pituitary and ovarian function in postpartum beef cows. II. Endocrine changes prior to ovulation in suckled and nonsuckled postpartum cows compared to cycling cows. *Biol Reprod* 26:647.
27. Edwards S. (1985). The effects of calf removal on pulsatile LH secretion in the postpartum beef cow. *Theriogenology* 23:777.
28. Randel RD, Short RE, Bellow RA. (1976). Suckling effect on LH and progesterone in beef cows. *J Anim Sci* 42:267.
29. Mattioli M, Conte F, Galeati N, Seren E. (1986). Effect of naloxone on plasma concentrations of prolactin and LH in lactating cows. *J Reprod Fert* 76:167.
30. Trout WE and Malven PV. (1988). Quantification of naloxone binding sites in brain from suckled beef cows during the postpartum anestrus and resumption of estrous cycles. *J Anim Sci* 66:954.
31. Whisnant CS, Kiser TE, Thompson FN and Barb CR. (1986). Influence of calf removal on the serum luteinizing hormone response to naloxone in the postpartum beef cow. *J Anim Sci* 63:561.
32. Bhanot R and Wilkinson M. (1985). The inhibitory effect of opiates on gonadotrophin secretion is dependent upon gonadal steroids. *J Endocr* 102:133.
33. Nanda AS, Ward WR and Dobson H. (1990). Naloxone antagonizes the morphine suppression of the oestradiol-induced surge of luteinizing hormone in dairy cows. *Anim Rep Sci* 22:289.
34. Van Vugt DA, Sylvester FW, Ailsworth CA and Meites J. (1982). Counteraction of gonadal steroid inhibition of luteinizing hormone release by naloxone. *Neuroendocrinology* 34:274.
35. Run LA, Thompson FN, Eyerley DJ and Kiser TE. (1990). Failure of naloxone to stimulate luteinizing hormone secretion during pregnancy and steroid treatment of ovariectomized beef cows. *Biol Rep* 42:619.
36. Whisnant CD, Kiser TE, Thompson FN and Barb CR. (1986). Naloxone infusion increases pulsatile luteinizing hormone release in postpartum beef cows. *Dom Anim Endocrinol* 3:49.
37. Whisnant CS, Thompson FN, Kiser TE and Barb CR. (1986). Effect of naloxone on serum luteinizing hormone cortisol and

- prolactin concentrations in anestrous beef cows. J Anim Sci 62:1340.
38. Malven PV. (1986). Inhibition of pituitary LH release resulting from endogenous opioid peptides. Dom Anim Endocrinol 3:135.
 39. Gabriel SM, Simpkins JW and Kalra SP. (1983). Modulation of endogenous opioid influence on luteinizing hormone secretion by progesterone and estrogen. Endocrinology 113:1806.
 40. Casida LE. (1971). The postpartum interval and its relation to fertility in the cow, sow and ewe. J Anim Sci 32 (Suppl 1):66.
 41. Oxenreider SL and Wagner WC. (1971). Effect of lactation and energy intake on postpartum ovarian activity in the cow. J Anim Sci 33:1026.
 42. Williams GL and Ray DE. (1980). Hormonal and reproductive profiles of early postpartum beef heifers after prolactin suppression of steroid-induced luteal function. J Anim Sci 50:906.
 43. King GJ and MacLeod GK. (1982). Postpartum ovarian activity in suckled purebred and crossbred beef cows. J Anim Sci 55 (Suppl 1):363.
 44. Rodríguez AM, Villareal LP y De Los Santos VS. (1987). Efecto de la lactancia controlada mas destete temporal sobre la presentación del primer estro y los porcentajes de fertilidad en vacas con diferentes intervalos posparto. Mem Reunión de Investigación Pecuaria en México. INIFAP p 351.
 45. Wiltbank JN. (1970). Research needs in beef cattle reproduction. J Anim Sci 31:755.
 46. Rodríguez ROL, Zambrano GR y González PA. (1983). Efecto de la suplementación predeste a la vaca o al becerro y destete precoz en la fertilidad de un hato mantenido en pastoreo. Téc Pecu Méx 45:36.
 47. Salcedo ME, González PE, Rodríguez ROL y Ramos CF. (1977). Efecto del destete precoz en el comportamiento reproductivo de vacas empadradas en agostadero. Téc Pecu Méx 32:36.
 48. De Los Santos VSC, González PE y Ruiz DR. (1979). Efecto del destete precoz y de implantes del progestágeno SC21009 en la inducción del estro en vacas cruzadas de cebú en malas condiciones físicas. Tec Pecu Méx 36:21.
 49. Pérez J y González E. (1976). Efecto de la lactación controlada sobre la eficiencia reproductiva del ganado cebu. Mem Reunión Anual INIP p 70.

50. Castro LM, De La Torre SF, Basurto KV, Zarazua RI, Valencia ZM y González PE. (1984). Efecto de tres tipos de amantamiento sobre la eficiencia reproductiva en bovinos de carne. Mem Reunión de Investigación Pecuaria en México p 317.
51. Castañeda VH, Rodríguez GF y Flores LF. (1984). Efecto de dos modalidades de lactación controlada sobre la fertilidad en vacas cebu. Mem Reunión de Investigación Pecuaria en México p 319.
52. Segura CV y Rodríguez RDL. (1986). Control de la lactancia sobre la fertilidad de ganado cebu, utilizando inseminación artificial y monta natural. Mem Reunión de Investigación Pecuaria en México p 121.
53. Piña CBA, Román FH y Hernández LJJ. (1986). Efecto de la lactancia restringida mas destete temporal sobre el comportamiento productivo y reproductivo de vacas de doble propósito en el tropico húmedo. Téc Pecu Mex 50:64.
54. Kiser TE, Dunlap SE, Benyshek LL and Mares SE. (1980). The effect of calf removal on estrous response and pregnancy of beef cows after syncro-mate- β treatment. Theriogenology 13: 381.
55. Rivera MJA, Román FH, González PE, Vasquez PC y Castillo RM. (1987). Efecto de la lactancia controlada y el destete temporal a distintos intervalos sobre la fertilidad del ganado indobrasil en en trópico. Mem Reunión de Investigación Pecuaria en México p 350.
56. Rodríguez RDL, González PE, Montaldo H y Zapién SA. (1981). Efecto del manejo de la lactancia en la fertilidad de vacas Brangus bajo dos intensidades de pastoreo en zonas áridas: XV Mem Reunión de Investigación Pecuaria en México p 58.
57. Rivera MJA, Hernandez JJJ y Ruiz DR. (1981). Efecto de la lactancia controlada y el destete temporal a distintos intervalos sobre la fertilidad del ganado cebu en el tropico. Mem XV Reunión de Investigación Pecuaria en México p 9.
58. Rodríguez RDL, González PE y Vásquez PCG. (1985). Utilización del destete temporal y lactación controlada en ganado Brangus mantenido en dos intensidades de pastoreo. Téc Pecu Méx 48:78.
59. Williams GL, Kozirowski M, Osborn RG, Kirsch JD and Slinger. (1987). The postweaning rise of tonic luteinizing hormone secretion in anoestrous cows is not prevented by chronic milking or the physical presence of the calf. Biol Reprod 36: 1079.
60. Williams GL, Kirsch JD, Post GR, Tilton JE and Slinger WD. (1984). Evidence against chronic teat stimulation as an autonomous effector of diminished gonadotropin release in

beef cows. *J Anim Sci* 59:1060.

61. Williams GL, McVey Jr WR, Cutshaw JL, Spoon RA, Hunter JF, and Shively MJ. (1990). Neural disconnection of the bovine udder does not prevent suckling-induced anestrus in pluriparous females. *Society for the Study of Reproduction. Supplement number 1 / Biology of Reproduction / Vol 42. July 15-18, 1990. 23 rd Annual Meeting The University of Tennessee, Knoxville rd 129.*
62. Lozano DR, Román FH, Castillo RH, González PE y Ruiz DR. (1981). Tratamiento del anestro postparto en vacas en ordeña en el trópico. *Mem XV Reunión de Investigación Pecuaria en México p 70.*
63. Saiddudin S, Quevedo MM and Foote WD. (1986). Response of cows to exogenous progesterone and estradiol at various stages postpartum. *J Anim Sci* 27:1015.
64. De Los Santos VSG y Gonzalez PE. (1976). Combinación de cipionato de estradiol, progesterona e implantes del progestágeno SC21009 para la resolución de anestro en ganado bovino productor de carne. *Téc Pecu Méx* 31:55.
65. Patterson DJ, Kiracofe GH, Stevenson JS and Corah LR. (1989). Control of the bovine estrous cycle with melengestrol acetate (MGA): a review. *J Anim Sci* 67:1895.
66. Paredes R, De Los Santos VSG, Taboada J y Ruiz R. (1976). Utilización de una combinación de progesterona y cipionato de estradiol (ECP) para resolución de anestro en vacas y vaquillas productoras de carne. *Mem XIII Reunión de Investigación Pecuaria en México p 65.*
67. Zapién A, Gastelum PE, Bourguetts LR y Urbiola VG. (1984). Efecto de dispositivos intravaginales liberadores de progesterona y cipionato de estradiol en la resolución de anestro postparto en ganado de carne. *Reunión de Investigación Pecuaria en México p 315.*
68. García LG, Zarco QL, Ducoing WA y Ortiz GO. (1987). Inducción y sincronización del estro en bovinos utilizando acetato de melengestrol combinado con estrogénos o prostaglandinas bajo condiciones tropicales. *Reunión de Investigación Pecuaria en México p 363.*
69. Ruiz DR, Zambrano GR y González PE. (1982). Resolución del anestro en vacas lactantes especializadas en la producción de carne mediante dosis bajas de acetato de melengestrol, progesterona y valerato de estradiol. *Téc Pecu Méx* 43:15.
70. Rodríguez RA, Casillas TO, Valencia ZM y González PE. (1977). Empleo de acetato de melengestrol, valerato de estradiol y progesterona para el control del estro en bovinos Suizo Pardo X Cebú. *Téc Pecu Méx* 32:41.

71. De Los Santos VSG y Jiménez SH. (1984). Utilización de compuestos hormonales y manejo de la lactancia en la inducción del estro en vacas con cría al pie en anestro. Reunion de Investigación Pecuaria en México p 318.
72. Mcvey Jr WR and Williams GL. (1988). Conception and gonadotropin secretion in beef females following SYNCRO-MATE-B treatment, temporary calf removal and osmotic pump delivery of LHRH. J Anim Sci 66 (Suppl 1):62.
73. Dowling, DW, Pexton JE and Fagerlin PT. (1977). Methods of bovine estrus control: Calf separation and 7-vs-9-day treatment. J Anim Sci (Suppl 1) 45:151.
74. Smith MF, Burrell WC, Shipp LD, Sprtt LR, Songster WN and Wiltbank JN. (1979). Hormone treatments and use of calf removal in postpartum beef cows. J Anim Sci 48:1285.
75. Smith JF and Tervit HR. (1980). The successful development of a PRID regimen for oestrus synchronisation in NZ beef cattle. Proc NZ Soc Anim Prod 40:272.
76. Gastelum PLE y Briceño OJ. (1985). Efecto de implantes hormonales con y sin destete temporal en la sincronización del estro. Mem Reunion de Investigación Pecuaria en México. p 185.
77. Smith VG, Chenault JR, Mc Allister JF and Lauderdale JW. (1987). Response of postpartum beef cows to exogenous progestogens and gonadotropin releasing hormone. J Anim Sci 64:540.
78. Villareal LP y De Los Santos VS. (1982). Uso de hormonas y manejo de lactancia en la solución de anestro. Reunión de Investigación Pecuaria en México p 172.
79. De La Torre F, Basurto KV y García FM. (1984). Respuesta a GnRH y destete temporal sobre la aparición del primer estro y fertilidad en ganado bovino. Reunion de Investigación Pecuaria en México p 312.
80. Spicer LJ and Echternkamp SE. (1986). Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: A Review. J Anim Sci 62:428.
81. Odde KG. (1990). A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. J Anim Sci 68:817.
82. Cernak DL, Braden T, Manns J, Nisweder GD and Nett TM. (1983). Components of hypothalamic GnRH, pituitary FSH and LH and pituitary receptors for GnRH and estradiol in postpartum suckled beef cows. J Anim Sci (Suppl 1) 57:322.
83. Moss GE, Adams TE, Niswender GD and Nett TM. (1980). Effects of parturition and suckling on concentrations of pituitary

- gonadotropins, hypothalamic GnRH and pituitary responsiveness to GnRH in ewes. *J Anim Sci* 50:496.
84. Carruthers TD, Convey EM, Kesner JS, Hafs HD and Cheng KW. (1980). The hypothalamo-pituitary gonadotrophic axis of suckled and nonsuckled dairy cows postpartum. *J Anim Sci* 51:949.
 85. Edgerton LA and Hafs HD. (1973). Serum luteinizing hormone, prolactin, glucocorticoid, and progesterin in dairy cows from calving to gestation. *J Dairy Sci* 56:451.
 86. Zalesky DD, Forrest DW, McArthur NH, Wilson JM, Morris D.L. and Harms PG. (1970). Suckling inhibits release of luteinizing hormone-releasing hormone from the bovine median eminence following ovariectomy. *J Anim Sci* 68:444.
 87. Crowder ME and Nett TM. (1986). Production of LH and mRNA subunit during the early postpartum period in ewes. *J Anim Sci (Suppl 1)* 63:339.
 88. Moss GE, Parfet JR, Marvin CR, Allrick RD and Dickman MA. (1985). Pituitary concentrations of gonadotropins and receptors for GnRH in suckled beef cows at various intervals after calving. *J Anim Sci* 60:285.
 89. Labhsetwar AP, Collins WE, Tyler WJ and Casida LE. (1964). Some pituitary-ovarian relationship in the periparturient cow. *J Reprod Fert* 8:85.
 90. Arije GE, Wiltbak JN and Hopwood ML. (1974). Hormone levels in pre and post-parturient beef cows. *J Anim Sci* 39:338.
 91. Fernández LC, Thatcher WW, Wilcox CJ and Call EP. (1978). LH release in response to GnRH during the postpartum period of dairy cows. *J Anim Sci* 46:443.
 92. Kesler DJ, Garverick HA, Youngquist RS, Elmore RG and Bierschwall CJ. (1977). Effect of days postpartum and endogenous reproductive hormones on GnRH-induced LH release in dairy cows. *J Anim Sci* 46:797.
 93. Hamernik DL, Crowder ME, Nilson JH and Nett TM. (1986). Measurement of mRNA for luteinizing hormone beta-subunit, alpha-subunit, growth hormone and prolactin following hypothalamic-pituitary disconnection in the ewes. *Endocrinology* 119:2704.
 94. Clarke IJ, Cummins JT, Crowder ME and Nett TM. (1989). Long-term negative feedback effects of estrogen and progesterone on the pituitary gland of the long-term ovariectomized ewe. *J Endocrinology* 120:207.
 95. Leung K, Padmanabhan V, Spicer LJ, Tucker HA, Short RE and Convey EM. (1986). Relationship between pituitary GnRH-

- binding sites and pituitary release of gonadotrophins in postpartum beef cows. *J Reprod Fert* 76:53.
96. Edwards S, Roche JF and Niswender ED. (1983). Response of suckling beef cows to multiple, low-dose injections of GnRH with or without progesterone pretreatment. *J Reprod Fert* 69:65.
 97. Riley GM, Peters AR and Lamming GE. (1981). Induction of pulsatile LH release, FSH release and ovulation in postpartum acyclic beef cows by repeated small doses of GnRH. *J Reprod Fert* 63:557.
 98. Britt JH, Kittok RJ and Harrison DS. (1974). Ovulation, estrus and endocrine response after GnRH in early postpartum cows. *J Anim Sci* 39:915.
 99. Bellin ME, Hinshelwood MM, Hauser ER and Ax RL. (1984). Influence of suckling and side of corpus luteum of pregnancy on folliculogenesis in postpartum cows. *Biol Rep* 31:849.
 100. Walters DL, Kaltenbach CC, Dunn TG and Short RE. (1981). Pituitary and ovarian function in postpartum beef cows. I. Effects of suckling on serum and follicular fluid hormones and follicular gonadotrophin receptors. *Biol Reprod* 26:640.
 101. Spicer LJ, Convey EM, Tucker AH and Echternkamp SE. (1984). Effects of LHRH on gonadotropin secretion, steroid concentration in follicular fluid and gonadotropin binding in large antral follicles of anestrous beef cattle. *J Anim Sci* (Suppl 1) 59:365.
 102. Webb R, Lamming GE, Haynes NB and Foxcroft GR. (1980). Plasma progesterone and gonadotrophin concentration and ovarian activity on postpartum dairy cows. *J Reprod Fert* 59:133.
 103. Walters DL, Short RE, Convey E M, Staigmiller RB, Dunn TG and Kaltenbach CC. (1982). Pituitary and ovarian function in postpartum beef cows. III. Induction of estrus, ovulation and luteal function with intermittent small-dose injections of GnRH. *Biol Rep* 26:655.
 104. Kesler DJ, Weston PG, Fimental CA, Troxel TR, Vincent DL and Hixon JE. (1981). Diminution of the in vitro response to luteinizing hormone by corpora lutea induced by gonadotropin releasing hormone treatment of postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci* 53:749.
 105. Williams GL, Talavera F, Petersen BJ, Kirsch JD and Tilton JE. (1983). Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: Effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. *Biol Rep* 29:362.

106. Verne Lavoie, Hank DK, Foster DB and Moody EL. (1981). Suckling effect on estrus and blood plasma progesterone in postpartum beef cows. *J Anim Sci* 52:802.
107. Stevenson JS, Spire MF and Britt JH. (1983). Influence of the ovary on estradiol-induced luteinizing hormone release in postpartum milked and suckled Holstein cows. *J Anim Sci* 57:692.
108. Fisher MW, Hale DH, Glencross RG, Hathorn DJ, Lamming GE and Peters AR. (1985). Secretion of luteinizing hormone and oestradiol-17 β in post partum milked and suckled cows. *Br Vet J* 142:569.
109. Schams D, Schallenberger E, Menzer CH, Staigl J, Zottmeier K, Hoffman B and Karg H. (1978). Profiles of LH, FSH and progesterone in postpartum dairy cows and their relationship to commencement to cyclic functions. *Theriogenology* 10:453.
110. Schallenberger E and Prokopp S. (1985). Gonadotrophins and ovarian steroid in cattle. IV. Reestablishment of the stimulatory feedback action of estradiol-17B on LH and FSH. *Acta Endocrinol (Copenh)* 109:44.
111. Short RE, Randel RD, Staigmiller RB and Bellows RA. (1979). Factors affecting estrogen-induced LH release in the cow. *Biol Reprod* 21:683.
112. Randel RD, Harrison LM and Peterson ES. (1981). Serum luteinizing hormone levels in Brangus cows following variable suckling intensity and administration of various levels of estrogen. *Theriogenology* 16:565.
113. Schallenberger E, and Walters DL. (1985). Endocrine mechanisms contributing to postpartum anoestrus in dairy and beef cattle. In: Ellendorf, F. and Elsasser, F. (eds). *Endocrine Causes of Seasonal and lactational Anestrus in Farm Animals*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, p 206.
114. Clarke IJ and Cummins JT. (1984). Direct pituitary effects of estrogen and progesterone on gonadotropin secretion in the ovariectomized ewe. *Neuroendocrinol* 39:267.
115. Scaramuzzi RJ, Tillson SA, Thorneycroft IA and Caldwell BV. (1971). Action of exogenous progesterone and estrogen on behavioral estrus and luteinizing hormone levels in the ovariectomized ewe. *Endocrinology* 88:1184.
116. Schenemann HM, Humphrey WD, Crowder ME, Nett TM and Reeves J J. (1985). Pituitary luteinizing hormone-releasing hormone receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. *Biol Rep* 32:574.
117. Gregg DW and Nett TM. (1989). Direct effects of estradiol-17B of the number of gonadotropin-releasing hormone

- receptors in the ovine pituitary. Biol Rep 40:238.
118. Batra SK and Miller WL. (1985). Progesterone decreases the responsiveness of ovine pituitary cultures to luteinizing hormone-releasing hormone. Endocrinology 177:1436.
 119. Padmanabhan V and Convey EM. (1981). Progesterone inhibits the ability of estradiol to increase basal and luteinizing hormone-releasing hormone-induced luteinizing hormone release from bovine pituitary cells in culture. Neither progesterone nor estradiol affects follicle-stimulating hormone release. Endocrinology 109:1091.
 120. Drouva SV, Gorence I, Laplante E, Rerat E, Enjalbert A and Kordon C. (1990). Estradiol modulates protein kinase C activity in the rat pituitary in vivo and in vitro. Endocrinology 126:536.
 121. Rosie R, Thompson E and Fink G. (1990). Estrogen positive feedback stimulates the synthesis of LHRH mRNA in neurons of the rostral diencephalon of the rat. J Endocrinology 124: 285.
 122. Danforth DR, Elkind-Hirsch K and Hodgen GD. (1990). *in vivo* and *in vitro* modulation of gonadotropin-releasing hormone metabolism by estradiol and progesterone. Endocrinology 127: 319.
 123. Wise ME, Nilson JH, Nejedlik MT and Nett TM. (1985). Measurement of messenger RNA for luteinizing hormone beta-subunit and alpha-subunit during gestation and the postpartum period in ewes. Biol Reprod 33:1009.
 124. Crowder ME, Giles PA, Tamanini C, Moss GE and Nett TM. (1982). Pituitary content of gonadotropins and GnRH receptors in pregnant, postpartum and steroid treated OVX ewes. J Anim Sci 54:1235.
 125. Nett TM, Flores A, Carnevali F and Kile JP. (1990). Evidence for a direct negative effect of estradiol at the level of the pituitary gland in sheep. Biol Rep 43:554.
 126. Clarke IH, Cummins JT, Crowder ME and Nett TM. (1989). Long-term negative feedback effects of estrogen and progesterone on the pituitary gland of the long-term ovariectomized ewe. Endocrinology 120:207.
 127. Goodman RL and Karsch EJ. (1980). Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential supprential suppression by ovarian steroids. Endocrinology 107:1286.
 128. Rund LA, Leshin SL, Thompson FN, Byerley DJ and Kiser TE. (1989). Naloxone does not increase luteinizing hormone during late gestation in beef cows. J Anim Sci (Suppl 1) 12: 56.

129. Hamernik DL and Nett TM. (1986). Effects of progesterone (P) on hypothalamic and hypophyseal parameters which regulate synthesis and secretion of luteinizing hormone (LH) in ovariectomized ewes. *J Anim Sci (Suppl 1)* 63:339.
130. Moss GE, Crowder ME and Nett TM. (1981). GnRH-receptors interaction. VI. Effect of progesterone and estradiol on hypophyseal receptors for GnRH and serum and hypophyseal concentrations of gonadotropins in ovariectomized ewes. *Biol Reprod* 25:938.
131. Tamanini C, Crowder ME and Nett TM. (1986). Effect of estradiol and progesterone on pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes. *Acta Endocr (Copenh)* 111: 172.
132. Goodman RL, Bittman EL, Foster DL and Karsch FJ. (1981). The endocrine basis of the synergistic suppression of luteinizing hormone by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 109:1414.
133. Girmus LR and Wise EM. (1990). Progesterone and estradiol in combination, but not alone, inhibit GnRH stimulated LH release in the hypothalamic-pituitary disconnected. Society for the Study of Reproduction. Supplement number 1 / *Biology of Reproduction* / Vol 42; July 15-18. 23 rd Annual Meeting The University of Tennessee, Knoxville p 117.
134. Wu JC and Miller WL. (1991). Progesterone Shortens poly (A) tails of mRNAs for alpha and beta subunits of ovine luteinizing hormone. *Biol Rep* 45:215.
135. Karsch FJ, Legan SL, Hauger RL and Forest DL. (1977). Negative feedback action of progesterone on tonic luteinizing hormone secretion in the ewe: Dependence on ovaries. *Endocrinology* 101:800.
136. Girmus LR and Wise EM. (1991). Direct pituitary effects of estradiol and progesterone on luteinizing hormone release, stores and subunit messenger ribonucleic acids. *Biol Rep* 45:128.
137. Hainsfelder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC and Shupnik MA. (1991). A pulsatile gonatropin-releasing hormone stimulus required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: Evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vitro. *Endocrinology* 128:509.
138. DiGregorio BG, Herring DR and Nett MT. (1990). Time required for replenishment of pituitary concentrations gonadotropin mRNAs and gonadotropins after their depletion by estradiol. Society for the Study of Reproduction. Supplement number 1 / *Biology of Reproduction* / Vol 42; July 15-18. 23 rd Annual Meeting. The University of Tennessee, Knoxville p

139. Nalbandov A and Casida LE. (1940). Gonadotropic action of pituitaries from pregnant cows. *Endocrinology* 27:559.
140. Wetteman RP, Hill GM, Boyd ME, Spitzer JC, Forrest DW and Beal WE. (1986). Reproductive performance of post-partum beef cows after short-term calf separation and dietary energy and protein supplementation. *Theriogenology* 26:4.
141. Malven PV, Parfet JR, Gregg DW, Allrich RD and Moss GE. (1986). Relationships among concentrations of four opioid neuropeptides and luteinizing hormone-releasing hormone in neural tissues of beef cows following early weaning. *J Anim Sci* 62:723.
142. Pfeiffer DG, Pfeiffer A, Shimohigashi Y, Merriam GR and Lorisux DL. (1983). Predominant involvement of mu rather than delta or kappa opiate receptors in LH secretion. *Peptides*. 4:647.
143. Allrich RD (project leader), Malven PV, Knutson RJ, Weesner GD, Stanisiewski EP, Kyle SD, Haglof SA and Kunch VP. (1989). Methods for improvement of fertility in cows post-partum. Annual report of regional research project NC-113. Purdue University Agricultural Experiment Station October 1, 1988 to September 30, 1989.
144. Clarke G, Wood P, Merrick L and Lincoln DW. (1979). Opiate inhibition of peptide release from the neurohumoral terminals of hypothalamic neurons. *Nature* 282:746.
145. Leshin LS, Rund LA, Crim JW, Kiser TE. (1988). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone and proopiomelanocortin neurons within the preoptic area and hypothalamus of the bovine brain. *Biol Reprod* 39: 963.
146. Malven PV, Bossut DRB, Diekman MA. (1984). Effects of naloxone and electroacupuncture treatment on plasma concentrations of LH in sheep. *J Endocrinology* 107:341.
147. Riskind PN, Millard WJ, Martin JB. (1984). Opiate modulation of the anterior pituitary hormone response during suckling in the rat. *Endocrinology* 114:1232.
148. Van Vugt DA, Bakst G, Dyrenfurth I, Ferin M. (1983). Naloxone stimulation of LH secretion in the female monkey: influence of endocrine and experimental conditions. *Endocrinology* 113:1858.
149. Quickley ME, Yen SSC. (1980). Role of endogenous opiates on LH secretion during the menstrual cycle. *J Clin Endocr Metab* 51:179.

150. Whisnant CS. (1988). Endogenous Opioids: A Perspective. *J Anim Sci* (Suppl 1) 66:72.
151. Kalra PS and Kalra SP. (1986). Steroidal modulation of the regulatory neuropeptides: luteinizing hormone-releasing hormone, neuropeptide and endogenous opioid peptides. *J Steroid Biochem* 25:733.
152. Leshin LS, Rund LA, Kraeling RR and Kiser TE. (1991). The bovine preoptic area and median eminence: sites of opioid inhibition of luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *J Anim Sci* 69:3733.
153. Rotsztein WH, Drouva SV, Patton E and Kordon C. (1978). Met-enkephalin inhibits *in vitro* dopamine-induced LHRH release from mediobasal hypothalamus of male rats. *Nature* 274:281.
154. Goldstein A. (1984). Opioid peptides: function and significance. In: Hughes J. et al. (eds). *Opioids. Past, present and future*. Taylor and Francis, London p 127.
155. Leshin LS, Rund LA and Kiser TE. (1989). Naloxona increases luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion from the bovine preoptic area (POA) and median eminence (ME) *in vitro*. *J Anim Sci* (Suppl 2) 12:55.
156. Pang CN, Zimmermann E and Sawyer CH. (1977). Morphine inhibition of the preovulatory surges of plasma luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the rat. *Endocrinology* 101:1726.
157. Horton RJE, Cumins JT and Clarke IJ. (1987). Naloxone evokes large-amplitude GnRH pulses in luteal-phase ewes. *J Reprod Fert* 81:277.
158. Cicero TJ, Schmoeker FF and Meyer ER. (1985). Luteinizing hormone releasing hormone mediates naloxones negative feedback control of luteinizing hormone levels in normal and morphine sensitized male rats. *Life Sci* 37:467.
159. Brooks AN, Lamming GE, Lee PD and Haynes NB. (1996). Opioid modulation of LH secretion in the ewe. *J Reprod Fert* 76: 693.
160. Wardlaw SL, Wehrenberg WB, Ferin N, Calmel FW and Frantz AG. (1980). High levels of beta-endorphin in hypophyseal portal blood. *Endocrinology* 106:1323.
161. Seizinger RR, Liebisch DC, Grimm C and Herz A. (1984). Ontogenetic development of the proenkephalin B (pro-dynorphin) opioid peptide system in the rat pituitary. *Neuroendocrinology* 39:414.
162. Simatov R and Snyder SH. (1977). Opiate receptor binding

in the pituitary gland. Brain Res 124:176.

163. Chao CC, Moss GE, Malven FV. (1986). Direct opioid regulation of pituitary release of bovine luteinizing hormone. Life Sci 39:527.
164. Chao CC, Malven FV, Moss GE. (1985). *In vitro* effects of naloxone and methionine-enkephalin on the release of LH from bovine anterior pituitary cells. J Anim Sci (Suppl 1) 61: 381.
165. Oliver C, Mical RS and Porter JC. (1977). Hypotalamic pituitary vasculature: Evidence for retrograde blood fluid in the pituitary stalk. Endocrinology 101:598.
166. Weesner GD and Malven FV. (1989). Specific binding of naloxone to ovine brain tissue: comparison of brain regions and endocrine states. J Anim Sci 67:1532.
167. Short RE, Peters AR, Eason MP and Lamming GE. (1986). The effect of an opiate antagonist on LH secretion in beef cows. Paper presented at Annu Conf Soc for Study of Fertil, Bristol, UK p 17.
168. Pfeiffer DG, Pfeiffer A, Almeida OFX and Herz A. (1987). Opiate suppression of LH secretion in involves central receptors different from those mediating opiate effects on prolactin secretion. J Endocrinol 114:469.
169. Snyder S.H. (1984). Drug and neurotransmitter receptors in the brain. Science 224:22.
170. Drouva SV, Epelbaum J, Hery M, Tapia-Arancibia L, Lapante E and Kordon C. (1981). Ionic channels involved in the LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamus. Neuroendocrinology 32:155.
171. Drouva SV, Epelbaum J, Tapia-Arancibia L, Lapante E and Kordon C. (1980). Met-enkephalin inhibition of k-induced LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamic slices. Eur J Pharm 61:411.
172. Drouva SV, Epelbaum J, Tapia-Arancibia L, Lapante E and Kordon C. (1981). Opiate receptors modulate LHRH and SRIF release from mediobasal hypothalamic neurons. Neuroendocrinology 32:163.
173. Devorshak-Harvey E, Bona-Gallo A and Gallo RV. (1988). Declining plasma progesterone levels eliminate endogenous opioid peptide suppression of LH pulse frequency on day 22 of gestation in the rat. Neuroendocrinology 48:584.
174. Kesner JS, Kaufman JM, Wilson RC, Kuroda G and Knobil E. (1986). The effect of morphine on the electrophysiological activity of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing

- hormone pulse generator in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 43:686.
175. North RA. (1979). Opiates, opioid peptides and single neurons. *Life Science* 24:1527.
 176. Hulse GK, Coleman GJ, Copolov DL and Clements JA. (1984). Relationship between endogenous opioids and the oestrous cycle in the rat. *J Endocrinol* 100:271.
 177. Petraglia F, Baraldi M, Giarre G, Faccinetti F, Santi M, Volpe A and Genazzani AR. (1985). Opioid peptides of the pituitary and hypothalamus: changes in pregnant and lactating rats. *J Endocrinol* 105:239.
 178. Wardlaw DL, Wehrenberg WB, Ferin M, Antunes JL and Frantz A G. (1982). Effect of sex-steroids on beta-endorphin in hypophyseal portal blood. *J Clin Endo Metab* 55:877.
 179. Gabriel SA, Berglund LA and Simpkins JW. (1986). A decline in endogenous opioid influence during the steroid-induced hypersecretion of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology* 118:558.
 180. Smith MS, Fox SR and Chatterton RT. (1990). Role of proestrous secretion in suppressing basal pulsatile secretion during estrus of the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 50:308.
 181. Faigon MR, Szwarcfarb B, Scacchi P and Moguilevsky JA. (1987) Effects of naloxone on the development of the positive feedback action of oestrogen-progesterone on LH secretion in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115:16.
 182. Wu TJ, Morris DL, McArthur NH and Harms PG. (1991). A priming effect of naloxone on *in vitro* LHRH release from the hypothalamus of mid-luteal ewes. *Biol Rep* 44:546.
 183. Whisnant CS and Goodman RL. (1988). Effects of an opioid antagonist on pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe vary with changes in steroid negative feedback. *Biol Rep* 39:1032.
 184. Masotto C, Sahu A, Dube MG and Kalra SP. (1990). A decrease in opioid tone amplifies the luteinizing hormone surge in estrogen-treated ovariectomized rats. Comparison with progesterone effects. *Endocrinology* 126:18.
 185. Jacobson W and Kalra SP. (1989). Decreases in medio basal hypothalamic and preoptic area opioid ([³H] naloxone) binding are associated with the progesterone-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 124 (1):199.
 186. Weiland NG and Wise PH. (1990). Estrogen and progesterone regulate opiate receptor densities in multiple brain re-

gions. *Endocrinology* 126:804.

187. Garai J, Vertes M and Kovacs S. (1989). In vitro effects of cytosolic inhibitor and opiates on the binding of [3H] estradiol to nuclear type II binding sites of rat uterus and hypothalamus. *J Steroid Biochem* 32:433.
188. Mahmoud AI, Thompson FN, Peck DD, Nizinga NM, Leshin LS, Rund LA, Stuedemann JA and Kiser TE. (1989). Difference in luteinizing hormone response to an opioid antagonist in beef heifers and cows. *Ecol Rep* 41:431.
189. Short RE, Brooks AN, Peters AR and Lamming GE. (1987). Opioid modulation of LH secretion during the oestrous cycle of heifers. *Rep Fert.* 80:213.
190. Leakatos T, Moss GE, Diekman MA and Hudgens RE. (1986). Effects of estradiol-17 β and endogenous opioides on LH secretion in fall lambing ewes. *J Anim Sci (Suppl 1)* 63: 339.
191. Malven PV (project leader), Allrich, Hudgens RD, Trout WE, Weesner GD, Haglof SA, Robertson TL, Knutson RJ, Berghorn and Seevers DB. (1987). Methods for improvement of fertility in cows postpartum. Annual report of research project NC-113. Purdue University Agricultural Experiment Station October 1, 1986 to September 30, 1987.
192. Rund LA, Leshin LS, Thompson FN and Kiser TE. (1988). Effect on suckling and long term ovariectomy on hypothalamo hypophyseal responsiveness to an opioid agonist and antagonist. *J Anim Sci (Suppl 1)* 66:409.
193. Gordon K, Renfree MB, Short RV, Clarke IJ. (1987). Hypothalamo-pituitary portal blood concentrations of beta-endorphin during suckling in the ewe. *J Reprod Fert* 79:397.
194. Malven PV (project leader), Allrich RD, Trout WE, Weesner G D, Berghorn RJ, Knutson RJ, Stanisiewski EP, Haglof SA and Seevers DB. (1988). Methods for improvement of fertility in cows postpartum. Annual report of regional research project NC-113. Purdue University Agricultural Experiment Station October 1, 1987 to September 30, 1988.
195. Malven PV and Hudgens RE. (1987). Naloxona-reversible inhibition of luteinizing hormone in postpartum ewes: effects of suckling and season. *J Anim Sci* 65:196.
196. Gregg DW, Moss GE, Hudgens RE and Malven PV. (1986). Endogenous opioid modulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in postpartum ewes and cows. *J Anim Sci* 63:838.
197. Whisnant CS, Kiser TE, Thompson FN and Barb CR. (1986). Opioid inhibition of luteinizing hormone secretion during the postpartum period in suckled beef cows. *J Anim Sci* 63:

1445.

198. Myers TR, Myers DA, Gregg DW and Moss GE. (1989). Endogenous opioid suppression of release of luteinizing hormone during suckling in postpartum anestrous beef cows. *Dom Anim Endocr* 6:183.
199. Jiménez KF, Galina SC, Ramirez B and Navarro-Fierro R. (1985). Comparative study of the concentration of peripheral progesterone before and after of the PGF2-alfa injection between *Bos taurus* (Brown Swiss) and *Bos indicus* (Indobrasil) in the tropic. *Anim Reprod Sci* 9:333.
200. Niswender DG, Reichert L Jr, Midgley AR Jr and Nalvandov AV, (1969). Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. *Endocrinology* 44:1166.
201. Dunlap ES, Kiser ET, Cox MN, Tompson NF, Rampacek EG, Benyshek LL and Kraeling RR. (1981). Cortisol and luteinizing hormone after adrenocorticotrophic hormone administration to postpartum beef cows. *J Anim Sci* 52:587.
202. SAS/STAT User's guide, release 6.03 edition. SAS Institute Inc.
203. Landymore MK and Wilkinson M. (1988). Influence of neonatal opioid blockade or injections of gonadotrophin-releasing hormone on the timing of puberty in female rats: correlation of opioid effects with occupation of hypothalamic Mu-opioid receptors. *J Endocrinol* 119:447.
204. Gabriel MS, and Simpkins WJ. (1983). Effects of a sustained-release naloxone pellet on luteinizing hormone secretion in female rats. *Neuroendocrinology* 37:342.
205. Owens PD and Cicero JT. (1981). Development of acute tolerance to the effects of naloxone on the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis in the male rat. *J Pharmacol Exp Ther* 216:135.