

# INTERACCION DE LA NALOXONA CON LA PROGESTERONA Y EL ESTRADIOL, DURANTE EL ANESTRO POSPARTO EN LAS VACAS CEBU <sup>a</sup>

Jesús Alejandro Arreguín Arévalo <sup>b</sup>

Alejandro Villa-Godoy <sup>c</sup>

Moisés Montaña-Bermúdez <sup>d</sup>

Eugenio Villagómez-Amezcuca Manjarres <sup>e</sup>

Heriberto Román-Ponce <sup>c</sup>

Mario Cárdenas León <sup>f</sup>

## RESUMEN

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) y sobre la presencia del primer cuerpo lúteo, en vacas cebú (n=26) durante el anestro posparto, sujetas a control del amamantamiento. Los tratamientos fueron: tres inyecciones de N (SN); progesterona (P) seguida de N como en el tratamiento anterior (SPN); estradiol (E) seguido de N como en los anteriores (SEN); combinación de los tratamientos anteriores (PEN); como en PEN, pero solución salina (S) sustituyó a N (PES) y el testigo, donde S sustituyó a P, E y N (SS). Solamente la primera aplicación de N, cuando no fue precedida por la administración de hormonas esteroides ováricas, incrementó la concentración media de la LH. Los tratamientos SPN y PEN disminuyeron el intervalo del tratamiento 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.

PALABRAS CLAVE. Vacas, Anestro Posparto, Naloxona, Progesterona, Estradiol, Hormona Luteinizante, Cuerpo Lúteo.

Tec. Pecu. Mex. Vol. 33 No. 2 (1995)

## INTRODUCCION

El anestro posparto es una de las principales causas que limitan la productividad en el ganado bovino productor de carne (1). En el trópico mexicano, el 57% de los problemas reproductivos del ganado Cebú y sus cruza, son atribuidos a esta condición (2). La progesterona (P) y el estradiol (E) juegan un importante papel en el reinicio de la actividad ovárica; por ello, el tratamiento con estas hormonas en vacas productoras de carne ha sido ampliamente practicado (3); sin embargo, sus efectos

sobre la duración del intervalo del parto al primer estro fértil, sobre la síntesis y la secreción de las gonadotropinas y sobre la inducción de la ovulación, son variables e inconsistentes (4, 5). Por otra parte, el amamantamiento del becerro es un factor central en la etiología del anestro posparto (6, 7, 8, 9). Las evidencias indican que el amamantamiento ejerce un efecto modulador sobre los mecanismos de retroalimentación, producidos por los esteroides ováricos en el eje hipotálamo-hipofisiario (HH; 6, 10).

Se ha documentado ampliamente el efecto depresor que ejerce el amamantamiento sobre la secreción de la LH (hormona luteinizante) (7, 9, 11, 12, 13), donde los péptidos opioides endógenos (POE), han sido identificados como mediadores de este efecto (14, 15, 16). No obstante que en vacas amamantadoras la secreción de la LH se encuentra disminuida, el contenido de LH en la pituitaria a partir del día 30 posparto, es similar al detectado en vacas que se encuentran ciclando (17, 18). La

a Recibido para su publicación el 9 de febrero de 1995.

b Campo Experimental Playa Vicente, INIFAP-SAGAR.

c CIR-Golfo Centro, Veracruz, INIFAP-SAGAR.

d CNID-Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP-SAGAR.

e CNID-Fisiología, Departamento de Reproducción, INIFAP-SAGAR.

f Departamento de Hormonas Protéicas. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

El estudio fue apoyado económicamente por el INIFAP-SAGAR. Los reactivos y el material para la cuantificación de la hormona luteinizante fue aportado por el Departamento de Hormonas Protéicas del Hospital de la Nutrición Salvador Zubirán. El apoyo económico para un becario fue otorgado por el CONACYT.

actividad del sistema opiodérgico es afectada por la concentración de esteroides ováricos circulantes (10, 19, 20, 21); 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 (20).

El efecto de una aplicación de N (antagonista de los POE por ocupar sus receptores) sobre la liberación de la LH ha sido estudiado en vacas amamantadoras (22, 23), en vacas sin becerro (16), en diferentes intervalos del periodo posparto y aplicando distintas dosis (16, 23). Los hallazgos más relevantes indican que en las vacas que amamantan *ad libitum*, la aplicación de N induce un incremento transitorio en la concentración sérica de la LH (16, 24). Después del destete, cuando se produce un aumento en la liberación de la LH, la aplicación de N es inefectiva para aumentar la concentración sérica de la hormona (16). Sin embargo, se desconoce si una aplicación de N aumenta la liberación de la LH cuando el estímulo del amamantamiento se encuentra disminuido; sí aplicaciones subsecuentes de N incrementan la concentración sérica de la LH, en forma similar y si este o estos incrementos en la concentración sérica de la LH, afectan el intervalo a la formación del primer cuerpo lúteo posparto.

Son pocos los trabajos en los que se ha estudiado la interacción de los POE con las hormonas esteroides ováricas. En las vacas ovariectomizadas pretratadas con P más E, en concentraciones similares a las detectadas durante la gestación, la aplicación de N no aumentó la concentración sérica de la LH (25); en estas vacas, la aplicación de N el día siete ó 14 después de terminado el tratamiento con esteroides aumentó la concentración sérica de la LH (25). No existe información de la posible participación de los POE en el efecto de la P y el E sobre la secreción de la LH,

cuando estos esteroides son aplicados en la dosis comunmente usada como inductora de la ciclicidad, cuando la N es aplicada a distintos intervalos después de la administración de las hormonas esteroides y cuando el estímulo del amamantamiento se encuentra disminuido. Este trabajo fue realizado en vacas Cebú, durante el anestro posparto y sujetas al control del amamantamiento, con el objetivo de determinar: a) el efecto de una aplicación y de aplicaciones repetidas de N sobre la liberación de la LH; b) 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 y c) el efecto de 3 aplicaciones subsecuentes de N; precedidas o no de P, E y P más E, sobre la duración del intervalo del tratamiento a la formación del primer cuerpo lúteo posparto.

## MATERIALES Y METODOS

Se usaron 26 vacas Cebú, de dos a cinco partos, que al momento del parto presentaron una condición corporal entre 7 y 8 puntos (1 = caquexia y 9 = obesidad; 26). Las vacas tuvieron un parto normal y permanecieron clínicamente sanas durante el experimento. La época de partos estuvo comprendida entre el uno de enero y el 10 de abril. Las vacas fueron manejadas en un régimen de amamantamiento controlado, el cual consistió en permitir el amamantamiento del becerro durante una hora por la mañana y una hora por la tarde (06:00 y 17:00 h); el resto del tiempo, las vacas y los becerros permanecieron en potreros diferentes.

Los animales pastaron en zacate Estrella de Africa (*Cynodon plectostachyus*) y tuvieron acceso a sales minerales y agua a libertad; además se les proporcionó 2 kg/animal/día de un suplemento comercial, cuya etiqueta indicó contener 70% de TND y 14% de proteína cruda. El suplemento fue administrado 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. La detección de estros se realizó dos veces al día, por períodos de una hora (06:00 y 17:00 h), desde el día del parto hasta el final del estudio.

Los tratamientos (Cuadro 1) fueron: SN (n=4), tres inyecciones de N aplicadas a intervalos de 12 h, iniciando el día 30 posparto a las 22:00 h; SPN (n=4), cinco inyecciones de P aplicadas a intervalos de 24 h, iniciando el día 26 posparto y N como en el tratamiento anterior; SEN (n=4), una inyección de E el día 30 posparto y N como en el anterior; PEN (n=4), cinco inyecciones de P a intervalos de 24 h, iniciando el día 25 posparto, más una aplicación de E el día 30 posparto y N como en los tratamientos anteriores; PES (n=5), como en el tratamiento anterior, pero S sustituye a N y el grupo testigo, SS (n=5). La P (25 mg/inyección en volumen de 0.5 ml) y el E (cipionato de estradiol, 2 mg/inyección en volumen de 1 ml) fueron aplicados a las 10:00 h, por vía intramuscular. La N hidroclohidrica (Dupond Lab.) fue aplicada en dosis de 400 mg/inyección por vía intravenosa, en un volumen de 10 ml. Esta dosis, incrementa la concentración sérica de la LH durante 15 a 60 min después de su aplicación, a partir del día 28 posparto

en vacas en anestro amamantando *ad libitum* (16, 24, 27). Como placebo, la S fue aplicada por la vía y en el volumen correspondiente al día de la administración de P, E y N.

Con la finalidad de confirmar la condición de anestro, se tomó una muestra diaria de sangre por punción de la vena coccígea del día 14 al 24 posparto. De la misma manera, se colectó una muestra del día 25 al 31 después del parto, para corroborar el incremento en la concentración sérica de P, en los animales tratados (grupos SPN, 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). Posteriormente, para detectar la formación del primer cuerpo lúteo posparto, se tomó una muestra sanguínea cada cuatro días del día 31 al 90 después del parto.

El criterio de anestro fue el mantenimiento de concentraciones de P, inferiores a 1 ng/ml de suero. La detección de tres muestras consecutivas con concentraciones de P sérica superiores a 1 ng/ml, antes del inicio de los tratamientos, causaron la eliminación de la vaca para los análisis. La concentración basal de la P, fue considerada como la concentración promedio de las muestras colectadas el día 14 posparto con menos de 1 ng de P/ml de suero.

### 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	28 m	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.

Para cuantificar la LH sérica, las vacas fueron canuladas en una de las venas yugulares y se tomaron muestras sanguíneas cada 15 min durante 2 h antes y 2 h después de cada aplicación de N o S. Durante los periodos intensivos de muestreo, las vacas permanecieron en una prensa de manejo.

La P fue cuantificada en suero sanguíneo, por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), validada en el laboratorio de Reproducción del CENIDFMA, INIFAP (28). La concentración de P para los controles usados fue de  $2.18 \pm 0.38$  ng/ml y los coeficientes de variación (CV) intra e inter análisis (n=29) fueron: 6.1 y 15.1 %, respectivamente, con una sensibilidad de  $0.17 \pm 0.17$  ng/ml. La LH fue cuantificada usando un RIA heterólogo, de doble anticuerpo, específico para LH bovina, con algunas modificaciones de la técnica descrita por Niswender *et al.* (29). El primer anticuerpo fue suero de conejo anti LH ovina (CSU 204, producido por G.D. Niswender), a una dilución de trabajo de 1:30,000. La hormona utilizada como referencia en la curva patrón fue USDA-bLH-B5 (AFP-5,500) y para la marcación con  $I^{125}$  se utilizó la USDA-bLH-I-1 (AFP-6,000). La  $I^{125}$  LH se diluyó con solución amortiguadora fosfatada (SAF), más 0.1% de albúmina de huevo (SAF-A) y se pipetearon 100 ml por tubo (20,000 cuentas por minuto). Como segundo anticuerpo se utilizó suero de ovino antigama-globulina de conejo, a una dilución inicial de 1:20 con SAF-A; después de agregar el segundo anticuerpo, se incubó por 48 h a 4 C; la reacción fue detenida con 1 ml de SAF-A agregado a cada tubo para posterior centrifugación a 2,796 xg durante 30 min; se decantó el sobrenadante y se contó el precipitado con un detector de centelleo para rayos gamma. Los CV intra análisis para los controles con concentración baja ( $1.03 \pm 0.10$  ng/ml), media ( $12.92 \pm 0.95$  ng/ml) y alta ( $29.71 \pm 3.22$  ng/ml) en los

ensayos de LH fueron: 5.5, 4.2 y 6.3 %, respectivamente. Los CV inter análisis (n=4) para los controles de concentración baja, media y alta en los ensayos de LH fueron: 13.5, 10.4 y 15.3 %, respectivamente. La sensibilidad por ensayo fue de 0.195 ng/ml. Las variables de respuesta fueron:

Concentración basal de LH: fue la concentración sérica de LH más baja, detectada en cada vaca, dentro de cada período de muestreo. Cuando la concentración más baja fue inferior a la sensibilidad del ensayo, ésta última fue considerada como la concentración basal. Concentración media de LH: fue el promedio de LH cuantificada en todas las muestras sanguíneas de cada período de muestreo. Frecuencia de Pulsos de LH: número de pulsos cada 2 h. Un pulso fue definido como un incremento en la concentración sérica de LH, superior en por lo menos tres desviaciones estándar a la concentración basal, seguido por una concentración ascendente 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 (30).

Intervalo (días) 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, que fueron colectadas cada cuatro días (10 días de duración). En las vacas que no presentaron cuerpo lúteo, se asumió que éste ocurrió un día después del fin del estudio (día 91 posparto).

Para responder a los objetivos específicos a y b, correspondientes a las variables de respuesta relacionadas con la LH, se usó un diseño de parcelas divididas para cada aplicación de N o S. Las parcelas fueron los 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 analizados con una serie de análisis de varianza, usando el procedimiento de Modelos Lineales Generales (GLM) del paquete SAS (31). 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. Con el fin de responder al objetivo c, se usó un diseño completamente al azar, en el cual se comparó el efecto de los seis tratamientos sobre el intervalo del fin de los tratamientos a la formación del primer cuerpo lúteo posparto.

Colateralmente, como una alternativa para explicar el efecto de los tratamientos con hormonas esteroides ováricas combinadas con N, sobre la formación del primer cuerpo lúteo posparto, mediante los cambios en la concentración basal y media de la LH sérica, los datos de los tratamientos SN, SPN, SEN y PEN fueron analizados en un diseño de parcelas divididas pero con un arreglo factorial, donde los factores de estudio fueron P y E y los niveles de cada factor fueron los tratamientos con la presencia y ausencia del factor correspondiente; mientras que las subparcelas fueron los periodos de muestreo previo (2 h), o posterior (2 h), a la aplicación de N o S.

## RESULTADOS

Durante el periodo experimental, se observó una disminución en el peso corporal de las vacas (media  $\pm$  error estándar:  $290 \pm 0.071$  g al día), el cual fue similar entre los tratamientos. La magnitud de las pérdidas de peso no afectó el reinicio de la ciclicidad, ya que al comparar mediante un análisis de varianza a los animales con mayor (n=13) y con menor (n=13) pérdida de peso,

independientemente de los tratamientos, no se encontró diferencia sobre el reinicio de la actividad ovárica. Durante el periodo previo al inicio de los tratamientos, la concentración media de P fue de  $0.48 \pm 0.028$  ng/ml y la concentración basal fue de  $0.41 \pm 0.05$  ng/ml. En las vacas tratadas con P, la concentración sérica se elevó a  $1.92 \pm 0.19$  ng/ml en los días de su aplicación y disminuyó a  $0.70 \pm 0.07$  ng/ml dos días después de la última inyección.

Debido al escaso número de pulsos de LH, observados en la mayor parte de las vacas, independientemente de los tratamientos, no fueron analizadas las variables frecuencia 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.

Al analizar el efecto de la N sobre la liberación de la LH, cuando no fue precedida por la administración de hormonas esteroides ováricas, ninguna de las aplicaciones de N afectó la concentración basal de la LH (Cuadro 3). Sin embargo, durante el periodo previo a la primera aplicación de N o S, la concentración media ( $p < 0.02$ ) de LH, fue mayor en el grupo SS que en SN y solamente la primera aplicación de N indujo un incremento en la concentración media de la LH (Cuadro 3;  $p < 0.02$ ). Por otra parte, cuando la aplicación de N fue precedida por la administración de P, E o su combinación, ninguna de las aplicaciones de N afectó la concentración basal ni la concentración media de la LH (Cuadro 4).

Con relación al efecto de los tratamientos sobre el intervalo del tratamiento a la formación del primer cuerpo lúteo posparto, se encontró un menor intervalo ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos SPN y PEN (Cuadro 5). Al analizar las variables de respuesta relacionadas con la LH en el diseño de parcelas divididas con arreglo factorial, se observó una interacción ( $p < 0.08$ ) en los efectos de los factores de estudio (P y E)

## CUADRO 2

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

ANTES DE NALOXONA*** DESPUES DE NALOXONA						
TRATAMIENTO**	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
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	0,00	0,25	0,25	0,00	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 no se hizo análisis estadístico.

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

\*\*\* N=naloxona; P=progesterona; E=cloruro 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 SOBRE LA CONCENTRACION BASAL Y MEDIA DE LH SERICA (ng/ml) EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO.

TRATAMIENTO	1a		2a		3a	
	PRE**	POS	PRE	POS	PRE	POS
CONCENTRACION BASAL						
SN	.38 <sup>a</sup> ± .02	.45 <sup>a</sup> ± .02	.40 <sup>a</sup> ± .02	.40 <sup>a</sup> ± .02	.42 <sup>a</sup> ± .03	.46 <sup>a</sup> ± .03
SS	.43 <sup>a</sup> ± .02	.45 <sup>a</sup> ± .02	.42 <sup>a</sup> ± .02	.42 <sup>a</sup> ± .02	.57 <sup>a</sup> ± .02	.58 <sup>a</sup> ± .03
CONCENTRACION MEDIA						
SN	.49 <sup>a</sup> ± .02	.59 <sup>b</sup> ± .02	.56 <sup>a</sup> ± .03	.56 <sup>a</sup> ± .03	.62 <sup>a</sup> ± .03	.65 <sup>a</sup> ± .03
SS	.65 <sup>c</sup> ± .02	.59 <sup>b</sup> ± .02	.58 <sup>a</sup> ± .03	.61 <sup>a</sup> ± .03	.72 <sup>a</sup> ± .03	.71 <sup>a</sup> ± .03

\* Aplicación a intervalos de 12 h. Un análisis estadístico por aplicación.

\*\* PRE y POS se refiere a la concentración detectada durante las 2h. que precedieron y las 2h que siguieron a cada aplicación de N o S.

a, b, c. Literales diferentes indican diferencia significativa (p < 0.02). Las comparaciones se hicieron dentro de aplicación

N=naloxona; S=solución salina fisiológica n=4 para SN; n=5 para SS. Media ± Error estándar

#### CUADRO 4

EFFECTO DE UNA O VARIAS APLICACIONES DE NALOXONA PRECEDIDAS DE PROGESTERONA, ESTRADIOL Y SU COMBINACION SOBRE LA CONCENTRACION BASAL Y MEDIA DE LA LH SERICA (ng/ml) EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO. \*

TRATAMIENTO	1a		2a		3a	
	PRE**	POS	PRE	POS	PRE	POS
CONCENTRACION BASAL						
SPN***	.27 ± .04	.29 ± .04	.31 ± .03	.26 ± .03	.33 ± .06	.37 ± .06
SEN	.29 ± .04	.28 ± .04	.29 ± .03	.33 ± .03	.68 ± .07	.68 ± .07
PEN	.70 ± .04	.69 ± .04	.90 ± .03	.86 ± .03	1.02 ± .06	.98 ± .06
SS	.43 ± .04	.45 ± .02	.42 ± .02	.44 ± .02	.57 ± .06	.58 ± .06
CONCENTRACION MEDIA						
SPN	.39 ± .08	.39 ± .08	.41 ± .04	.40 ± .04	.53 ± .12	.50 ± .12
SEN	.52 ± .08	.41 ± .08	.49 ± .04	.49 ± .04	1.17 ± .14	.58 ± .14
PEN	.96 ± .08	1.10 ± .08	1.16 ± .04	1.10 ± .04	1.22 ± .12	1.29 ± .12
SS	.65 ± .07	.59 ± .07	.58 ± .03	.61 ± .03	.72 ± .11	.71 ± .11

\* Aplicación a intervalos de 12 h. Un análisis estadístico por aplicación.

\*\* PRE y POS se refiere a la concentración detectada durante las 2h. que precedieron y las 2h que siguieron a cada aplicación de N o S.

\*\*\* No se detectaron diferencias ( $p < 0.10$ ). Las comparaciones se hicieron dentro de aplicación.

N=naloxona; P=progesterona; E=Cipionato de estradiol y S=solución salina. Media ± Error estándar.

#### CUADRO 5

EFFECTO DE LA NALOXONA, LA PROGESTERONA Y EL ESTRADIOL SOBRE EL RETORNO DE LA ACTIVIDAD LUTEA, EN LA VACA CEBU EN ANESTRO POSPARTO.

TRATAMIENTO**	NUM.	DIAS AL PRIMER* CUERPO LUTEO
SN	4	36.5 ± 8.64 <sup>a</sup>
SPN	4	19.5 ± 8.64 <sup>b</sup>
SEN	4	53.5 ± 8.64 <sup>a</sup>
PEN	4	15.3 ± 8.64 <sup>b</sup>
PES	4	32.5 ± 8.64 <sup>a</sup>
SS	5	44.2 ± 7.73 <sup>a</sup>

\* Días del fin del tratamiento (día 31 posparto) a la detección del primer cuerpo lúteo después del parto.

ab Literales diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

N=naloxona; P=progesterona; E=Cipionato de estradiol y S=solución salina fisiológica. Media ± Error estándar.

sobre la concentración basal, (Gráfica 1) y la concentración media (Gráfica 2) de la LH, durante los periodos de muestreo relacionados con la primera y segunda aplicación de N. Así mismo, no se observó ningún efecto en el periodo de muestreo relacionado con la tercera aplicación de N (los periodos incluyeron el promedio de la concentración de LH, obtenida en los muestreos previo y posterior a la primera, segunda o tercera aplicación 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 tanto que la aplicación de la P o el E, indujeron una disminución en la concentración basal y media de la LH durante los mismos periodos.

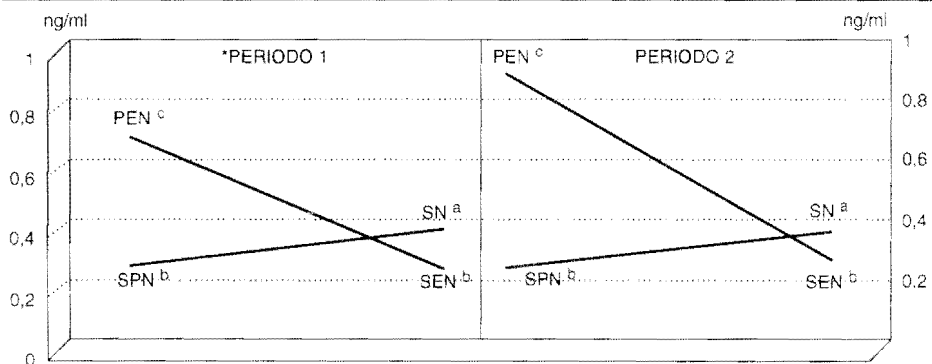
## DISCUSION

En estudios realizados con vacas sujetas a amamantamiento *ad libitum*, una aplicación de N indujo un incremento rápido y

transitorio en la concentración sérica de la LH (10, 16, 22, 23, 24). En dichos estudios, la concentración media de la LH antes de la aplicación de la N fue de 0.22 a 1.8 ng/ml; la aplicación de N indujo un incremento de 0.7 a 3.3 ng/ml (de 180 a 300%), con una duración de 30 a 60 min. En nuestro estudio, al usar vacas en anestro posparto sujetas al control del amamantamiento, la concentración media de la LH, previa a la aplicación de N fue de 0.49 ng/ml; la aplicación de N indujo un incremento de 0.10 ng/ml (20%) durante los 120 min 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, que disminuyó el tono inhibitor opioide sobre la liberación de la LH. En apoyo a esta interpretación, en otros estudios se observó que, al separar el becerro de la vaca, se produjo un incremento en la concentración sérica de LH y la aplicación de N fue inefectiva para aumentar su concentración (16, 32, 33).

### GRAFICA 1

INTERACCION DE LA PROGESTERONA Y EL ESTRADIOL SOBRE LA CONCENTRACION BASAL DE LH EN VACAS CEBU EN ANESTRO POSPARTO.



\* Media obtenida en los muestreos previo y posterior a la 1ª (PERIODO 1) y la 2ª (PERIODO 2) aplicación de naloxona.

a,b,c Literales diferentes indican diferencia ( $p < 0.08$ ).

Error estándar 0.03 y 0.02 para los periodos 1 y 2, respectivamente.

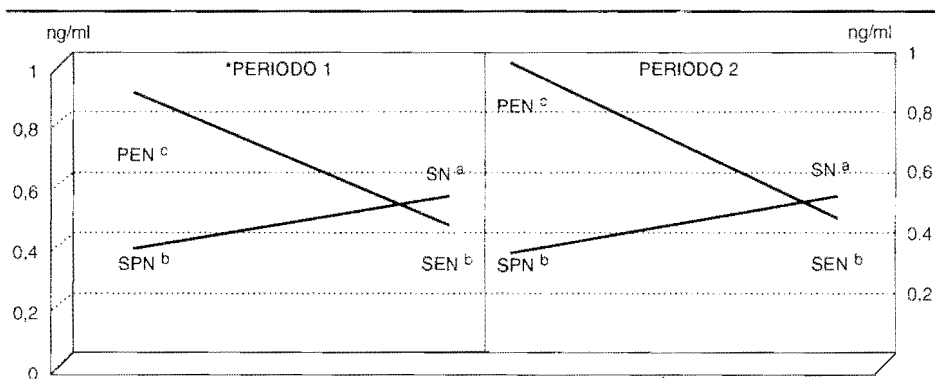
Un análisis estadístico para cada periodo.

N=naloxona; P=progesterona; E=estradiol y S=solución salina.



## GRAFICA 2

INTERACCION DE LA PROGESTERONA Y EL ESTRADIOL SOBRE LA CONCENTRACION MEDIA DE LH EN VACAS CEBU EN ANESTRO POSPARTO.



\* Media obtenida en los muestreos previo y posterior a la 1ª (PERIODO 1) y la 2ª (PERIODO 2) aplicación de naloxona.

a,b,c Literales diferentes indican diferencia ( $p < 0.08$ ).

Error estándar 0.06 y 0.03 para los periodos 1 y 2, respectivamente.

Un análisis estadístico para cada período.

N=naloxona; P=progesterona; E=estradiol y S=solución salina.

De manera similar, en las vacas donde se restringió el amamantamiento a dos (34) y cuatro periodos (33) al día, la aplicación de N no indujo un aumento en la concentración media de la LH sérica y sólo en el estudio donde el amamantamiento fue restringido a dos periodos al día, la aplicación de N indujo un aumento en la amplitud del pulso de LH (34). Es posible que la disminución del tono inhibitor 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 (15).

Con relación a la falta de efecto en la segunda y tercera aplicación de N, cuando no fue antecedida de la administración de hormonas esteroides, algunos autores han sugerido la posibilidad del desarrollo de un mecanismo de tolerancia a los efectos de aplicaciones subsecuentes de N sobre la liberación de la LH. En un estudio realizado

con ratas, se observó una marcada reducción en la liberación de LH, en respuesta a una segunda aplicación de N cuando el intervalo en las aplicaciones fue de 2 a 4 h (35); una respuesta similar entre aplicaciones, se detectó cuando el intervalo en las aplicaciones fue de 6 h o mayor (35). Sin embargo, en un estudio realizado en vacas en anestro posparto, sujetas a amamantamiento *ad libitum* (22), la liberación de la LH en respuesta a una segunda aplicación de N, realizada a un intervalo de 2 h, fue similar entre aplicaciones. En nuestro estudio, el intervalo en las aplicaciones de N fue de 12 h, por lo que es poco probable que el desarrollo de un mecanismo de tolerancia a N esté relacionado con la falta de efecto de aplicaciones repetidas de N sobre la liberación de la LH.

La falta de efecto de la N sobre la liberación de la LH, cuando fue antecedida por la administración de hormonas esteroides ováricas, sugiere la ausencia de un mecanismo opioide inducido por la

administración de dichas hormonas. Si consideramos que el estímulo del amamantamiento, es un modulador de la acción supresora de los esteroides ováricos sobre la liberación de LH (6, 7, 36, 37); donde los POE han sido involucrados, por lo menos en parte, como mediadores de este efecto (10, 20, 21, 22), es posible que la restricción del amamantamiento, presente en nuestro modelo animal, indujera una disminución del tono inhibitorio opioide. Esto concuerda con lo discutido en relación a la menor respuesta en la liberación de la LH inducida por la aplicación de N, cuando no fue precedida de la administración de hormonas esteroides ováricas. Por otra parte, es posible que la P ejerza un efecto sobre el tono inhibitorio opioide al disminuir el número de receptores para POE. En un estudio, se detectó una menor concentración de sitios de unión a N marcada con tritio en el cerebro de vacas amamantadoras, que presentaron una mayor concentración plasmática de P (vacas ciclando), comparada con la detectada en el cerebro de vacas que presentaron una menor concentración plasmática de P (vacas en anestro) (15). Aunque en el estudio citado, no se puede discernir si la disminución en el número de sitios de unión a N es la causa o la consecuencia del incremento en la concentración de la P. En otra investigación, llevada a cabo en ratas ovariectomizadas pretratadas con E, la aplicación de P, antes de la elevación preovulatoria de la LH, indujo en el hipotálamo una disminución del número de sitios de unión a N marcada con tritio (38). Si un mecanismo semejante está presente en la vaca en anestro posparto y en particular en el modelo animal usado en nuestro estudio, puede contribuir a explicar la falta de efecto de la N sobre la liberación de la LH en los animales pretratados con P. Por otra parte, no se descarta la posibilidad que en el tratamiento EN, la aplicación de E indujera un aumento en el tono inhibitorio

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 aplicación de N, indujo una mayor liberación de la LH, en vacas amamantadoras que fueron ovariectomizadas de 11 a 25 días antes de la aplicación de N, comparada con la inducida en vacas con los ovarios intactos (10); lo que sugiere que la presencia de esteroides ováricos aumentó el tono inhibitorio opioide sobre la liberación de la LH.

Los resultados sobre el retorno de la actividad lútea, indican que fue necesaria la combinación de P y N (tratamientos SPN y PEN), para lograr disminuir el intervalo del tratamiento a la formación del primer cuerpo lúteo posparto. La participación de la N en la disminución de dicho intervalo, también es sugerida por el hecho de que, la aplicación de P más E sin N, no disminuyó el intervalo del tratamiento a la formación del primer cuerpo lúteo. En apoyo a nuestra afirmación, en un estudio realizado en vacas sujetas a restricción del amamantamiento, la aplicación de una y tres inyecciones de N disminuyó el intervalo del parto a la manifestación del primer estro (34). Por lo anterior, consideramos poco probable que solamente la P este involucrada en la disminución de dicho intervalo; no obstante, en este estudio no puede descartarse esta posibilidad. Por otra parte, el efecto permisivo, aunque no consistente, que la P ejerce sobre el retorno de la actividad ovárica en vacas en anestro posparto, ha sido ampliamente documentado y en varios trabajos se ha relacionado el incremento en la concentración plasmática de la P con el tránsito del estado de anestro al estado cíclico, en las vacas con becerro (39, 40, 41). Como fue mencionado, durante los períodos de muestreo en nuestro estudio, no se observaron evidencias de la participación de un mecanismo inhibitorio opioide sobre la liberación de la LH, en las

vacas que recibieron hormonas esteroides ováricas; por lo que desconocemos el mecanismo por el cual, la aplicación de N en las vacas que recibieron P y P más E, contribuyó a la disminución del intervalo a la formación del primer cuerpo lúteo posparto. 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 POE, 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 aún así, fuera suficiente para contribuir en la disminución del intervalo a la formación del primer cuerpo lúteo después del parto. Con relación a la interacción de la P y el E sobre la concentración sérica de la LH. Es posible que la administración de 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 ovejitas ovariectomizadas se observó un efecto permisivo de la P sobre la liberación de LH inducida por E (42). Además, la disminución de la concentración sérica de la LH producida por E, permite sugerir que en ausencia del efecto permisivo de P, persiste el efecto de retroalimentación negativa del E sobre la liberación de LH. Consideramos que la disminución en la concentración sérica de LH producida por la administración de P, no refleja el efecto final de la misma sobre la liberación de la LH. Es sabido que durante la aplicación de P, se observa una disminución en la concentración sérica de LH, la cual aumenta una vez que disminuye la concentración sérica de P (43). En nuestro estudio, los muestreos para la cuantificación de la LH se realizaron antes que disminuyera la concentración sérica de P, en los tratamientos donde fue administrada.

Por lo anterior, se concluye que, por 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 opioide sobre la liberación de LH.

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

La aplicación de P más N o de E más N, disminuyó la concentración sérica de LH, pero al combinarlos, se observó un aumento en su concentración basal y media, por lo 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.

Finalmente, se concluye que la combinación de P y N disminuye el intervalo a la formación del primer cuerpo lúteo posparto, por mecanismos no aclarados en este estudio ni previstos en la literatura disponible; no obstante, no puede descartarse la posibilidad de que la P sea la responsable de tal efecto.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Departamento de Hormonas Protéicas del Hospital de la Nutrición Salvador Zubirán por los reactivos y material para la cuantificación de la hormona luteinizante y al CONACYT por el apoyo económico a un becario.

**EFFECTS OF THE INTERACTIONS OF NALOXONE WITH EXOGENOUS PROGESTERONE AND ESTRADIOL ON THE LENGTH OF POSTPARTUM ANESTRUS IN ZEBU COWS.**

**SUMMARY**

An incomplete Split-plot factorial design was used to determine the effects of repeated injections of Naloxone (N) alone, or preceded by exogenous progesterone (P), estradiol (E) or P+E on the release patterns of luteinizing hormone (LH) and the length of anestrus in zebu cows. Main plot was animal within treatment whereas subplots were periods that preceded or followed each N injection. Twenty six multiparous cows were randomly assigned to one of six treatments: N) three injections of N at 12 h intervals beginning on day (d) 30 postpartum; PN) as N but cows were given a daily injection of natural P (25 mg) from d 26 to 30 postpartum; EN) as N but cows received 2 mg of E cypionate immediately before the first injection of N; PEN) as PN+EN but beginning on d 25 postpartum; PES) as PEN but physiologic saline solution (S) replaced N; and S) as PES but P and E were replaced by S. Duration of anestrus was considered the length of the interval from the first injection of N to the first corpus luteum (CL: first of 4 consecutive blood samples with P > 1 ng/ml). To determine the presence of CL, serum progesterone was quantified in Jugular blood samples taken every other d (d 14 thru 91 postpartum). Concentrations of LH were determined in Jugular blood samples collected every 15 min from 2 h before thru 2 h after each injection of N or the corresponding S. Pattern of LH was identified by frequency and amplitude of LH pulses during 2 h. Naloxone alone or preceded by P, E or P+E did not alter LH frequency or amplitude of pulses. Thus, endogenous opioids did not mediate variations of LH release pattern in cows that remain in anestrus despite suckling control and adequate feeding. Intervals from N treatment to CL were shorter ( $p < .05$ ) in cows treated with PN (19.5±8.6 d; mean ± pooled standard error) and PEN (15.3 d) than in cows receiving N (36.5 d), EN (53.5 d) or S (44.2 d). It is concluded that repeated injections of N preceded by P reduce postpartum anestrus by an unknown mechanism unrelated with drastic changes of LH release patterns.

**KEY WORDS:** Cows, Anestrous Postpartum, Naloxone, Progesterone, Estradiol, Hormone Luteinizing, Corpora Lutea.

**REFERENCIAS**

1. Short R E, Bellows R A, Staigmiller R B, Berardinelli J G, Custer E E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.* 1990; 68:799.
2. Avila M B, Barrera RA, Delgado Z E, Figueroa F I, Martínez C L. Situación reproductiva del ganado bovino de doble propósito en la región de Tierra Caliente, Guerrero y Michoacán. Décimo Congreso Nacional de Buiatría. 1984: 272.
3. De los Santos S, Taboada J J, Martínez E y Ruiz R. 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. Décima tercera reunión anual del Instituto Nacional de Investigaciones

Pecuarías. México, D.F. 1976:68.

4. Britt J H, Huertasvega E, Ulberg L C. Managing reproduction in dairy cattle: I. Progestogens for control of estrus in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1972; 55:598.
5. Britt J H, Morrow D A, Kittok R J, Seguin B E. Uterine involution, ovarian activity, and fertility after melengestrol acetate and estradiol in early postpartum cows. *J. Dairy Sci.* 1973; 57:89.
6. Acosta B, Tarnavsky G K, Plat T E. Nursing enhances the negative effect of estron on LH release in the cow. *J. Anim. Sci.* 1983; 57:1530.
7. Radfort H M, Nancarrow C D, Mattner P E. Ovarian function in suckling and non suckling beef cows post partum. *J. Reprod. Fert.* 1978; 54:49.
8. Randel R D. Effect of once-daily suckling on postpartum interval and cow-calf performance of first-calf Brahman x Hereford heifers. *J. Anim. Sci.* 1981; 53:755.
9. Smith J F, Payne E, Tervit H R, McCowan L T, Fairclough R, Kilgour R. The effect of suckling upon the endocrine changes associated with anestrus in identical twin dairy cows (Resumen). *J. Reprod. Fert.* 1981; 30 (suppl. 1):241.
10. Rund L A, Leshin L S, Thompson F N, Rampacek G B, Kiser T E. Influence of the ovary and suckling on luteinizing hormone response to naloxone in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* 1989; 67:1527.11. Walters D L, Short R E, Convey E M, Staigmiller R B, Dunn T G, Kaltenbach C C. 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.* 1982; 26:647.
12. Edwards S. The effects of calf removal on pulsatile LH secretion in the postpartum beef cow. *Theriogenology.* 1985; 23:777.
13. Randel R D, Short R E, Bellow R A. Suckling effect on LH and progesterone in beef cows. *J. Anim. Sci.* 1976;42:267.
14. Mattioli M, Conte F, Galeati N, Seren E. Effect of naloxone on plasma concentrations of prolactin and LH in lactating cows. *J. Reprod. Fert.* 1986; 76:167.
15. Trout W E, Malven P V. Quantification of naloxone binding sites in brain from suckled beef cows during the postpartum anestrus and resumption of estrous cycles. *J. Anim. Sci.* 1988; 66:954.
16. Whisnant C S, Kiser T E, Thompson F N, Barb C R. Influence of calf removal on the serum luteinizing hormone response to naloxone in the postpartum beef cow. *J. Anim. Sci.* 1986; 63:561.17. Moss G E, Parfet J R, Marvin C A, Allrich R D and Diekman M A. Pituitary concentrations of gonadotropins and receptors for GnRH in suckled beef cows at various intervals after calving. *J. Anim. Sci.* 1985; 60:285.
18. Nett T M, Cermak D, Braden T, Manns J and Niswender G. Receptors for GnRH and estradiol and pituitary content of gonadotropins in beef cows. I. Changes during the estrous cycle. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1987; 4:123.
19. Bhanot R, Wilkinson M. The inhibitory effect of opiates on gonadotrophin secretion is dependent upon gonadal steroids. *J. Endocr.* 1985;102:133.
20. Nanda A S, Ward W R, Dobson H. Naloxone antagonizes the morphine suppression of the oestradiol-induced surge of luteinizing hormone in dairy cows. *Anim. Rep. Sci.* 1990; 22:289.
21. Van Vugt D A, Sylvestre P W, Ailsworth C A, Meites J. Counteraction of gonadal steroid inhibition of luteinizing hormone release by naloxone. *Neuroendocrinology.* 1982; 34:274.
22. Gregg D W, Moss G E, Hudgens R E, Malven P V. Endogenous opioid modulation of luteinizing hormone and pro-

- lactin secretion in postpartum ewes and cows. *J. Anim. Sci.* 1986; 63:838.
23. Whisnant C S, Kiser T E, Thompson F N, Barb C R. Opioid inhibition of luteinizing hormone secretion during the postpartum period in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 1986; 63:1445.
  24. Whisnant C S, Thompson F N, Kiser T E, Barb C R. Effect of naloxone on serum luteinizing hormone, cortisol and prolactin concentrations in anestrus beef cows. *J. Anim. Sci.* 1986;62:1340.
  25. Run L A, Thompson F N, Byerley D J, Kiser T E. Failure of naloxone to stimulate luteinizing hormone secretion during pregnancy and steroid treatment of ovariectomized beef cows. *Biol. Rep.* 1990; 42:619.
  26. Richards M W, Spitzer J C and Warner M B. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 1986; 62:300.
  27. Whisnant C D, Kiser T E, Thompson F N, Barb C R. Naloxone infusion increases pulsatile luteinizing hormone release in postpartum beef cows. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1986; 3:49.
  28. Jiménez K F, Galina S C, Ramirez B, Navarro-Fierro R. 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.* 1985;9:333.
  29. Niswender D G, Reichert L Jr, Midgley A R Jr, Nalvandov A V. Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. *Endocrinology.* 1969; 44:1166.
  30. Dunlap E S, Kiser E T, Cox M N. Cortisol and luteinizing hormone after adrenocorticotrophic hormone administration to postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* 1981;52:587.
  31. SAS/STAT User's guide, release 6.03 edition. SAS Institute Inc.
  32. Malven P V. Inhibition of pituitary LH release resulting from endogenous opioid peptides. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1986;3:135.
  33. Myers T R, Myers D A, Gregg D W, Moss G E. Endogenous opioid suppression of release of luteinizing hormone during suckling in postpartum anestrous beef cows. *Dom. Anim. Endocr.* 1989; 6:183.
  34. Rosete F JV, Villa-Godoy A, Villagómez A M E y Lagunes L J. Efecto de la naloxona sobre la liberación de la hormona luteinizante y el inicio de la ciclicidad en vacas de doble propósito. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Jalisco. 1993; p.180.
  35. Owens P D, Cicero J T. Development of acute tolerance to the effects of naloxone on the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis in the male rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1981;216:135.
  36. Williams G L, Ray D E. Hormonal and reproductive profiles of early postpartum beef heifers after prolactin suppression of steroid-induced luteal function. *J. Anim. Sci.* 1980; 50:906.
  37. Schallenberger E, Walters D L. Endocrine mechanisms contributing to postpartum anoestrus in dairy and beef cattle. En: Ellendorf, F. and Elsasser, F. (eds). *Endocrine Causes of Seasonal and Lactational Anestrus in Farm Animals* Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands. 1985: 206.
  38. Jacobson W, Kalra S P. Decreases in medio basal hypothalamic and preoptic area opioid ([3H] naloxone) binding are associated with the progesterone-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology.* 1989;124(1)199.
  39. Williams G L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 1990;68:831.
  40. Williams G L, Talavera F, Petersen B J, Kirsch J D, Tilton J E. 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.* 1983;29:362.
  41. Verne-Lavoie, Hank D K, Foster D B, Moody E L. Suckling effect on estrus and blood plasma progesterone in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* 1981;52:802.
  42. Clarke I J, Cummins J T. Direct pituitary effects of estrogen and progesterone on gonadotropin secretion in the ovariectomized ewe. *Neuroendocrinol.* 1984;39:267.
  43. Tamanini C, Crowder M E, Nett T M. Effect of estradiol and progesterone on pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes. *Acta. Endocr.* 1986;111 (Copenh):172.