

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EFFECTO DE NALOXONA SOBRE LA RESPUESTA
HIPOFISIARIA ANTES O DESPUES DE LA
ADMINISTRACION DE GnRH**

POR:

ISIDRO GUAJARDO HERNANDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
PECUARIAS CON ESPECIALIDAD EN
REPRODUCCION ANIMAL**

FEBRERO DE 1998

TD
SF383
.5
.M6
G8
1998
c.1



1080110345

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EFEECTO DE NALOXONA SOBRE LA RESPUESTA
HIPOFISARIA ANTES O DESPUES DE LA
ADMINISTRACION DE GnRH

POR:

ISIDRO GUAJARDO HERNANDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
PECUARIAS CON ESPECIALIDAD EN
REPRODUCCION ANIMAL

FEBRERO DE 1998



TD
SF383
.5
.M.6
68
1998



EFFECTO DE NALOXONA SOBRE LA RESPUESTA HIPOFISIARIA
ANTES O DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH

Aprobación de la Tesis



Ph.D. Javier García Cantú

Asesor principal



Dr. Juan Francisco Villarreal Arredondo

Co-asesor



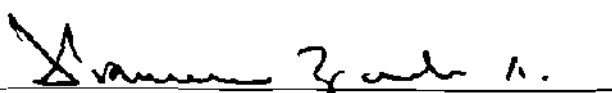
Ph.D. Javier Colin Negrete

Co-asesor



Ph.D. Emilio Olivares Sáenz

Co-asesor



Ph.D. Francisco Zavala García

Subdirector de Estudios de Postgrado de la Facultad de Agronomía,
Universidad Autónoma de Nuevo León

Marín, N.L. Febrero de 1998

Por y para el bien.

Con agradecimiento eterno

**A DIOS,
MI PADRE CELESTIAL**

DEDICATORIA

A Vicky, mi esposa.

A mis hijos:

Nelcy Gisela, Isidro de Jesús y Lourdes Nayely.

A mis padres:

Isidro Guajardo Ramírez y Sanjuana Hernández Lozano.

A mis Hermanos:

**Lenin e Hilda; Argelia Sanjuana y Luis Roberto; Cuauhtémoc y Angélica;
Cuitláhuac y Marena; Indira; Zoraya e Irlanda.**

A mis Suegros:

Tranquilino Ayala Peña y Ma. de la Luz Venegas Colín.

A mis Cuñados:

**Guillermo y Araceli; Alejandro y Silvia; Jorge y Claudia; Alfredo y Yadira;
Tranquilino y Gerardo.**

Rigo q.e.p.d.

A mis Tíos,

**Amparo Hernández de Pérez y Guadalupe Pérez Rocha
y a sus hijos.**

A mis Amigos:

**Inés y Nancy; Mario César; José Luis y Paty; Briseida, y Francisco Ayala.
Jaime q.e.p.d.**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier García Cantú, Asesor principal, por la dirección de este trabajo de tesis y sus enseñanzas en lo referente a la producción caprina.

A los doctores Juan Francisco Villarreal Arredondo, Javier Colín Negrete y Emilio Olivares Sáenz quienes me hicieron sugerencias y comentarios determinantes para lograr mi formación en esta etapa de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Universidad de Guanajuato y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo económico y moral que me dieron, necesario para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Al Centro de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Dra. Angélica Salas Valdés y al MC. Gerardo Perera Marín por su valiosa colaboración en la realización de las determinaciones de hormona luteinizante por medio de radioinmunoanálisis.

A los Dres. Manuel Cabrera Sixtos y José Luis Barrera Guerra, Director y Profesor respectivamente del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Guanajuato por las facilidades y apoyos brindados durante mis estudios.

A los señores Isidro Guajardo Ramírez, Lenin G Guajardo Hernández, Cuauhtémoc Guajardo Hernández y Tranquino Ayala Peña y a sus respectivas familias por el apoyo económico, material y moral brindado durante los momentos difíciles y en todo el tiempo de mis estudios doctorales.

A la Ing. María de los Dolores Aedo por su gran apoyo en la realización del trabajo de campo.

Para aquellos con quienes conviví como estudiante, me apoyaron durante mis estudios y de los cuales mucho he aprendido

Maestros: Ing. Cesáreo Guzman, Dr. Hugo Bernal, Dr Rigoberto González, Dr. Sergio Puente, MC. Alfredo Frayre, Ing. Ma. Elena Contreras, Ing. Raul Hernández.

Compañeros estudiantes y amigos: Francisco Abdiel Ramírez Barrera, Marcela Lorena Martínez Comejo, Javier Reyna Carrera (Chpt), Juanita Aranda Ruiz, Mayela Gallegos, Clemente Gallegos, Mario Madrigal, Adín Nucamendi Alfaro, Manuel Ismael Mata, Juan Carlos Quintero.

En especial a: Juan Manuel Huerta Cavazos, Neftali M Gómez Ruíz y Venancio Orozco Rogero por su gran amistad y apoyo para realizar los trabajos necesarios para la elaboración de esta Tesis.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Isidro Guajardo Hernández

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias Pecuarias con Especialidad en *Reproducción Animal*

Tesis:

Efecto de Naloxona sobre la Respuesta Hipofisiaria antes o después de la Administración de GnRH.

Areas de Estudio:

Ciencias Pecuarias, Zootecnia, Reproducción Animal.

Biografía

Datos Personales:

Nacido el 6 de octubre de 1959 en Monterrey, Nuevo León. Hijo de Sanjuana Hernández Lozano y de Isidro Guajardo Ramírez.

Educación:

- i). Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León como Médico Veterinario y Zootecnista, en junio de 1982.
- ii). Egresado del Centro de Ganadería del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas de Montecillo, México, como Maestro en Ciencias en Ganadería con especialidad en Fisiología de la Reproducción Animal, en marzo de 1990.

Experiencia Profesional:

- i). Instructor del Area Administrativa, Brigadas de Educación para el Desarrollo Agropecuario, Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria; S.E.P 1983.
- ii). Técnico Profesional, Dirección General de Organización de los Productores Agrícolas, Pecuarios y Forestales, S.A.R.H. 1983-1986.
- iii). Coordinador Pecuario, Distrito de Desarrollo Rural 003, Texcoco, Edo. de México, S.A.R.H. 1986-1990.
- iiii). Profesor Investigador de la Universidad de Guanajuato, Instituto de Ciencias Agrícolas. 1989-a la fecha.

Otros:

- i). Miembro del Sistema Nacional de Investigadores como Candidato a Investigador Nacional. 1990-1993.
- ii). Publicaciones Científicas en Memorias de Congresos Nacionales e Internacionales

INDICE

Página

INDICE	vi
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
APENDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
SUMMARY	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVO.....	2
1.2. HIPÓTESIS.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS.....	4
2.1.1. <i>Hipotálamo; características anatómicas y fisiológicas</i>	4
2.1.2. <i>Sistema porta hipotalámico-hipofisiario</i>	5
2.1.3. <i>Hipófisis, características anatómicas y fisiológicas</i>	5
2.2. GnRH.....	7
2.2.1. <i>Sitios de síntesis</i>	7
2.2.2. <i>Características químicas y físicas</i>	8
2.2.3. <i>Control endógeno de la secreción</i>	11
2.2.4. <i>Acciones extrapituitarias del GnRH</i>	23
2.2.5. <i>Mecanismo de acción y receptores para GnRH</i>	23
2.2.6. <i>Usos clínicos del GnRH</i>	24
2.2.7. <i>Efectos biológicos</i>	27
2.3. ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA.....	28
2.3.1. <i>Transmisión de la señal luminica</i>	28
2.3.2. <i>Efectos del fotoperiodo</i>	29
2.3.3. <i>Glándula pineal</i>	32
3. MATERIALES Y METODOS	34
3.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	34
3.2. ANIMALES.....	34
3.3. DESARROLLO DEL EXPERIMENTO.....	35
3.3.1. <i>Tratamientos con Naloxona (1) y solución salina (2) después del GnRH</i>	35
3.3.2. <i>Tratamientos con Naloxona (3) y solución salina (4) antes del GnRH</i>	36
3.3.3. <i>Muestras y análisis hormonales</i>	36
3.4. RADIOINMUNOANÁLISIS PARA LH.....	38
3.5. VARIABLES EN ESTUDIO.....	39
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1. NIVELES BASALES DE LH.....	42
4.2. NIVELES SÉRICOS DE LH ANTES DE INICIAR TRATAMIENTOS.....	42

4.3. RESPUESTA A Nx, CAMBIOS EN AMPLITUD Y FRECUENCIA DE PULSOS	42
4.4. EFECTO DEL GNRH SOBRE CONCENTRACIÓN Y PICO PREOVULATORIO DE LH	46
4.5. RESPUESTA EN LA SECRECIÓN DE LH POR MUESTREO DESPUÉS DE ADMINISTRAR CADA UNO DE LOS COMPUESTOS INCLUIDOS EN LOS TRATAMIENTOS	49
4.5.1. Muestreo 1	49
4.5.2. Muestreo 2	50
4.5.3. Muestreo 3	50
4.5.4. Muestreo 4	51
4.6. RESPUESTA COMPARADA ENTRE GNRH, Nx Y Ss	52
4.7. EFECTO GENERAL DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA SECRECIÓN DE LH	54
4.8. PROMEDIO Y PICO MÁXIMO DE LH (RESPUESTA GENERAL A TRATAMIENTOS)	55
5. DISCUSIÓN	56
5.1. NIVELES BASALES DE LH	57
5.2. NIVELES SÉRICOS DE LH ANTES DE INICIAR LOS TRATAMIENTOS	57
5.3. RESPUESTA A Nx	58
5.4. RESPUESTA A GNRH	60
6. CONCLUSIONES	65
7. LITERATURA CITADA	66
8. APENDICE DE FIGURAS	76

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.- Respuesta de LH (ng/ml) en cabras tratadas con Naloxona y solución salina fisiológica durante el anestro estacional.....	43
Cuadro 2.- Total de pulsos en seis horas y amplitud media (ng/ml) de LH sérica por pulso en cabras en anestro estacional tratadas con Nx y Ss antes o después de GnRH.....	43
Cuadro 3.- Total de pulsos y amplitud (ng/ml) de pulsos observados en seis horas en cabras en anestro estacional que recibieron Nx y un pretratamiento con y sin GnRH.....	43
Cuadro 4.- Total de pulsos y amplitud media (ng/ml) en seis horas en cabras en anestro estacional que sirvieron como testigo y a las cuales solo se administró Ss con o sin tratamiento previo de GnRH.....	45
Cuadro 5.- Características de liberación de LH en respuesta a GnRH administrado solo, con un pretratamiento de Naloxona y después de un muestreo intensivo.....	46
Cuadro 6.- Efecto del pretratamiento con y sin Nx y Ss sobre el total de pulsos de LH en 10 horas de muestreo y amplitud media de LH sérica en respuesta a GnRH por tratamiento en cabras en anestro estacional.....	47
Cuadro 7.- Características de la concentración de LH (ng/ml) en diferentes momentos dentro del muestreo 1 en respuesta a los diferentes tratamientos.....	49
Cuadro 8.- Características de la concentración de LH (ng/ml) en diferentes momentos dentro del muestreo 2 (M2) en respuesta a los tratamientos (T).....	50
Cuadro 9.- Características de la concentración de LH en diferentes momentos dentro del muestreo 3 en respuesta a los diferentes tratamientos.....	51
Cuadro 10.- Características de la concentración de LH (ng/ml) en respuesta a los diferentes tratamientos dentro del muestreo 4.....	51
Cuadro 11.- Comparación de las características de liberación de LH (ng/ml) en respuesta a GnRH (T1 y T2), Nx (T3, primera administración) y Ss (T4, primera administración) aplicados en cabras durante el anestro estacional.....	53
Cuadro 12.- Análisis de la varianza del efecto de GnRH, Naloxona y solución salina fisiológica administrados solos o combinados sobre la secreción de LH.....	55
Cuadro 13.- Efecto general total de los tratamientos sobre diferentes parámetros relacionados con los niveles séricos de LH (ng/ml).....	55

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1.- Concentración promedio de LH en los grupos de cabras tratados con Nx y Ss. con y sin GnRH previo. Los datos utilizados para la elaboración de estas gráficas, se obtuvieron del promedio general de tratamientos, no del promedio de valores por cabra como correspondió a la información presentada en los cuadros y que estuvo sujeta a los análisis estadísticos. Las flechas indican la hora 0, momento de aplicación de compuestos.....	44
Figura 2.- Concentración promedio general de LH conjunta para los grupos de cabras tratados con Nx (T1 y T3) y para los grupos a los que se administro Ss (T2 y T4). Los datos utilizados para la elaboración de estas gráficas, se obtuvieron del promedio general de tratamientos, no del promedio de valores por cabra como correspondió a la información presentada en los cuadros y que estuvo sujeta a los análisis estadísticos. Las flechas indican la hora 0, momento de aplicación de compuestos.....	45
Figura 3.- Concentración promedio de LH en respuesta a GnRH en los diversos grupos de cabras tratados. Los datos utilizados para la elaboración de estas gráficas, se obtuvieron del promedio general de tratamientos, no del promedio de valores por cabra como correspondió a la información presentada en los cuadros y que estuvo sujeta a los análisis estadísticos. Las flechas indican la hora 0, momento de aplicación de compuestos.....	48
Figura 4.- Comparación de respuesta Concentraciones séricas promedio de LH en cabras en anestro estacional a las que se inyectaron uno de tres compuestos. GnRH (T1), Nx (T3), y Ss (T4). La flecha indica la hora 0, momento en que fueron administrados los productos químicos y se inició el muestreo sanguíneo cada 15 minutos por 10 horas.....	54

APENDICE DE FIGURAS

	Página
Figura A1.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró GnRH en la hora 0 (tratamiento 1; primera administración de GnRH; muestreo 1).....	76
Figura A2.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró GnRH en la hora 0 (tratamiento 2; administración de GnRH; muestreo 1).....	77
Figura A3.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró naloxona en la hora 0 (tratamiento 3; primera administración de naloxona; muestreo 1).....	78
Figura A4.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina en la hora 0 (tratamiento 4; primera administración de solución salina; muestreo 1).....	79
Figura A5.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró naloxona en la hora 0 (tratamiento 1; primera administración de naloxona; muestreo 2).....	80
Figura A6.- Perfil de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina fisiológica en la hora 0 (tratamiento 2; primera administración de solución salina muestreo 2).....	81
Figura A7.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró naloxona en la hora 0 (tratamiento 3; segunda administración de naloxona muestreo 2).....	82
Figura A8.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina en la hora 0 (tratamiento 4; segunda administración de solución salina; muestreo 2).....	83
Figura A9.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró naloxona en la hora 0 (tratamiento 1; segunda administración de naloxona; muestreo 3).....	84
Figura A10.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina fisiológica en la hora (tratamiento2; segunda administración de solución salina; muestreo 3)...	85
Figura A11.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró naloxona en la hora 0. (tratamiento 3; tercera administración de naloxona; muestreo 3).....	86
Figura A12.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina en la hora 0 (tratamiento 4; tercera administración de solución salina; muestreo 3).....	87
Figura A13.- Perfiles de LH observados en cada cabra, después de que se administró naloxona en la hora 0 (tratamiento 1; tercera administración de naloxona; muestreo 4).....	88
Figura A14.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina fisiológica (tratamiento 2; tercera administración de solución salina; muestreo 4).....	89
Figura A15.- Perfiles de LH observados en cada cabra, después de que se administró GnRH en la hora 0 (tratamiento 3; administración de GnRH; muestreo 4).....	90
Figura A16.- Perfiles de LH observados en cada cabra, después de que se administró GnRH en la hora 0 (tratamiento 4; administración de GnRH; muestreo 4).....	91

RESUMEN

Isidro Guajardo Hernández

Fecha de Graduación: Febrero de 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Agronomía

Título del Estudio: Efecto de naloxona sobre la respuesta hipofisaria antes o después de la administración de GnRH

Número de páginas: 91

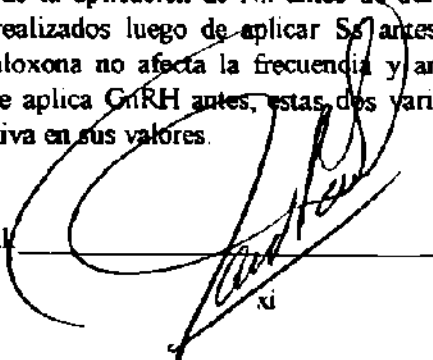
Candidato para el grado de Doctor en Ciencias Pecuarias
con especialidad en Reproducción Animal

Area de Estudio: Ciencias pecuarias. Zootecnia, Reproducción animal.

Propósitos y Métodos de Estudio: El anestro estacional es un factor limitante para la explotación caprina, se caracteriza por la ausencia de actividad reproductiva aparente y reducción en los niveles circulantes de hormona luteinizante (LH) en la mayoría de los animales. La utilización de compuestos químicos como Naloxona (Nx) y hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para revertir ese fenómeno ha tenido resultados encontrados. El presente trabajo se diseñó con el propósito de evaluar el efecto de la aplicación de tres inyecciones (cada una con diferencia de 32 horas) de Naloxona (Nx) sobre la secreción de LH antes o después de la estimulación con GnRH (hora 0) en cabras en anestro estacional. Dieciséis cabras criollas adultas fueron distribuidas en cuatro grupos de tratamientos. En los dos primeros (1 y 2) se estudió la secreción hipofisaria después del reto de GnRH y posteriormente, evaluar la respuesta sobre la misma, de la aplicación de Nx. Los otros dos (3 y 4), permitieron estudiar la respuesta hipofisaria al GnRH y a un pretratamiento con Naloxona. Se realizaron muestreos sanguíneos intensivos después de administrar cada uno de los compuestos aquí empleados. Las variables consideradas para estudio fueron: patrón secretorio, frecuencia y amplitud de pulsos de LH y características del pico preovulatorio de la misma hormona inducido por los tratamientos. Para los análisis estadísticos, las variables discretas fueron evaluadas a través de Pruebas de Contingencia de Ji-Cuadrado, y las variables continuas mediante Análisis de Varianza en un arreglo experimental de Diseño Completamente al Azar.

Contribuciones y Conclusiones: Los resultados demuestran que en cabras en anestro estacional, el GnRH provoca una elevación tipo descarga preovulatoria de LH, misma que posiblemente fue afectada en forma negativa por el estrés ocasionado por los tres muestreos intensivos a los cuales fueron sometidas dentro de los tratamientos 3, donde cada muestreo se realizó después de la aplicación de Nx antes de administrar el GnRH y 4, donde los muestreos fueron realizados luego de aplicar Nx antes del GnRH. Además, es posible concluir que la Naloxona no afecta la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH; sin embargo, cuando se aplica GnRH antes, estas dos variables se alteran y se observa una reducción significativa en sus valores.

Firma del Asesor Principal



SUMMARY

Isidro Guajardo Hernández

Graduation: February, 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Agronomía

Title of the Research Work: **Effect of Naloxone on pituitary response before or after GnRH administration in seasonal anestrus goats**

Number of pages: 91

Candidate to obtain the Doctoral degree in Animal Science. Especiality in Animal Reproduction

Subjects of the research: Animal science. Animal production, Animal reproduction.

Objectives and Methods for the Research Work: Seasonal anestrus is a limiting factor for goat industry and have in most cases characteristic features that are apparently absence of reproductive activity and narrow blood serum LH profile. The use of chemical compounds such as Naloxone (Nx) and gonadotrophin releasing hormone (GnRH) to revert this physiological state have controversial results. The objective of this work was to evaluate the effect on LH secretion of three Nx injections (each one with 32 hours apart) pre or post-LH release induced by means GnRH injection (hour 0) in seasonal anestrus goats. Sixteen adult crossbred goats were randomly assigned to four treatment groups. In treatments 1 and 2, LH pituitary secretion after GnRH challenge was studied. Later Nx response was evaluated. Treatments 3 and 4, allowed to study GnRH pituitary response with a Nx pretreatment. Intensive blood sampling was accomplished after treatment applications. Variables considered for this work were: LH releasing pattern, LH pulses frequency and amplitude and characteristics of induced LH surge. Statistical analyses were performed using Chi-square for discrete variables and analyses of variance for continuous variables in a completely randomized design.

Contributions and Conclusions: The results in this study showed that GnRH evoke a like preovulatory LH surge. LH surge in treatments 3 and 4, probably was affected negatively by stress, provoked by intensive sampling periods, immediately after chemical compounds administration in treatments that were not a preovulatory kind. Moreover, it is possible to conclude that Naloxone did not change frequency and amplitude of LH pulses. Nevertheless, GnRH before Nx suppressed these variables.

Main advisor signature: _____



1. INTRODUCCIÓN

La administración de GnRH a ovejas durante el anestro estacional como tratamiento en diferentes dosis y formas, generalmente induce una respuesta hipofisiaria. Cuando se aplica en inyecciones múltiples, simulando la forma pulsátil en que se libera del hipotálamo (Yen, 1990), y se usan dosis bajas que van desde 75 a 500 ng, puede inducir ovulación al provocar picos preovulatorios dentro de las 48 horas siguientes al inicio de los tratamientos (McLeod et al., 1982 a,b). Sin embargo, en una gran proporción de los animales tratados el cuerpo lúteo formado desarrolla vida media corta produciendo solamente un aumento transitorio en la concentración de progesterona, antes de sucumbir prematuramente sobre el día cuatro (Southey et al., 1988).

También se observan deficiencias en el cuerpo lúteo formado cuando se administran 150 ó 300 microgramos de GnRH en una sola inyección a ovejas en anestro estacional. En este caso, la descarga preovulatoria de LH tiene aproximadamente el 25 % de la magnitud en tiempo de la que ocurre en forma espontánea durante el ciclo estrual (Crighton et al., 1975). Generalmente esos picos preovulatorios de LH inducidos provocan ovulación entre 21 y 26 horas más tarde (Cumming et al., 1973).

El patrón y la cantidad de GnRH secretada pueden ser determinados por un sistema integrado que involucre sustancias del tipo opioide y catecolaminas. Estudios previos han demostrado que la noradrenalina y la dopamina inhiben la liberación de LH en ovejas en anestro. Havem et al. (1991), concluyen que un sistema noradrenalina neural opera en el área preóptica y que un sistema dopamina actúa a nivel del hipotálamo medio basal para suprimir la frecuencia de pulsos de GnRH durante el anestro de ovejas con los ovarios intactos.

Se ha establecido que péptidos endógenos con actividad opioide modulan la secreción de gonadotropinas en diversas especies animales ejerciendo un efecto esencialmente supresivo. Por ejemplo, la administración de morfina (un opioide exógeno) a ratas hembras, disminuye las concentraciones séricas de LH (Lincoln et al., 1985); mientras que, si se inyecta un antagonista de los opioides como la Naloxona (Nx), la secreción de LH se incrementa. Al igual que la morfina, los péptidos opioides endógenos o sus análogos opiáceos ejercen una influencia depresiva en la secreción de gonadotropinas, principalmente de LH.

Se piensa que este efecto es el resultado de la inhibición de la liberación de GnRH a nivel hipotalámico o cerebral alto (Rasmussen et al., 1983; Cosgrove et al., 1993). Aunque también se ha demostrado que la inhibición puede darse a nivel hipófisis. Sin embargo, en forma directa la evidencia no se ha presentado in vivo y ella fue obtenida de células pituitarias cultivadas in vitro (Barb et al., 1990); Sin embargo, las altas concentraciones de β -endorfina en la sangre portal hipofiseal de ratas (Sarkar y Yen, 1985) y ovejas (Gordon et al., 1987) indican que los opioides pueden actuar directamente sobre los gonadotrófos.

La acción directa sobre la hipófisis presumiblemente depende de receptores dentro de ella; sin embargo, no se han encontrado receptores para opioides en la hipófisis anterior de ovejas.

Cosgrove et al. (1993), en una revisión reportan una gran diversidad de trabajos que estudiaron los efectos de Nx sobre diferentes especies animales y estados fisiológicos en la mayoría de los cuales y con la mediación necesaria de progesterona combinada con estradiol (endógenas o exógenas) se estimula la síntesis y secreción en niveles óptimos de LH (Brooks et al., 1986).

Durante la época de anestro, se pierde la ciclicidad por la falta de progesterona (Legan et al., 1977), necesaria para que la respuesta a Nx sea de igual magnitud a la observada durante las fases lútea o folicular tardía. En ovejas intactas durante el anestro estacional, la Nx no afecta la secreción de LH (Brooks et al., 1986). En cabras, existen reportes de que la administración de Nx al final de un tratamiento con progestágenos para inducir la ovulación en anestro, permite sincronizar y mejorar las características del pico preovulatorio; además de aumentar la tasa ovulatoria reflejada en el número de crías obtenidas. Durante el anestro también es posible estimular la secreción de LH tratando las cabras con dosis de Nx entre 6 y 20 veces más altas que la dosis recomendada para humanos.

1.1. Objetivo

Con base en lo anterior este trabajo plantea el siguiente objetivo: Evaluar el efecto de la Naloxona sobre la secreción de LH antes o después de la estimulación con GnRH en cabras en anestro estacional.

1.2. Hipótesis

La hipótesis a comprobar es la siguiente: la administración de Naloxona (Nx) antes o después de administrar GnRH a cabras en anestro estacional, mejora (aumenta) la secreción de LH.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Eje hipotálamo-hipófisis

2.1.1. Hipotálamo; características anatómicas y fisiológicas

El hipotálamo, se encuentra en el cerebro, por debajo del tálamo (de ahí su nombre), ocupa una porción del diencefalo que forma el piso y parte de la pared lateral del tercer ventrículo. comprende el quiasma óptico, los cuerpos mamilares, el tuber cinereum y el infundíbulo. El tuber cinereum es la parte del piso del tercer ventrículo que se extiende desde abajo hacia el infundíbulo. La eminencia media está integrada por la parte inferior del tuber cinereum la cual contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos que drenan hacia el tallo pituitario y que luego desembocan para descargar en un plexo secundario en la hipófisis anterior (Racadot, 1990; Hadley, 1996).

El hipotálamo, contiene dos categorías de neuronas. Las primeras incluyen neuronas similares a las de otros centros nerviosos, que realizan funciones análogas tales como recepción, integración, conducción y transmisión de mensajes por mecanismos característicos del sistema nervioso. El otro grupo es diferente. Aunque las neuronas tienen las mismas propiedades generales con respecto a la recepción y conducción de mensajes, también funcionan como células endocrinas, las que más que pequeños neurotransmisores, sintetizan péptidos y sus axones terminan en una red capilar, con lo que sus productos secretorios son liberados directamente hacia la sangre (Racadot, 1990).

Dentro del hipotálamo existen grupos de neuronas conocidos como núcleos hipotalámicos que se caracterizan por estar simétricamente localizados alrededor del tercer ventrículo. Entre ellos se encuentran: los núcleos dorsomedial, posterior, ventromedial, arcuato, supraquiasmático, supraóptico, anterior y paraventricular (Racadot, 1990).

Los núcleos supraóptico y paraventricular se componen de cuerpos celulares con axones extendidos hacia la eminencia media que finalizan en la neurohipófisis hacia donde secretan oxitocina y vasopresina (Lincoln et al., 1985; Racadot, 1990; Hadley, 1996). La parte endócrina del hipotálamo se encuentra en el sistema neurosecretorio parvocelular que contiene neuronas secretorias de factores hipofisiotrópicos que regulan la función de la pituitaria anterior. Los centros anatómico-fisiológicos que secretan GnRH y que controlan la secreción de gonadotropinas son de dos tipos, los que controlan la secreción preovulatoria de LH y FSH, se encuentran en el

área hipotalámica anterior, los núcleos preópticos y los núcleos supraquiasmáticos, y los que controlan la secreción tónica de LH y FSH, se localizan en el núcleo ventromedial, el núcleo arcuato y en la eminencia media (Linclon et al., 1985; Racadot, 1990; Hadley, 1996).

El hipotálamo regula diversos procesos automáticos vitales como actividades viscerales, equilibrio hídrico, temperatura corporal (Salvat, 1980), apetito, frecuencia cardíaca, temperatura, comportamiento sexual y actividad neuroendocrina; capta señales fisiológicas de todo el cuerpo, como los mensajes del sistema nervioso central, estado metabólico, actividad funcional de glándulas blanco y ambiente interno. Actúa como un centro de procesamiento e integración de la información recibida y luego de que la traduce, reacciona produciendo hormonas liberadoras específicas. En lo referente a la regulación de la actividad reproductiva la respuesta se da a través de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), e indirectamente por medio de las siguientes hormonas o factores: hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH), hormona inhibidora de hormona del crecimiento (GHIH; somatostatina), hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de corticotropina (CRH) y el factor inhibidor de prolactina (PIF); también secreta oxitocina y vasopresina que se almacenan en la neurohipófisis (Hafez, 1996).

El hipotálamo puede controlar el comportamiento sexual de varias formas: fijación de esteroides sexuales e inducción lenta de la motivación sexual; control directo de la actividad sexual, y satisfacción sexual.

2.1.2. Sistema porta hipotalámico-hipofisiario

Mediante un complicado sistema de circuito cerrado de comunicación sanguínea llamado sistema porta hipotalámico-hipofiseal se constituye el único medio a través del cual los mensajes neurohormonales hipotalámicos son transferidos a la hipófisis anterior; esta serie de vasos anastomozados, permite, en algunas áreas, la circulación sanguínea fisiológica en reversa que permite al hipotálamo recibir mensajes directamente de la pituitaria (Racadot, 1990).

2.1.3. Hipófisis, características anatómicas y fisiológicas

La hipófisis, cuyo origen durante el desarrollo embrionario es a partir de tejido ectodermal y de la faringe (Bolsa de Rathke), es un órgano glandular, pequeño y rojizo, situado en la silla turca y pendiente del cerebro por un pedículo o tallo pituitario. Consta de dos lóbulos: el anterior, prehipófisis, adenohipófisis, pars anterior o distalis de textura glandular, y el posterior,

neurohipófisis, pars nervosa o cuerpo infundibular, de textura nerviosa; entre ambas se encuentran la pars intermedia, de textura epitelial y el lóbulo o pars tuberalis que en el humano adulto están fusionadas a la hipófisis anterior, ya que no existe un límite aparente entre estas estructuras (Racadot, 1990).

La hipófisis es una glándula de secreción interna, que produce numerosas e importantes hormonas. Las de la pars anterior regulan el crecimiento de todos los tejidos orgánicos, dirigen el desarrollo y la función de la tiroides, corteza suprarrenal, gónadas y probablemente las paratiroides e inducen la lactación. Las del lóbulo posterior afectan la presión sanguínea, la contractibilidad de los músculos lisos y la función renal. La pars intermedia elabora una hormona de dispersión de los melanóforos (hormona estimulante de los melanocitos, MSH) cuya función principal es controlar la pigmentación con melanina en la piel de muchas especies de vertebrados (Hadley, 1996).

El lóbulo anterior con aproximadamente 400 mg es la porción más grande de la pituitaria. Está formado por cordones anastomosados limitados por una lámina basal y separados por capilares y espacio perivascular con cantidades variables de tejido conectivo. Esos cordones generalmente se componen de varias capas celulares con diferentes tipos de células existiendo en su interior. Algunas están situadas en la periferia donde hay una gran área de contacto con la lámina basal. Otras, dentro del cordón, se comunican solamente con la periferia mediante extensiones de diferente tamaño (Racadot, 1990). No existe una inervación funcional significativa de la adenohipófisis desde el hipotálamo o la neurohipófisis. En su lugar, una ruta humoral vía sistema porta hipotalámico-hipofiseal provee las señales necesarias para la comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis (McCann, 1988).

Las características morfológicas y de tinción de las estructuras citoplásmicas diferencian a las células pituitarias. Usando el microscopio óptico, es posible distinguir diferentes tipos de células y que dependiendo de la afinidad de su citoplasma a tinciones ácidas o básicas pueden ser: acidófilas, basófilas y cromóforas (McCann, 1988). Usando la microscopía electrónica se pueden hacer subdivisiones de acuerdo al tamaño y número de gránulos secretorios, lo cual caracteriza funcionalmente los diferentes tipos de células. Con esta base se tiene que células somatotrópicas, secretan hormona del crecimiento (GH); células lactotrópicas, secretan prolactina (PRL); células adrenocorticotrópicas, sintetizan hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y sus péptidos relacionados, células tirotrópicas, secretan hormona estimulante de la tiroides (TSH), y células gonadotrópicas, que sintetizan y liberan a la circulación sanguínea hormona luteinizante (LH) y

hormona foliculo estimulante (FSH). Existen otro tipo de células conocidas como células foliculares, las cuales aparentemente no producen alguna hormona pero son capaces de realizar fagocitosis y pueden tener una función importante en el intercambio de iones. En el caso de células gonadotrópicas la mayoría produce y libera ambas gonadotropinas, FSH y LH, mientras que solo un pequeño número libera solo alguna de las dos. Para las células somatotrópicas y lactotrópicas en la pituitaria adulta normal, se ha observado que algunas son inmunoreactivas para ambas hormonas (McCann, 1988; Racadot, 1990). La remoción de la hipófisis ocasiona atrofia de la corteza adrenal, de la tiroides y de las gónadas (Hafez, 1996).

El ingreso de hormonas hacia y la liberación de sustancias desde el sistema vascular, son favorecidos por la presencia de capilares fenestrados dentro de la glándula. Ya que la suplementación vascular es principalmente de naturaleza portal, la presión de los capilares en la glándula es muy baja mientras que la permeabilidad es alta. La situación puede ser análoga a los sinusoides hepáticos con alta permeabilidad no solo a las hormonas proteicas pituitarias sino que también a las proteínas plasmáticas. De ahí que, un balance entre la presión hidrostática y la presión coloide osmótica tienda a producir ultrafiltración y dar lugar a que el consumo de líquido extracelular se alcance en presiones sinusoidales muy bajas (McCann, 1988).

2.2. GnRH

2.2.1. Sitios de síntesis

La producción intracerebral de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se localiza en dos poblaciones de neuronas. Las primeras tienen sus cuerpos celulares en el área preóptica media, inmediatamente por encima del quiasma óptico y sus axones se proyectan caudalmente para terminar en la eminencia media. La segunda población de neuronas secretoras de GnRH tiene sus cuerpos celulares localizados en vecindad con el núcleo infundibular y sus axones relativamente cortos se proyectan a la eminencia media, donde los axones terminales finalizan en yuxtaposición a los capilares portales hipofisarios (McCann, 1988).

Las rutas neurosecretorias del GnRH incluyen las neuronas del grupo medio basal que alcanzan la red primaria de capilares del sistema portal hacia el cual la neurohormona es liberada y llevada a la hipófisis anterior. También hay un grupo de neuronas productoras de GnRH en el área preóptica terminal, las cuales alcanzan los capilares en la lámina terminal y posiblemente por

conducto de la arteria hipofisiaria superior, y se conectan al sistema porta hipotalámico-hipofiseal. Su significado funcional no se conoce (Racadot, 1990)

El GnRH, es contenido exclusivamente en gránulos secretorios los cuales tienen un diámetro aproximado de 75 a 95 nm. Están presentes en las terminales nerviosas cerca de la membrana basal de capilares fenestrados del sistema portal: El GnRH, es almacenado en las terminales nerviosas en la región externa de la eminencia media antes de ser liberado por extrusión del contenido de los gránulos secretorios hacia el sistema portal. También se han identificado algunos pericarions dispersos en la zona que se extiende desde el núcleo preóptico hasta la porción caudal del tuber infundíbulo. El GnRH, también ha sido localizado en terminales nerviosas del órgano vascular de la lámina terminal y en las células ependimales y subependimales del órgano paraventricular, tales como el órgano fomico, el órgano subcomisural y el centro postremo. El significado del GnRH en el órgano paraventricular no es claro. El GnRH, también es sintetizado en áreas cerebrales extrahipotalámicas y en tejidos gonadales, sugiriendo con esto una complejidad en las funciones probablemente parácrinas y centrales del péptido (Labrie, 1990)

2.2.2. Características químicas y físicas

El LHRF o GnRF (factor liberador de LH o gonadotropinas) fue descubierto en 1960 pero no fue sino hasta 1971 cuando se purificó en primera instancia a partir de hipotálamos de cerdo y en el mismo año, también fue confirmado en la oveja. Se demostró que en su estructura química era un decapeptido. Con ese hecho cambió su nombre por el de hormona liberadora de hormona luteinizante o de gonadotropinas (LHRH o GnRH). Estos nombres se deben a la controversia existente en el sentido de que si es un factor u hormona liberadora para cada gonadotropina (LH y FSH), o una para las dos, ya que el GnRH estimula la liberación de ambas. Existe poca evidencia (pero existe) que indica la liberación de FSH y LH por separado; sin embargo, esta condición puede ocurrir después de lesiones hipotalámicas, estimulaciones exógenas y en una variedad de estados fisiológicos, esto permite suponer la existencia de un factor liberador para FSH (McCann, 1988).

El GnRH maduro es un péptido de 10 aminoácidos con amino y carboxilo terminales bloqueados, surge por desdoblamiento de un péptido precursor de 92 aminoácidos.

Piro-Glu-Hist-Trp-Ser-Tir-Gli-Leu-Arg-Pro-Gli-NH₂

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

El DNAc del gen precursor del GnRH, ha sido clonado. Este encoda el decapeptido precedido por una secuencia de señal de 23 aminoácidos seguido por el triplete Gly-Lys-Arg, necesario para el procesamiento enzimático y la amidación c-terminal del GnRH. Los siguientes 56 aminoácidos forman la porción c-terminal del precursor y constituyen el péptido asociado al GnRH (GAP por sus siglas en Inglés), al cual se le ha descubierto una función inhibitoria de la secreción de prolactina. La inmunización activa contra el GAP en conejos, provocó un aumento en la secreción de prolactina. Además, el GAP estimula la secreción de gonadotropinas en cultivos celulares de pituitaria de ratas. Esta propiedad también se ha demostrado por un péptido sintético que contiene los primeros 13 aminoácidos de la secuencia del GAP. Este péptido no interactúa con receptores pituitarios para GnRH, y de ahí que la prohormona del GnRH contiene al menos dos péptidos distintos capaces de estimular la liberación de gonadotropinas. Los 13 aminoácidos del péptido no afectan la secreción de TSH o PRL. La misma prohormona es sintetizada en áreas cerebrales extrahipotalámicas y tejidos gonadales sugiriendo una complejidad en las funciones parácrinas y centrales de los péptidos hormonales (Labrie, 1990).

El GnRH tiene una vida media plasmática de tres a seis minutos (Ascoli y Segaloff, 1996). Al mismo tiempo que se han ido implementando diferentes usos terapéuticos para el GnRH, se han ido desarrollando antagonistas y agonistas análogos superactivos del GnRH. Con la identificación química del GnRH y su síntesis, una nueva y poderosa droga llegó a estar disponible para el manejo reproductivo y la medicina de la producción de ganado. Las alteraciones en la estructura química de la molécula nativa de GnRH han llevado a la síntesis de agonistas potentes de GnRH. Generalmente las sustituciones involucran el reemplazo de las moléculas de glicina (Gly) en las posiciones 6 y 10, con un D-aminoácido en la posición 6 y/o un grupo N-etilamida en la posición 10. Existen análogos y agonistas del GnRH disponibles comercialmente: Buserelin¹ (D-Serina en la posición 6 y etilamida en la posición 10), GnRH² nativo (Tetrahidrato-diacetato de gonadorelin), GnRH³ nativo (Hidroclorido de gonadorelin), y Acetato de fertirelina⁴ (Etilamida en la posición 10; Thatcher et al., 1993).

El diseño de los agonistas de GnRH se realiza con los propósitos de reducir sus tasas de depuración *in vivo* y aumentar su potencia, por lo cual se busca la estabilización de la molécula contra el ataque enzimático, el aumento en la unión de las proteínas plasmáticas y membranas,

¹ Receptal, Hoechst AG, Frankfurt, Alemania.

² Cystorelin, Sanofi Animal Health, Overland Park, KS.

³ Factrel, Fort Dodge Laboratories, Fort Dodge, IA.

⁴ Ovalyse, Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón.

además, de incrementar la afinidad por los receptores naturales para el GnRH (Conn y Crowley, 1991).

Los cambios por los D-aminoácidos de la posición 6 y por la dietilamida en la posición 10, permiten grandes diferencias en la potencia biológica observada en la respuesta hipofiseal a través de la secreción de las gonadotropinas LH y FSH (Chenault et al., 1990). Los reportes indican que en comparación con el gonadorelin, el acetato de fertirelina fue de cuatro a diez veces más potente, mientras que el Buserelin, alcanzó hasta 50 veces más potencia. Los efectos anteriores fueron medidos en secreción de LH y FSH durante la fase lútea de bovinos (Chenault et al., 1990). Con base en los efectos causados por una dosis moderada seguida de una dosis baja de esos productos, los gonadotrofos de la pituitaria llegaron a ser aparentemente refractarios al GnRH, arriba de 48 horas después de la inyección de dosis más grandes o iguales a 50 µg de acetato de fertirelina, 500 µg de gonadorelina y 10 µg de Buserelina. Una inyección intramuscular (im) simple de GnRH o sus agonistas, da lugar a un aumento predecible en la liberación tanto de LH como de FSH en la circulación periférica en un periodo superior a tres horas (Thatcher et al., 1993).

Los análogos superactivos del GnRH se desarrollaron primero con el propósito de mejorar el control de la fertilidad. Existen varios sintéticos de GnRH (Labrie, 1990, Ascoli y Segaloff, 1996), como ejemplo se mencionan los siguientes:

GnRH nativo										Potencia Biológica	
Piro-Glu	Hist	Trp	Ser	Tir	Gli	Leu	Arg	Pro	Gli-NH ₂	1	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Análogo											
D-Leu										NH ₂	3
										N-Etil-NH ₂	4
D-Ala										NH ₂	4
D-Ala										N-Etil-NH ₂	14
D-Ser										N-Etil-NH ₂	20
D-Leu										Etil-NH ₂	30
D-Phe										Etil-NH ₂	115
D-Nal										N-Etil-NH ₂	
D-Trp										N-Etil-NH ₂	144
D-His										N-Etil-NH ₂	210

Aunque esos péptidos generalmente se administran por vía subcutánea, la fuerte actividad de algunos de esos compuestos permiten la administración intranasal.

En contraste con los análogos agonistas, los antagonistas del GnRH han sido más difíciles de diseñar. Gran parte de los antagonistas de primera generación no resultaron útiles en clínica

porque también desencadenaban liberación de histamina y reacciones anafilácticas en animales, problema que han venido a evitar los nuevos antagonistas (Karten y Rivier, 1986 citados por Ascoli y Segaloff, 1996). El desarrollo de compuestos antagónicos, tiene su uso potencial en el campo de la anticoncepción y enfermedades hormonales. El uso experimental de antagonistas, en la actualidad tiende a confirmar la acción en ciertos niveles de las hormonas a las cuales contrarresta (Labrie, 1990).

2.2.3. Control endógeno de la secreción

Una diversidad de transmisores y neuropeptidos participan en el control de la secreción de gonadotropinas. A nivel hipotalámico, la regulación de la secreción de GnRH involucra noradrenalina, ácido γ -amino-butírico (GABA), glutamato, angiotensina II, neuropeptido Y, neurotensina y 5-hidroxitriptamina, así como también interleucinas 1 y 2. Las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas son estimuladoras de la liberación de GnRH desde las neuronas parvocelulares. La secreción de dopamina por sí misma es inhibida por las neuronas encefalínérgicas. Por lo tanto una encefalina, tal como la met-enkefalina actúa indirectamente en el control del GnRH y en la de LH y FSH. Los esteroides ováricos pueden ejercer efectos ya sea positivos o negativos sobre la secreción de LH y FSH al aumentar o disminuir la sensibilidad de las células de la hipófisis al GnRH (Kordon y Drouva, 1992).

2.2.3.1. Neurotransmisores

Entre los principales neurotransmisores secretados por el hipotálamo o la hipófisis se pueden hacer tres grupos: uno de aminoácidos, otro de aminas biogénicas y uno más, que comprende los neuropeptidos.

Dentro del grupo de aminoácidos, están el GABA, la glicina, los ácidos glutámico y aspártico, la prolina y la taurina. En el grupo de aminas se incluyen acetilcolina, dopamina, norepinefrina, epinefrina, serotonina e histamina. Entre los neuropeptidos están: angiotensina II, bombesina, carnosina, colesistocina, dinorfina, β -endorfina, leu-enkefalina, met-enkefalina, gastrina, GnRH, neuromedina K, neurotensina, neuropeptido Y, oxitocina, prolactina, somatomedina, sustancia K, sustancia P, TRH (hormona liberadora de tirotropina), VIP (peptido intestinal vasoactivo) y vasopresina (Glowinski, 1990).

La interacción de los neurotransmisores con sus receptores resulta en la apertura de canales iónicos o la formación (o movilización) de segundos mensajeros. Varios canales de iones quimodependientes están íntimamente asociados con, o constituidos por proteínas receptoras. Se han identificado varias moléculas consideradas como segundos mensajeros activadas después de que las hormonas entran en acción a nivel de la membrana celular. Entre ellas se pueden mencionar monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), monofosfato de guanidina (GMPc), diacilglicerol y el sistema calcio-calmodulina. Esos segundos mensajeros actúan específicamente sobre ciertos grupos neuronales y participan en la fosforilación de diversas proteínas teniendo como resultado una función biológica que en su momento puede ser importante como la formación de receptores, canales iónicos, enzimas involucradas en la síntesis y liberación de mediadores químicos, citoesqueletos proteicos, proteínas involucradas en la expresión de genes o inhibidores endógenos de la fosfatasa (Glowinski, 1990). Los estudios más extensos para establecer el efecto de los neurotransmisores sobre los factores hipotálamicos han sido con experimentos donde se contempla la secreción de gonadotropinas.

2.2.3.2. Aminas biogénicas

Adrenalina y noradrenalina

Las neuronas que producen los factores liberadores están en contacto sináptico con neuronas que producen neurotransmisores. El hipotálamo está ricamente constituido por fibras nerviosas monoaminérgicas. Hay una fuerte entrada de fibras noradrenérgicas desde los cuerpos celulares de las neuronas localizadas en el tallo cerebral. La distribución de esas neuronas ha sido mapeada por histoquímica fluorescente. Existen también neuronas posiblemente originadas en el tallo cerebral que contienen epinefrina y cuyos axones finalizan y entran en contacto con células del hipotálamo (McCann, 1988).

Al parecer hay sinápsis noradrenérgicas excitatorias que median no solamente la liberación preovulatoria de GnRH, sino que también incrementan la liberación del decapeptido después de la castración. En el caso de la liberación preovulatoria de GnRH, las sinápsis pueden estar en la región hipotálamica preóptica anterior, mientras que en el caso del incremento observado luego de la castración, las sinápsis pueden estar en la otra población de neuronas de GnRH, localizadas en el núcleo arcuato (McCann, 1988). Las neuronas liberan transmisores que actúan en los receptores presinápticos para incrementar o disminuir la liberación de norepinefrina. En ratas, existe evidencia abundante que la liberación de norepinefrina en el área preóptica media, desde las

terminaciones de las rutas noradrenérgicas ascendentes es necesaria para que ocurra la descarga de GnRH (Ramírez et al., 1984)

Steele y Ganong (1986), proponen que en los sistemas de control noradrenérgicos de la región preóptica media, puede estar involucrada la angiotensina II intraventricular, ya que cuando fue detectada en esa zona, provocó un aumento en la liberación de norepinefrina que a su vez disparó la liberación de GnRH y consecuentemente la de una descarga tipo preovulatorio de LH. Este hecho se observó en ratas hembras durante el proestro. Los mismos autores (Steele y Ganong, 1986), destacan el papel de la angiotensina debido a que al administrar saralasin, una droga bloqueadora de los receptores de angiotensina II, o enalaprilat un inhibidor de la enzima que convierte la angiotensina, se bloquea la descarga espontánea de LH y la ovulación. Además, consideran que una acción bloqueadora del efecto estimulador de la angiotensina II se observa después de administrar drogas antiadrenérgicas e inducir una depleción de catecolaminas

Dopamina

Originalmente, la dopamina se consideraba como precursora de la noradrenalina; sin embargo, pruebas efectuadas en distintas regiones del sistema nervioso central (SNC) revelaron una notable diferencia en las distribuciones de dopamina y noradrenalina. De hecho, más del 50 % del contenido del SNC de catecolaminas es dopamina. En el roedor, existen tres clases morfológicas de neuronas dopaminérgicas: 1) de proyección ultracorta, 2) de longitud intermedia y 3) de proyección larga. Todas están implicadas en el proceso reproductivo, pero por su localización, las de longitud intermedia están directamente relacionadas con el control de la actividad reproductiva, principalmente por la cercanía anatómica que guardan con la eminencia media dentro del hipotálamo tuberoso ventral y con el lóbulo intermedio de la hipófisis. Están además, relacionadas con neuronas insertohipotalámicas que conectan a las porciones dorsal y posterior del hipotálamo con los núcleos septales laterales, y pequeñas series de neuronas dentro del perímetro del núcleo motor dorsal del vago, el núcleo del haz solitario y la sustancia gris periductal (Bloom, 1996).

La dopamina al parecer tiene efectos estimuladores y también inhibitorios sobre la LH. La evidencia es confusa, y de llegar a tener algo que ver, en la actualidad su papel parece que no es tan importante (McCann, 1988). Al momento se han identificado dos tipos principales de receptores para dopamina: D1 y D2. Farmacológicamente, ambos son distintos, teniendo diferente afinidad por los compuestos ya sea endógenos o exógenos. Los receptores D1 incluyen los

subtipos D1 y D5 y su acción primordial se centra en la activación de la adenil-ciclasa, mientras que los receptores tipo D2 con los subtipos D2 cortos, D2 largos, D3 y D4, todos se acoplan con múltiples sistemas efectores. Los subtipos D2 largos y cortos actúan inhibiendo la adenil-ciclasa, suprimiendo las corrientes iónicas de calcio (Ca^{2+}) y activando las de potasio (K^{+}). No se han definido los sistemas efectores a los que se acoplan los receptores D3 y D4 (Bloom, 1996).

La 5-hidroxitriptamina, también llamada serotonina, cuando se encuentra en el suero sanguíneo o enteramina cuando se encuentra en el intestino, forma parte de los compuestos intermediarios para la elaboración de melatonina (Baulieu 1990; Bloom, 1996)). No se encontró explicación sobre su acción directa sobre la secreción de GnRH y por consecuencia sobre la secreción de las gonadotropinas. Probablemente su efecto sea indirecto y relacionado con su categoría de precursor de la melatonina. Cuando se inyecta serotonina exógena en el tercer ventrículo en castrados, puede inhibir la liberación de LH. Esto indica que es un transmisor inhibitorio, pero otra evidencia sugiere que puede facilitar la liberación preovulatoria de LH.

La histamina puede estimular la liberación de LH después de la inyección intraventricular de grandes dosis, pero no es claro si esto tiene significancia fisiológica (McCann, 1988). Existe evidencia considerable para establecer una relación colinérgica en la liberación de gonadotropinas, ya que microinyecciones sistemáticas de atropina al tercer ventrículo o implantadas dentro del hipotálamo, pueden bloquear la liberación de gonadotropinas (McCann, 1988).

Existe una disminución en la secreción de gonadotropinas en respuesta al estrés, el cual está ampliamente relacionado con la liberación en el momento, de epinefrina y norepinefrina. Sin embargo, las sustancias que reprimen la síntesis y liberación de las gonadotropinas son los péptidos opioides. Esto se comprobó al administrar experimentalmente antagonistas de las endorfinas (Kolb, 1989).

2.2.3.3. Péptidos opioides endógenos (POE)

Desde hace cientos de años, con el empleo del opio en animales y hombres, se sabe que este tipo de sustancias actúan como analgésicos. En 1806, se introdujo la morfina para el tratamiento del dolor, pero tanto ésta, como el opio tenían el inconveniente de que producían adicción y depresión del sistema respiratorio.

Los POE, fueron inicialmente descritos por Hughes et al. (1975), citado por Flores et al. (1995), con base en trabajos previos como el de Collier y Roy (1974), reportaron que la morfina

inhibió el aumento en el AMPc producido por las prostaglandinas en el cerebro y la Naloxona, un inhibidor competitivo de la morfina, bloqueó ese efecto.

Con el descubrimiento de los receptores opiáceos, se abrió una nueva era en el estudio de las vías y fisiología de la analgesia. A partir de los años ochenta, se inició un nuevo e importante campo de la neurobiología, el estudio de los efectos de los opioides y de péptidos endógenos de secreción y acción similar a opioides en el sistema nervioso. Aunque el opio ha sido usado por siglos, recientemente se demostró la unión específica de morfina marcada con radioactividad a receptores en el SNC. Esta demostración llevó a investigar la existencia de sustancias endógenas capaces de unirse a los mismos receptores, encontrándose dos pentapeptidos que no solo se unían a los receptores inhibiendo la unión de la morfina a las células del SNC, sino que tenían los efectos biológicos similares a los de la morfina. Ellos se conocen como Met-enkefalina (H-Tir-Gli-Gli-Fen-Met-OH) y Leu-enkefalina (H-Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-OH).

Las endorfinas (Cheema et al., 1991; Ciarcia et al., 1994; Kuros et al., 1980); dinorfinas (Przewlocki et al 1982), y enkefalinas (Ruda, 1982), que son diferentes tipos de péptidos opioides endógenos han sido involucrados en varios sistemas de control endócrino (Byerley et al., 1992) y del comportamiento (Cheema et al., 1991) en una gran variedad de especies animales, entre las cuales se encuentran ovinos, caprinos, equinos, porcinos, bovinos, venados, roedores (Byerley et al., 1992; Aurich et al., 1994) y humanos (Delitala et al., 1994)

Por el momento, existen tres familias importantes de opiáceos que derivan de los siguientes precursores: la proopiomelanocortina (POMC) que origina ACTH, β -endorfina y tres copias de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH); la proencefalina que contiene una molécula de Leu y 6 de Met-enkefalina, y prodinorfina a partir de la cual se sintetizan las α y β dinorfina y las α y β neodinorfina, las cuales contienen en su estructura Leu-enkefalina (Baulieu, 1990, Reisine y Pasternak, 1996). Existe la posibilidad de que el origen evolutivo de este grupo de compuestos sea el mismo. Sin embargo, el grupo más estudiado es el de POMC. Se han descubierto diferentes sitios de síntesis, a nivel hipotalámico en el núcleo arcuato. A nivel del núcleo del tracto solitario, también se han detectado β endorfinas en las fibras y terminaciones de la médula espinal, las cuales están relacionadas con el dolor. Su origen probablemente sea supraespinal (Baulieu, 1990).

1.- Péptidos derivados de proencefalina A o proencefalina:

Met-enkefalina:	Tir-Gli-Gli-Fen-Met
Leu-enkefalina:	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu
Heptapéptido:	Tir-Gli-Gli-Fen-Met-Arg-Fen
Octapéptido:	Tir-Gli-Gli-Fen-Met-Arg-Gli-Leu

2.- Péptidos derivados de proencefalina B o prodinorfina:

Dinorfina A:	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-Arg-Arg-Ile-Pro-Lis-Leu-Lis-Trp-Asp-Asn-Gln
Dinorfina B:	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-Arg-Arg-Gln-Fen-Lis-Val-Val-Tre
α -neoeendorfina:	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-Arg-Lis-Tir-Pro-Lis
β -neoeendorfina:	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-Arg-Lis-Tir-Pro

3.- Péptidos derivados de POMC:

β -endorfina:	Tir-Gli-Gli-Fen-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre -Leu-Fen-Lis-Asn-Ala-Ile-Ile-Lis-Asn-Ala-Tir-Gli-Lis-Lis-Gli-Glu (incluye en si misma una secuencia de Met-encefalina por molécula)
---------------------	---

Los receptores opiáceos son sitios de reconocimiento moleculares que están unidos estereoespecíficamente e interactúan con los opioides y pueden responder a interacciones semejantes para desencadenar una respuesta celular (Kania et al., 1991).

Receptores opioides

	M (μ)	Δ (δ)	K (κ)
Morfina	++	+	-
Encefalinas	+	++	-
Dinorfinas		+	++
β -endorfina	++	+	-
Naloxona	++	+	(+)

++ significa alta afinidad; + y - indican baja o ninguna afinidad. Péptidos naturales con ++ son probablemente los ligandos endógenos de los receptores correspondientes (Baulieu, 1990).

(+) actividad reportada por Reisine y Pasternak (1996)

En el sistema nervioso central (SNC), se han detectado cuatro tipos de receptores opioides, establecidos de acuerdo a la relación con la droga a la que se unen, μ , de morfina; κ , de cetociclazocina; δ , de deltorfina, σ , de SKF 10 047ó N-alil normetazocina. Cada uno de ellos puede incluir diversos subtipos los cuales determinan en gran parte la actividad biológica que los opioides realizan en el organismo (Baulieu, 1990; Reisine y Pasternak, 1996).

Los péptidos opioides tienen propiedades analgésicas, causan disminución en la actividad motora y reducen la respuesta a estímulos nocivos. Estos compuestos a menudo son sintetizados en neuronas, conjuntamente con otros neuropéptidos y/o neurotransmisores. Esos péptidos son abundantes en varias partes del hipotálamo; ellos modifican la función del oscilador generador de pulsos, disminuyendo la frecuencia de pulsos de LH durante la fase lútea (Ferin et al., 1984) y modificando la secreción de las diferentes hormonas hipotalámico-hipofisarias, con efecto positivo al aumentar la secreción de prolactina, hormona del crecimiento y la estimulante de la tiroides; su efecto es negativo al disminuir las hormonas adrenocorticotrópica, vasopresina, oxitocina, luteinizante y foliculo estimulante (Baulieu, 1990).

Efectos de estimulación sobre receptores opioides (Sancho, 1988 Reisine y Pasternak, 1996).

M (μ)	K (κ)	Σ (σ)
Analgesia supraespinal	Analgesia supraespinal	Estimulación ventilatoria
Analgesia espinal	Analgesia espinal	Estimulación simpática
Depresión respiratoria	Receptores mixtos, μ, σ	Midriasis
Hipotermia	Aumenta alimentación	Traquipnea
Miosis	Baja tránsito gastrointestinal	Taquicardia
Euforia		Náuseas
Dependencia física		Vómitos
Aumenta prolactina		Alucinaciones
Aumenta somatotropina		Disforia
Reduce acetilcolina		
Reduce dopamina		
Aumenta alimentación		
Baja tránsito gastrointestinal		

El metabolismo de las encefalinas, que son los péptidos opioides más abundantes, se debe principalmente a las encefalinasas, las cuales son metalopeptidasas. Los inhibidores específicos de estas enzimas, por ejemplo kelatorfano, pueden producir analgesia fisiológica al disminuir el metabolismo inactivador. En últimas fechas se ha ido entendiendo al considerar las múltiples estructuras químicas, sitios de síntesis, el hecho de que no pasan la barrera hemato-encefálica y la amplia distribución de sus receptores (Baulieu, 1990).

Los péptidos opioides están involucrados en las rutas que inhiben la secreción de LH al reducir la amplitud y la frecuencia de pulsos de GnRH. En humanos, la amenorrea hipotalámica, puede ser revertida y los ciclos menstruales restaurados cuando se tratan con Naloxona (Nx), un antagonista de los opioides (Ganong, 1991).

2.2.3.3.1. Naloxona (Nx): Antagonista específico de los POE

La Naloxona (Clorhidrato de N-alil-noroximorфона) es una sustancia que bloquea estereoespecíficamente la acción opioide exógena y endógena (Kania, et al 1991), antagonista de analgésicos opiáceos que depende de la presencia o no de otras sustancias de tipo opiáceo. La Naloxona es una estructura sintética de la noroximorфона. Se presenta en forma de cristales ligeramente blancos, solubles en agua y alcohol e insolubles en éter. Sus efectos antagónicos persisten durante una a cuatro horas, dependiendo de la dosis administrada. Se diferencia de la morfina por cambios químicos y en radicales de las siguientes posiciones: 3, -OH; 6, =O; 7 y 8,

enlace sencillo en lugar de doble; 14 -OH; 17,-CH₂CH=CH₂ (Reisine y Pasternak, 1996). En dosis hasta de 12 mg/kg no produce efectos y en dosis de 24 mg/kg solo causa ligera somnolencia; por otro lado, en dosis pequeñas (0.4-0.8 mg), administrada por vía IV o IM, previene o invierte rápidamente los efectos narcóticos de los efectos agonistas μ (Rodríguez, 1984; Reisine y Pasternak, 1996).

El fármaco se metaboliza rápidamente en el hígado principalmente por conjugación con el ácido glucorónico. Aunque la acción de la Naloxona dura de una a cuatro horas, su vida media plasmática es de aproximadamente una hora, se elimina a través de la orina y es metabolizada casi totalmente en menos de 24 horas (Rodríguez, 1984; Reisine y Pasternak, 1996).

Sobre la actividad reproductiva, la Naloxona ha sido estudiada y se han establecido sus efectos estimulantes sobre la secreción de LH en hembras domésticas durante diferentes estados fisiológicos, en vaquillas pre y peri púberes (Byerley et al., 1992), en vacas durante el periodo posparto (Whisnant et al., 1986; Smart et al., 1994), en ovejas durante el anestro estacional (Currie, 1991) y lactacional (Gordon et al., 1987), durante sus fases folicular y lútea del ciclo estral (Brooks y Haynes, 1986).

Una de las vías en que los esteroides producen su efecto regulador de la secreción de gonadotropinas puede ser usando como neuromediadores a los péptidos opioides endógenos, que a su vez pueden tener efecto a nivel hipotalámico y/o hipofisario (Goodman y Karsch, 1980; Clarke y Cummins, 1985; Horton et al., 1987).

A pesar de que en la oveja las características de secreción de LH durante la fase lútea y el anestro estacional son similares en cuanto a la frecuencia y amplitud de pulsos, los mecanismos que regulan una y otra etapas fisiológicas son diferentes, ya que de acuerdo a la información generada por Horton et al. (1987) sugieren que los péptidos opioides endógenos pueden inhibir la secreción tónica de LH tanto en la fase lútea, como en la fase folicular del ciclo estral.

En la mujer, si se administra Naloxona durante la fase lútea, la descarga de LH se aumenta a niveles similares a los observados durante la fase folicular temprana. Ya que la progesterona aumenta la secreción de β -endorfinas en el hipotálamo, se ha sugerido que el efecto negativo del esteroide sobre la frecuencia de pulsos de LH durante la fase lútea es mediado por la β -endorfina (Ojeda, 1988). Algo similar a lo anterior ocurre en ovejas durante la fase lútea, donde después de aplicar Naloxona se observaron aumentos en la secreción pulsátil tanto de GnRH hacia los vasos porta hipofisarios, como de LH medida en la vena yugular (Horton et al., 1987). Currie et al. (1991), a pesar de que encontraron similitudes en cuanto al efecto general de los opioides y en

especial de la Naloxona, sugieren que el mecanismo supresor de origen opioide es independiente de los esteroides ováricos, ya que la infusión de dosis altas de morfina disminuyó la frecuencia y amplitud de LH en borregas ovariectomizadas, mientras que dosis bajas provocaron aumentos en la secreción basal de hormona luteinizante.

En ovejas, la administración simultánea de morfina y Naloxona, no afectó la liberación de LH. Efecto contrario al de la morfina en dosis altas se observa cuando se aplica Naloxona en infusión (Malven et al., 1984). Las mismas observaciones son reportadas en monos tratados con Naloxona durante la fase lútea del ciclo menstrual (Van Vugt et al., 1983). Los efectos de los opioides sobre las gonadotropinas se han evaluado no solo durante la fase lútea, sino también en hembras prepúberes y púberes, en fase folicular, en gestantes, en el posparto y durante el anestro estacional.

Pubertad

Existe un reporte de que el aumento en la secreción de LH antes de la pubertad de la oveja es independiente del control opioide y que estos péptidos endógenos no median la acción negativa de los esteroides sobre la producción de LH (Ebling et al., 1989). En el caso de vaquillas pre y peripúberes, el sistema opioide es funcional hasta la fase lútea del ciclo estral puberal. Además, las concentraciones de LH en respuesta a Naloxona variaron durante el desarrollo puberal aumentándose cinco semanas antes de la pubertad y disminuyendo subsecuentemente una semana antes, durante el momento conocido como pivote de la transición de la prepubertad a la pubertad. En relación a esos cambios en la respuesta de la LH a la Naloxona hacen suponer que se presentan cambios en el número o tipo de neuronas bajo el control opioide, alteran las fuentes de GnRH liberables, o una combinación de las respuestas anteriores (Byerley et al., 1992). En ratas, la infusión de Naloxona indujo la pubertad (Srinathsinghji, 1985). También se ha observado que el efecto negativo opioide sobre la síntesis y secreción de LH disminuye al momento de que las ratas alcanzan la pubertad (Bhanot y Wilkinson, 1983).

Fase folicular

Está bien documentado que la administración de opioides resulta en la supresión de gonadotropinas. La administración de morfina inhibió los picos preovulatorios de LH y FSH en ratas durante el proestro, y la Naloxona evitó el efecto de la morfina (Pang et al., 1977). Este efecto de la morfina se realiza a través de la inhibición de la liberación de GnRH, el cual luego de

la administración del opioide se redujo hasta 50 por ciento de la concentración plasmática detectada en los vasos portales pituitarios (Ching, 1983).

Gestación y parto

La concentración de β -endorfina fue mayor en el cerebro de ratas durante el final de la gestación y en el parto, disminuyendo durante el periodo posparto (Wardlaw et al., 1982).

Posparto

Muchos mamíferos exhiben un periodo de amamantamiento que provoca inhibición de la reproducción. Esto provoca un espacio adecuado entre nacimientos sucesivos, mismo que se conoce como anestro posparto o lactacional (Short, 1976).

Durante el posparto temprano, la supresión en la liberación de LH puede estar mediada por los opioides endógenos; sin embargo, existe una respuesta diferencial, ya que conforme pasa el tiempo, las dosis de Naloxona requeridas para estimular aumentos en la secreción pulsátil de LH son menores (Whisnant et al., 1986). Los efectos de la β -endorfina son más marcados durante el amamantamiento ya que el opioide hipotalámico es liberado en respuesta al estímulo del becerro al mamar, esto trae como consecuencia que la liberación de GnRH sea reducida y que la secreción de LH por la hipófisis esté deprimida (Gordon et al., 1987). Existen reportes de una asociación negativa entre las concentraciones de β -endorfina en el área preóptica en el hipotálamo y las de LH-RH en la prominencia del tallo medio de vacas después de destetar sus crías (Malven et al., 1986).

En la oveja, la lactación prolonga la duración del anestro posparto, sobre todo si paren durante la estación reproductiva temprana, aunque a menudo el anestro estacional opaca esta inhibición lactacional cuando el parto se presenta al final de la estación de empadre (Mallapantu et al., 1971). El anestro lactacional es resultado de la acción del becerro al mamar la teta. En la mujer, el amamantamiento desactiva el efecto de retroalimentación positivo que el estradiol tiene sobre la LH (McNeilly, 1979); en la oveja, ocurre algo similar (Wright et al., 1980). También existen sugerencias de que la hiperprolactinemia puede interferir con la producción de esteroides por el ovario (Demura et al., 1982), además de causar un aumento en la sensibilidad hipotalámica-hipofisaria al efecto de retroalimentación negativa del estradiol (Wright et al., 1981). La última causa de infertilidad lactacional no es debida a la baja secreción hipotalámica de GnRH, la terapia de reemplazo de GnRH apropiada a borregas lactando puede restaurar los ciclos

estrales normales (Wright et al., 1984). La principal objeción a la hipótesis de que la prolactina es el mediador endocrino de la infertilidad lactacional es que la supresión de la hiperprolactinemia lactacional con bromocriptina no suprime en forma completa el efecto inhibitorio del amamantamiento en monos rhesus (Schallenberger et al., 1981) y ratas (Sirinathsinghji y Martini, 1984).

Una hipótesis alternativa es que las β -endorfinas hipotalámicas pueden ser liberadas durante el amamantamiento e inhibir la liberación de GnRH (Short, 1984). La morfina o las β -endorfinas aplicadas intravenosamente o directa al tercer ventrículo disminuye la secreción de LH (Kubo et al., 1983) y de FSH (Ferin et al., 1983) e incrementa la secreción de prolactina (Gordon et al., 1987).

2.2.3.4. Esteroides

En ovejas intactas durante la estación reproductiva, la reducción en la frecuencia de pulsos de LH está asociada con la retroalimentación de progesterona afectando la secreción de GnRH (Goodman y Karsch, 1982). En el anestro, la reducción en la frecuencia de pulsos de LH resulta de un aumento en la sensibilidad al efecto negativo del estradiol (Legan et al., 1977) y a un sistema independiente de esteroides ováricos pero dependiente del fotoperíodo (Goodman et al., 1982). Currie et al. (1991) sugieren que la supresión de LH durante el anestro estacional, además de ser dependiente del fotoperíodo, es independiente de los péptidos opioides endógenos y que está más relacionada con ausencia de progesterona que con una reducción en la respuesta de receptores opioides.

El período de anestro estacional de las ovejas ha sido comparado con el período prepuberal. La secreción pulsátil de LH parece estar deprimida a través de la supresión del generador de pulsos de GnRH, promovida por el efecto de retroalimentación negativo del estradiol a pesar de que sus niveles séricos son muy reducidos. En su momento el estradiol actúa vía neuronas dopaminérgicas. Esto no quiere decir que no existan rutas opioides inhibitorias cuyos efectos sean probablemente enmascarados por el efecto contundente del estradiol (Cosgrove et al., 1993). Con esta base se ha propuesto que el control de la LH durante el anestro es muy diferente al de la prepubertad y que las acciones inhibitorias de los sistemas noradrenérgicos, dopaminérgicos y opioides varían con la edad, dentro y entre estaciones reproductivas (Schall et al., 1991).

Los andrógenos tienen una acción inhibitoria sobre la liberación de LH a niveles hipotalámicos e hipofisarios, Su efecto restrictivo sobre la FSH es solo a nivel hipotalámico. La progesterona puede ejercer efectos estimulatorios e inhibitorios sobre la secreción de gonadotropinas a niveles hipotalámicos e hipofisarios. La modulación de la acción de la hipofisiotropina puede ocurrir por una alteración del número de receptores en las células hipofisiales y posiblemente por la sensibilidad de los receptores. El estradiol incrementa la sensibilidad de las células que secretan gonadotropinas al GnRH por una acción directa a nivel de la pituitaria. El efecto del estradiol puede ser estimulatorio o inhibitorio, dependiendo de la dosis y el momento de administración del estrógeno. El número de receptores para GnRH en la hipófisis anterior está positivamente correlacionado con las concentraciones séricas de estradiol. La modulación de los receptores para GnRH en los gonadotrófos puede ser un componente necesario del aumento en la sensibilidad de la pituitaria a la hipofisiotropina durante el ciclo estral. El estradiol puede incrementar también la secreción de prolactina en humanos y ratas, y de TSH en ratas (Hadley, 1996).

Moenter et al. (1990), probaron dos hipótesis, ambas tendientes a establecer el efecto del estradiol sobre la liberación de GnRH y de gonadotropinas: 1.- el estradiol secretado durante la fase folicular induce una oleada de GnRH y por consecuencia de gonadotropinas (LH y FSH), y 2.- la acción inductora del estradiol no varía con la estación. Sus conclusiones fueron que, independientemente de la estación, en los animales del experimento, un aumento en el estradiol, similar al de la fase folicular tardía, pudo iniciar en forma abrupta un gran descarga de GnRH, que coincide con el comienzo de la de LH y que mientras ésta última termina, la de GnRH continúa.

Jansen et al. (1991), realizaron varios experimentos y tuvieron una respuesta variable al inducir la liberación de LH en ovejas en anestro estacional usando el N-metil D,L-aspartato (NMA), un aminoácido agonista excitatorio, que estimula la liberación de GnRH. En uno de los experimentos, el NMA fue aplicado en tres inyecciones, cada una de 1.25 mg/Kg de peso y con diferencia de 90 minutos entre ellas. La primera inyección inmediatamente provocó un pulso de LH de amplitud media de 8.0 ± 1.6 ng/ml en todas las ovejas. Sin embargo, en la segunda y tercera inyecciones, solo respondieron el 25 y el 75 por ciento respectivamente. Dos horas después de la última inyección de NMA se administró GnRH en una inyección a razón de 3.0 ng/Kg de peso corporal, éste dió lugar a la liberación de LH con pulsos que tuvieron una amplitud media de 6.9 ± 1.8 ug/ml.

2.2.4. Acciones extrapituitarias del GnRH

Se sugiere que el GnRH puede tener efecto no solo sobre la hipófisis, sino que también dentro del mismo hipotálamo (cerebro), ya que su producción en la región preóptica, mismo sitio que está involucrado en el comportamiento coital o de cópula lo relaciona directamente con esta función, ya que este comportamiento aparece poco después de que se inicia la descarga preovulatoria de GnRH. El GnRH induce comportamiento coital en muchas especies incluyendo primates y posiblemente humanos, esto no es causado por las gonadotropinas liberadas, ya que estas hormonas no lo afectan tal y como se observa cuando se aplica GnRH a ratas hipofisectomizadas. El comportamiento coital ha sido inducido cuando el GnRH se administra en microneyecciones directamente al área preóptica anterior y en las regiones eminencia media y arcuata. El efecto no ha sido observado cuando el tratamiento se aplica en el hipotálamo lateral o en la corteza cerebral (McCann, 1988).

2.2.5. Mecanismo de acción y receptores para GnRH

Las características de los receptores para GnRH en la pituitaria, han sido estudiados con detalle usando agonistas de GnRH ionizados estables (Clayton y Catt, 1980). Estos se localizan en la membrana plasmática y tienen un alto grado de especificidad para una serie grande de análogos y antagonistas de GnRH. Contrario a esos hallazgos, en muchos otros sistemas de receptores, los cambios observados en la respuesta a la administración crónica o aguda de GnRH o sus análogos o después del tratamiento con estrógenos, andrógenos o progestágenos, generalmente no están acompañados por los cambios correspondientes en el nivel de receptores para GnRH. Esto indica que, aunque los receptores para GnRH son los principales y obligatorios sitios de interacción del GnRH con las células gonadotróficas, gran parte de la acción del decapeptido ocurre en pasos posteriores a su unión con el receptor (Ferland et al., 1981). Esto concuerda con los cambios de receptores observados de acuerdo con la etapa fisiológica de las hembras de animales en las cuales se han realizado estudios sobre receptores para GnRH y en donde después de la administración de GnRH o algunos de sus análogos, la respuesta hipofisaria en la secreción de LH es muy similar o ligeramente menor cuando se aplica durante el anestro o fase lútea en comparación a la que se observa en forma espontánea durante la fase folicular, y en cultivos celulares de pituitaria anterior en los cuales se administró GnRH en diferentes

concentraciones, observándose un efecto estimulador directo sobre la concentración intracelular de AMPc (Borgeat et al., 1972). Como consecuencia a este cambio, se presentan aumentos en la secreción de gonadotropinas (LH y FSH). El paralelismo observado entre el nivel de AMPc y la hormona liberada, también está en función del tiempo siguiente a la administración del GnRH o sus análogos. En la respuesta intracelular al GnRH están involucrados además del AMPc, diferentes mediadores como el complejo calcio-calmodulina y el fosfatidil-inositol (Raymond et al., 1984.).

Ya que la pituitaria es una glándula de síntesis y almacenaje, y ya que el efecto inicial de las hormonas hipotalámicas es una estimulación o una inhibición, su nivel de síntesis y de liberación por exocitosis está mediado por sustancias que provocan cambios en la fosforilación de ciertas proteínas específicas al interior de la membrana celular, en los gránulos secretorios y en la membrana plasmática. Además de los cambios antes mencionados, también se observan fosforilación de proteínas ribosomales y cromatina. El AMPc, es ejemplo de una sustancia estimulante que provoca esos cambios. Esta información sugiere la posibilidad de que la fosforilación de algunos sustratos protéicos pueden ser un mecanismo que controle la actividad de la glándula pituitaria.

Las prostaglandinas del tipo E, tienen un marcado efecto estimulador sobre la acumulación del AMPc en la hipófisis, un efecto que es acompañado por cambios paralelos en la liberación de la hormona del crecimiento. Estas prostaglandinas, también tienen un efecto estimulador pequeño sobre la secreción de TSH y la respuesta de TSH a TRH; sin embargo, cuando se hicieron pruebas para establecer el efecto de esta prostaglandina sobre la secreción de LH, FSH, PRL o ACTH, se observó que al menos a nivel pituitario no parecen actuar sobre ellas (Labrie, 1990)

2.2.6. Usos clínicos del GnRH

El GnRH como opción terapéutica y de manejo reproductivo tiene como ventajas sobre la hCG, la LH y el extracto pituitario su antigenicidad mínima en aplicaciones múltiples y puede ser administrado en forma pulsátil por inyecciones frecuentes, por infusión continua o por implantes de liberación lenta en periodos de tiempo prolongados. Como resultado, el énfasis actual de las aplicaciones terapéuticas es sobre sistemas económicos de liberación continua de drogas (Drost y Thatcher, 1992).

Con la aplicación de inyecciones masivas de GnRH, se puede determinar la capacidad de reserva y de liberación de gonadotropinas por la hipófisis anterior. De igual manera, y con el propósito de establecer una posible respuesta no esperada, se ha hecho con las otras hormonas hipotalámicas que han sido administradas solas, en combinación unas con otras y todas juntas. Se ha comprobado que no existe interacción de respuesta hipofisaria entre los diferentes factores u hormonas liberadoras (Hadley, 1996).

El GnRH ha sido usado para inducir ovulación en hembras amenorréicas. También ha sido usado para tratar oligospermia e hipogonadismo hipogonadotrópico en machos. Se han desarrollado análogos de GnRH altamente potentes para usarse en hipogonadismo femenino y masculino (Crowley y Jameson, 1992). Aunque la administración de GnRH inicialmente causa una gran liberación de gonadotropinas en hembras, el tratamiento prolongado resulta en alteraciones de la secreción de gonadotropinas, maduración irregular de los folículos e incidencia baja de ovulaciones. Una dosis sencilla de ciertos análogos de GnRH con gran actividad son efectivos al disminuir la secreción de gonadotropinas. Esos péptidos pueden tener un mejor uso como agentes antifertilidad o contraceptivos (Hadley, 1996).

En la actualidad se ha demostrado claramente que los análogos agonistas de GnRH administrados en inyecciones pulsátiles para simular el patrón normal de liberación hipotalámica del péptido pueden inducir ovulación en mujeres infértiles. En machos con hipogonadismo, esos análogos podrían estimular el desarrollo sexual (McCann, 1988).

Otro de los usos clínicos del GnRH se hace en el cáncer prostático con metástasis, ya que la aplicación de análogos en grandes dosis provoca castración química al inhibir la producción de LH y por consecuencia se interrumpe la síntesis y liberación de testosterona por los testículos. Lo anterior se considera una ventaja ya que no es necesario implementar un procedimiento quirúrgico. La terapia complementaria a este tratamiento, consiste en utilizar antiandrógenos para evitar las acciones androgénicas residuales de las adrenales que no son suprimidas por el GnRH. Estos tratamientos se empezaron a usar como opción a la castración quirúrgica, empleada para aminorar el cáncer prostático con metástasis, porque presumiblemente las células cancerígenas son sensibles a la estimulación por testosterona (McCann, 1988).

En borregas Romney durante el anestro estacional, la infusión continua por siete días de 125 ng/ml de GnRH sin un pretratamiento con progestágenos provocaron ovulaciones, sin embargo el cuerpo lúteo no fue funcional en ninguna de la borregas tratadas. La administración de un tratamiento previo con progesterona y la infusión continua por siete días de 125 o 250 ng/h de

GnRH indujo ovulación con 27 y 50 por ciento cuerpos lúteos normales respectivamente. Este tipo de trabajos tiene implicaciones prácticas limitadas y su enfoque es más bien experimental (McNatty et al., 1988). Las fallas en el cuerpo lúteo inducido con GnRH en dosis bajas y múltiples se pueden explicar por una de las formas siguientes, por deficiente maduración del folículo que ovuló, o por regresión prematura del cuerpo lúteo formado (Southee et al., 1988). El momento de aplicación de GnRH después de un tratamiento con progesterona también es importante. Es recomendable no administrar el decapeptido después de 36 de retirado el progestágeno (Walker et al., 1990). Drost y Tatcher (1991) consideran que la dificultad estriba en que existe un tiempo apropiado para la descarga preovulatoria de LH.

Nueve de diez cabras lactando durante el anestro estacional, respondieron con estro, fueron servidas por el semental y posteriormente cinco de ellas parieron normalmente. Estas cabras recibieron un pretratamiento con progesterona e inducidas a ovular con inyecciones de 1500 ng de GnRH administradas cada dos horas por 52 ó 78 horas (Knight et al., 1988). Lacalandra et al. (1985) reportan que en la época de inactividad sexual aparente, varios machos caprinos fueron tratados con GnRH por cinco días y sometidos a un régimen de luz reducido. Esos machos fueron comparados con sementales testigo y la diferencia fue que los primeros montaron varias veces a cabras con celo inducido, mientras que los testigos no realizaron montas

El intervalo desde el parto hasta el primer estro posparto indicado por un aumento en la concentración sérica de progesterona a niveles superiores de 1 ng/ml, promedió 25.8 ± 0.6 en siete ovejas no tratadas. Grupos de cuatro o cinco borregas fueron canuladas para coleccionar muestras sanguíneas del sistema porta-hipofiseal a los 3, 7, 14 y 21 días posparto sobre un periodo de seis a siete horas en intervalos de 10 minutos. El número de pulsos de GnRH por seis horas se incrementó desde 2.2 ± 0.5 sobre el día tres a 3.6 ± 0.02 y 3.9 ± 0.4 sobre los días siete y 14 respectivamente. Otro aumento se observó en la frecuencia de pulsos del GnRH al día 21 (6.4 ± 0.4 pulsos cada seis horas). También se observaron cambios en la liberación pulsátil de LH paralelos a los de GnRH. Los pulsos promediaron 0.83 ± 0.3 , 2.8 ± 0.4 , 2.9 ± 0.6 y 4.0 ± 1.1 cada seis horas sobre los días 3, 7, 14 y 21 respectivamente. La amplitud de los pulsos de GnRH fue más alta el día 21 en comparación con los otros días de muestreo. Estos resultados sugieren que un aumento en la frecuencia de liberación de GnRH promueve el comienzo de la liberación pulsátil de LH durante el anestro posparto (Wise, 1990).

Como consecuencia de la liberación del GnRH, el patrón natural de la secreción de LH en ovejas es episódico, los niveles basales son de 0.1 a 2.0 ng/ml y en la fase folicular están

intermezclados con episodios de vida media muy corta, de 5 a 15 ng/ml por al menos 30 minutos. Durante la fase lútea y el anestro estacional esos episodios ocurren irregularmente en intervalos de 3 a 12 horas (Baird, 1976; Yuthasastrakosol et al. 1973; Yuthasastrakosol et al. 1977).

2.2.7. Efectos biológicos

Algún uso racional del GnRH o su análogos para la implementación en varios sistemas de manejo reproductivo o su uso para aumentar las tasas de concepción, deberá basarse en un entendimiento completo de los efectos biológicos inducidos por el GnRH en el sistema endocrino reproductivo (Drost y Thatcher, 1992). Hipotéticamente, el GnRH induce efectos sobre las gónadas que pueden ser indirectos a través de la secreción de LH y FSH (Chenault et al., 1990), o quizá efectos directos sobre el tejido reproductivo ovárico: cuerpo lúteo y folículo.

Los efectos biológicos del GnRH se observan principalmente al estimular la hipófisis para liberar LH y FSH, sin embargo, también se han identificado sitios extracraneales tanto de liberación como de producción. Entre ellos se puede mencionar el ovario y dos de sus estructuras anatómicas más importantes, que son el folículo y el cuerpo lúteo. La forma en que el GnRH pudiera ejercer su acción sobre los tejidos reproductivos extracraneales sería a través de un efecto indirecto vía inducción de la secreción de LH y FSH o quizá por efectos directos sobre los tejidos reproductivos antes mencionados (Chenault et al., 1990).

Estos efectos biológicos del GnRH determinan su uso en la producción animal, en la cual se consideran como agentes terapéuticos o dentro de programas de manejo reproductivo. Las indicaciones terapéuticas inicialmente se limitaron al tratamiento de quistes foliculares degenerativos en vacas, posteriormente se utilizó para sincronizar ovulaciones e inseminar vacas repetidoras con el propósito de mejorar la fertilidad. Al mismo tiempo, su uso se extendió a otras especies intentando estimular el desarrollo folicular y la ovulación, de ahí que ha llegado a ser una hormona importante en los protocolos reproductivos fuera de estación en ovejas, cabras y caballos (Drost y Thatcher, 1992).

El GnRH aplicado en una sola inyección a vacas acíclicas provocó dentro de los siguientes 7 a 10 días, la incidencia de estros en el 64 % de las vacas tratadas y entre ellas quedaron gestantes alrededor del 75 por ciento (Barth et al., 1990). La administración de GnRH con o sin pretratamiento de estradiol indujo ovulaciones, formación de cuerpos lúteos y ciclicidad ovárica en vacas. Sin embargo la mayoría de las que no fueron tratadas con estradiol antes del GnRH

presentaron inicialmente y de acuerdo al monitoreo sanguíneo de progesterona, ciclos sexuales cortos (Rao et al., 1989). La infusión continua de GnRH a ovejas durante el anestro estacional, tuvo uso práctico limitado para inducir preñez (McNatty et al., 1988).

La aplicación del GnRH en pequeños rumiantes, además del estudio de los mecanismos inmunológicos y endocrinológicos básicos, se ha enfocado principalmente hacia la reproducción fuera de estación y en sincronización de la ovulación en tratamientos superovulatorios. El uso terapéutico del GnRH es raro y limitado al tratamiento de quistes foliculares degenerativos en cabras similares a los observados en vacas (Drost y Thatcher, 1992).

Durante el anestro estacional en ovejas, la administración de 150 ó 300 µg de GnRH sintético, induce una descarga de LH tipo preovulatoria. Sin embargo, en la mayoría de las ovejas solo alcanzó el 25 por ciento de la magnitud de la que se observa en forma espontánea (Foster y Crighton 1974). Con un pretratamiento de benzoato de estradiol la descarga de LH fue más grande (Haresing y Lamming, 1978). El mismo resultado se observó cuando 300 µg de GnRH se aplicaron distribuidos en cinco inyecciones (Crighton et al., 1975).

2.3. Estacionalidad Reproductiva

A partir de los trabajos de Yeates (1949) y Hafez (1952), quedó demostrado que las ovejas y las cabras son animales estacionales, y que el fotoperiodo es la clave ambiental que regula tanto el inicio como la duración del anestro. A pesar de que este conocimiento, fue hasta la década de los setenta y de los ochenta, cuando se determinaron algunos mecanismos fisiológicos que regulan estas respuestas.

Bajo condiciones ambientales naturales, los ovinos y los caprinos presentan una época de apareamiento y concepción que abarca desde el final del verano hasta el final del invierno, cuando la duración de las horas luz del día es menor (Foster, 1983). Estos cambios en la duración de las horas luz se encuentran asociados con variaciones en los niveles séricos de gonadotropinas (Hafez, 1996).

2.3.1. Transmisión de la señal lumínica

En mamíferos, las señales lumínicas son reconocidas por la retina y transmitidas al sistema nervioso central via tracto retino-hipotalámico hasta el núcleo supraquiasmático, para luego dirigirse al núcleo paraventricular. Ambos núcleos forman parte del hipotálamo. De este último

núcleo, la señal se dirige al ganglio cervical superior para posteriormente ser enviada también vía nerviosa, hacia la glándula pineal (Legan y Karsch, 1979; Karsch et al., 1984; Foster et al., 1985).

Estudios realizados por Legan y Karsch (1979) demostraron que las ovejas requieren fotorreceptores retinales para el control de las señales fotoperiódicas que regulan su ciclo reproductivo, y que en ausencia de esos receptores, la señal se puede recibir indirectamente de otros animales que perciben la luz, probablemente a través de señales olfatorias (Karsch et al., 1984).

En aves, reptiles y peces, existen evidencias que demuestran la existencia de fotorreceptores no oculares (Benoit, 1964; citado por Karsch et al., 1984). En aves se ha propuesto que estos fotorreceptores se localizan dentro del hipotálamo medio ventral o en el complejo tuberal (Tepperman, 1980). Sin embargo, en peces y reptiles no se han definido sitios anatómicos exactos, pero se especula que éstos existen en el cerebro (Follet, 1978).

2.3.2. Efectos del fotoperiodo

Los cambios reproductivos inducidos por el fotoperiodo involucran, por lo menos, dos mecanismos separados: una acción directa del fotoperiodo en el eje hipotálamo-hipofisario, y otra indirecta, en la cual existen cambios en la sensibilidad del sistema nervioso central a los mecanismos de retroalimentación negativos de los esteroides (Hafez, 1996). Ambos mecanismos probablemente sean mediados por la melatonina, hormona secretada en la glándula pineal.

2.3.2.1. Efecto directo del fotoperiodo

En este mecanismo, los esteroides al parecer no están involucrados y se especula que este efecto directo del fotoperiodo es mediado por neurotransmisores tales como la epinefrina, norepinefrina y algunos péptidos. Los estudios realizados por Karsch et al. (1984), proporcionaron evidencias sobre el posible efecto directo del fotoperiodo, al observar cambios en la secreción tónica de LH cuando ovejas ovariectomizadas, fueron expuestas a diferentes fotoperiodos naturales en el curso de un ciclo anual. En esas ovejas se detectó que durante los días largos de verano, los pulsos de LH son pocos frecuentes y de gran amplitud, mientras que, en los días cortos de invierno, encontraron un aumento en la frecuencia de pulsos y una disminución en

la amplitud de los mismos (Goodman et al., 1982). Lo anterior, también ha sido demostrado en experimentos realizados con fotoperiodos artificiales (Bittman et al., 1983a).

2.3.2.2. Efecto indirecto del fotoperiodo

Este efecto implica el sistema de retroalimentación negativa mediado por el estradiol de origen ovárico, el cual, a pesar de existir en bajas concentraciones, afecta el eje hipotálamo-hipófisis que durante la época de anestro es altamente sensible a este esteroide (Legan y Karsch, 1979; Karsch et al., 1984; Lincoln et al., 1985).

Este efecto fue demostrado cuando se ovariectomizaron e implantaron con estradiol, hembras ovinas antes de entrar en la época de anestro, observándose que el patrón de secreción de LH es muy similar al de ovejas intactas en anestro estacional. Es importante señalar que la reiniciarse la época reproductiva, tanto de las ovejas intactas como las ovariectomizadas con implante de estradiol, "escapan" del efecto negativo del esteroide, observándose, en ambos casos, aumentos en la frecuencia de pulsos y por ende en las concentraciones de LH (Legan et al., 1977). Esta evidencia fue reforzada por el trabajo de Goodman et al (1982) quienes observaron que durante la época de anestro, el estradiol suprimía efectivamente los pulsos de LH. Esta supresión fue independiente de una disminución en la capacidad de la hipófisis de responder al GnRH, ya que la administración de pequeñas dosis de GnRH en forma de pulsos, fueron seguidas de pulsos de LH.

Los planteamientos anteriores respecto a los efectos del fotoperiodo, permiten suponer que la regulación de la actividad reproductiva por el fotoperiodo, se da por la combinación de los efectos directos e indirectos del mismo. Por ejemplo, los cambios en la sensibilidad del hipotálamo al estradiol durante el anestro pueden ser apoyados por un efecto directo del fotoperiodo. Esta suposición es reforzada por el trabajo de Goodman y Meyer (1984) con ovejas intactas a las cuales anestesiaron con pentobarbital, tanto en la época de anestro como en la de actividad reproductiva, observando que el pentobarbital puede revertir tanto el efecto directo, como el de los esteroides, ya que con la anestesia aumentó en forma rápida la frecuencia de pulsos de LH. Este efecto del pentobarbital no se observó en la época de empadre.

2.3.2.3. Los neurotransmisores como mediadores del fotoperiodo

Existe evidencia (Karsch et al., 1984; Lincoln et al., 1985) de que varios tipos de neurotransmisores, opioides y aminas biogénicas, están involucrados en la regulación de la secreción de GnRH por las neuronas hipotálamicas, tanto en la época de actividad reproductiva como en la de anestro.

Se ha establecido que péptidos endógenos de actividad opioide parecen modular la secreción de gonadotropinas en diversas especies (Blank et al., 1979; Kalra, 1981; Eskes et al., 1984; Brooks et al., 1986 a,b; Whisnant et al., 1986 a,b), ejerciendo esencialmente un efecto supresivo. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración de Met-enkefalina, disminuye las concentraciones séricas de LH en ratas machos, mientras que, si se administra un antagonista de los opioides, como la Naloxona, la secreción de LH se incrementaba (Blank et al., 1979, Brooks et al., 1986a).

Trabajos realizados durante el anestro estacional en ovejas en días largos (Brooks et al., 1986b) y en hamsters en días cortos (Eskes et al., 1984), han demostrado que la Naloxona causa aumentos en la secreción de LH solo en las hembras ovariectomizadas e implantadas con Naloxona, sugiriendo que el efecto negativo de la progesterona sobre la secreción de LH puede ser mediado en parte por vía de los opioides contenidos en las neuronas, pero que el efecto negativo del estradiol en ovejas y hamsters durante el anestro requiere probablemente de un mecanismo diferente (Brooks et al., 1986b). Brooks et al (1986a), propusieron dos posibles explicaciones a estas observaciones, una, que los mecanismos fotoperiódicos por los cuales la LH se suprime durante el anestro estacional no involucran péptidos opioides, y dos, que el nivel de actividad de los opioides endógenos puede ser muy alto, de tal manera que las dosis de Naloxona utilizadas, no fueran suficientes para contrarrestarlos.

2.3.2.3.1. Aminas biogénicas

La administración de aminas biogénicas (norepinefrina, dopamina y serotonina) a ratas ovariectomizadas suprime la secreción de LH (Kalra y Kalra, (1983). Deaver y Dailey (1983) trabajando con ovejas ovariectomizadas tratadas con norepinefrina, encontraron que dosis bajas inhibían la secreción de LH, sugiriendo que existe una respuesta paradójica dependiendo de la dosis del neurotransmisor.

Goodman (1986), sugiere que en ovejas durante el anestro estacional, tanto el sistema neural dopaminérgico como el adrenérgico, contribuyen en la supresión de la frecuencia de pulsos de LH, y propone que las neuronas adrenérgicas activan un complejo de neuronas dopaminérgicas inhibitorias que en su momento actúan sobre las neuronas secretoras de GnRH, disminuyendo su frecuencia de liberación.

2.3.3. Glándula pineal

Se ha considerado a la glándula pineal como la estructura anatómica que controla la actividad reproductiva en respuesta a las señales luminicas ambientales (Bittman et al., 1983a,b; Karsch et al., 1984). En la oveja (Bittman et al., 1983a,b), al igual que en otras especies (Hoffman y Reiter, 1965; Herbert et al., 1978; Tamarkin et al., 1979), la glándula pineal media la respuesta reproductiva a los fotoperiodos inductivos a través de un ritmo diario en la secreción de melatonina, ejerciendo así un control humoral de la actividad neuroendocrina, además de que esta estructura no tiene fibras neurales eferentes (Ariens et al., 1974).

Se ha podido comprobar la participación de la glándula pineal en el proceso reproductivo utilizando ovejas intactas y pinealectomizadas, comparándose ambas al ser sometidas durante un año y medio a fotoperiodos largos de 16 horas luz y 8 oscuridad y cortos de 8 horas luz y 16 de oscuridad, cada 90 días en forma alternada (Bittman et al. 1983a). La respuesta observada entre las ovejas intactas y las pinealectomizadas fue muy diferente, ya que mientras las primeras respondían al fotoperiodo teniendo ciclos reproductivos, principalmente entre los últimos 30 días de los periodos cortos y los primeros 30 de los largos, las ovejas segundas mantuvieron una actividad reproductiva con cierto grado de estacionalidad pero sin relación con los cambios en el fotoperiodo.

En el mismo trabajo (Bittman et al. 1983a), se emplearon ovejas que a parte de haber sido pinealectomizadas, fueron ovariectomizadas e implantadas con estradiol. Estas ovejas recibieron un tratamiento de fotoperiodo similar al de las que solo se pinealectomizaron. Las concentraciones de LH para las ovejas testigo intactas, fueron parecidas a las de las épocas reproductivas, observándose aumentos típicos en la frecuencia de pulsos; para las ovejas pinealectomizadas, los cambios tanto en la frecuencia de pulsos como en las descargas preovulatorias de LH se presentaron en forma irregular y sin relación con los cambios luminosos. Esto permite suponer que aparte de la acción sobre la ciclicidad ovárica, la pineal, también controla la potencia del

efecto de retroalimentación negativa del estradiol sobre el eje hipotalámico-hipófisis, lo cual se refleja en la secreción tónica de LH ((Bittman et al 1983a,b; Karsch et al 1984)

La glándula pineal probablemente ejerce su función al hacer una medición exacta de las señales luminicas ambientales, mismas que pueden realizar en forma directa, a través de la secreción de melatonina o conjuntamente con un sistema neural que discrimina dias largos (Tepperman, 1980; Bittman et al 1983b; Karsch et al., 1984). El principal efecto que se le conoce a la melatonina es la inhibición de la secreción de gonadotropinas (Tepperman, 1980) probablemente sensibilizando ya sea al hipotálamo, a la hipófisis, o a ambos a los efectos negativos de estradiol (Bittman et al 1983b; Karsch et al., 1984). Esto puede resultar de la inhibición de dos loci: (1) las constelaciones de células que controlan la función de las neuronas peptidérgicas que secretan GnRH al sistema porta-hipofiseal, y (2) una acción directa en la glándula pituitaria, donde es probable que inhiba la respuesta de esta glándula al efecto estimulatorio del GnRH (Tepperman, 1980).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del experimento

El trabajo se realizó en la Granja Caprina del Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Marín, NL, México. La localización geográfica es: 25° 53' latitud norte y 100° 03' longitud oeste con una altura de 375 msnm (Salinas, 1981). Las temperaturas medias, oscilaciones medias y precipitaciones pluviales mensuales durante los meses en que se realizó el experimento fueron 30.66 °C, 15.06 °C y 41.5 mm respectivamente para el mes de junio y, 31.70 °C, 15.32 °C y 45.00 mm respectivamente para el mes de julio de 1996 (FAUANL).

3.2. Animales

Se seleccionaron 16 cabras criollas adultas en anestro estacional, de tres partos o más, que pesaron entre 40 y 50 kg. Desde 45 días antes de iniciar el experimento y hasta 15 días después de finalizado, todas las cabras se mantuvieron en condiciones similares de manejo, se les proporcionó agua fresca y limpia a libre acceso y alimentación isoenergética e isoproteica.

Ración alimenticia proporcionada a las cabras.

Ingrediente	Porcentaje en la ración
Sorgo	72.90
Soya	8.54
Sebo	4.53
Melaza	11.83
Urea	1.30
Optivit	0.45
Minerales	0.45
Total	100.00

Para verificar que las cabras se encontraban en anestro estacional, se recurrió a la aplicación de dos dosis de 7 mg (1.5 ml) de Dinoprost Trometamina¹ con espacio de 11 días entre una y otra. No presentaron celos aparentes, ni detectados por machos enteros manipulados personalmente por aproximación a cada una de las hembras dos veces al día durante los tres días

¹ Lutalyse, The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, USA.

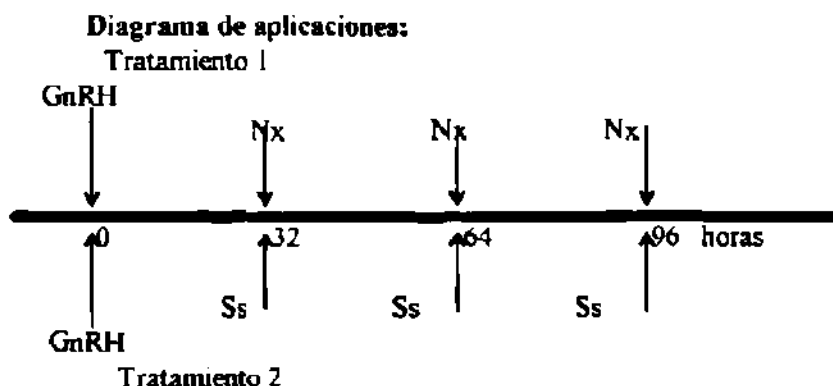
siguientes a cada una de las aplicaciones de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ sintética mencionada. Por lo tanto, se determinó que no había un cuerpo lúteo funcional, o en caso de haberlo, no se presentó la reacción orgánica de reinicio del ciclo estral, con la presentación del celo. Este método utilizado contribuyó a la selección del lote experimental extraído de un hato de 90 cabras.

3.3. Desarrollo del experimento

La aplicación de tratamientos se realizó a finales del mes de junio y principios de julio de 1996 y se inició 15 días después de la administración de la segunda dosis de prostaglandina. Las cabras se sometieron a un periodo previo de adaptación en manejo y alimentación de 15 días. Todos los animales de todos los tratamientos recibieron una inyección intravenosa (iv) de 50 μ g de GnRH². El momento de esta aplicación fue considerado como hora cero.

3.3.1. Tratamientos con Naloxona (1) y solución salina (2) después del GnRH

El propósito de los dos primeros tratamientos, fue estudiar la secreción hipofisaria después del reto de GnRH y posteriormente, evaluar la respuesta sobre la misma, de la aplicación de Nx. En el tratamiento 1 (T1), cada cabra recibió una inyección (iv) de 0.4 mg de Naloxona a las 32, 64 y 96 horas después de administrar el GnRH. En el tratamiento 2 (T2), las cabras fungieron como testigos del tratamiento 1, inyectándoseles en los mismos tiempos que el T1, 2 ml (iv) de solución salina fisiológica.



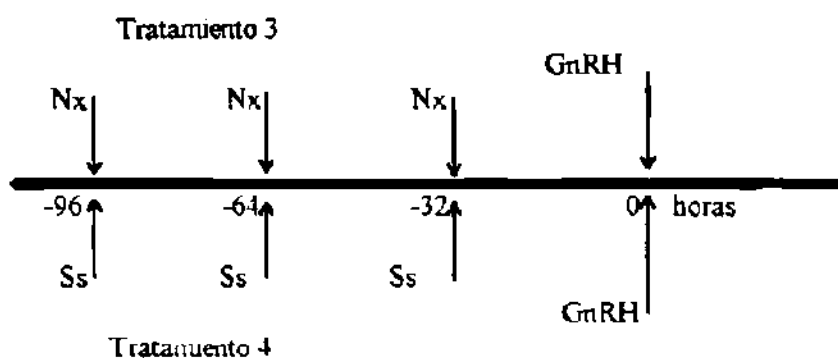
² Cystorelin, Sanofi, Animal Health, Inc. USA

³ Sigma Laboratories, USA

3.3.2. Tratamientos con Naloxona (3) y solución salina (4) antes del GnRH

Los tratamientos 3 y 4 tuvieron como propósito estudiar la secreción hipofisaria de LH en respuesta a GnRH y a un pretratamiento con Naloxona. En el tratamiento 3 (T3), cada cabra, recibió 0.4 mg de Nx iv a las -96, -64 y -32 horas respectivamente, o sea antes de la administración de GnRH. En el Tratamiento 4 (T4), programado como testigo para el tratamiento 3, a cada uno de los animales, se le aplicó 2 ml de solución salina fisiológica iv en los mismos tiempos en que se administró la Naloxona del T3 antes de la aplicación del GnRH.

Diagrama de aplicaciones



3.3.3. Muestreos y análisis hormonales

Como referencia y conocimiento, previo a cada aplicación de los compuestos, en los T1, T2, T3 y T4 se muestreo cada 4 hs durante las 12 hs antecedentes para evaluar LH endógena. Para la caracterización de la respuesta a GnRH, Nx y Ss, se tomaron muestras sanguíneas de 5 ml por cabra mediante punción en la vena yugular. La obtención de muestras fue cada cuatro horas (h) iniciando 12 horas antes de administrar los tratamientos.

Con el propósito de caracterizar el pico inducido de LH en respuesta a GnRH, se realizaron muestreos intensivos cada 15 min por 10 hs, para T1 y T2 inmediatamente después de aplicar el GnRH en la hora 0 y en la hora 96 al administrar Nx y Ss respectivamente a estos dos tratamientos. Para los tratamientos T3 y T4, se consideró la misma metodología en la hora -96 para Nx y Ss respectivamente, al igual que en la hora 0, al final del experimento para GnRH. Para los muestreos de los cuatro tratamientos durante las horas 32, 64, -64 y -32 respectivamente para T1, T2, T3 y T4, el muestreo, también intensivo, se realizó cada 20 min por seis hs.

Cronograma de aplicación y muestreo sanguíneo de los tratamientos 1 y 2

Día	Hora	Aplicación		Inicio	Muestreo	
		T1	T2		frecuencia	Tiempo programado
-1	18:00	—	—	18:00	cada 4 hs/12 hs	h -12:00
0	06:00	GnRH	GnRH	06:00	cada 15 min/10 hs	h 0:00
1	14:00	Nx	Ss	14:00	cada 20 min/6 hs	h 3:20
2	22:00	Nx	Ss	22:00	cada 20 min/6 hs	h 6:40
4	06:00	Nx	Ss	06:00	cada 15 min/10 hs	h 9:00
4	18:00	—	—	18:00	cada 4 hs/12 hs	h 10:00

Cronograma de aplicación y muestreo sanguíneo de los tratamientos 3 y 4

Día	Hora	Aplicación		Inicio	Muestreo	
		T3	T4		frecuencia	Tiempo programado
-5	18:00	—	—	18:00	cada 4 hs/12 hs—	h -10:00
-4	06:00	Nx	Ss	06:00	cada 15 m/ 10h.	h -9:00
-3	14:00	Nx	Ss	14:00	cada 20 m/ 6h	h -6:40
-2	22:00	Nx	Ss	22:00	cada 20 m/ 6 h	h -3:20
0	06:00	GnRH	GnRH	06:00	cada 15 m/ 10 h	h 0:00
0	18:00	—	—	18:00	cada 4 hs/12 hs—	h 12:00

Después de la extracción, las muestras se colocaron en contenedores con hielo por un tiempo máximo de media hora y fueron llevadas al laboratorio, donde se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se separó el suero y se congeló a -20°C hasta el momento en que se realizó la determinación hormonal de LH.

El análisis desglosado para caracterizar la respuesta a la aplicación de tratamientos después de cada muestreo se realizó tomando como base el siguiente esquema.

Abreviaciones indicativas de la administración de tratamientos (T) para iniciar los muestreos M1, M2, M3 y M4 correspondientes a cada uno de los tratamientos (T1, T2, T3, T4).

Muestreo	Tratamiento	Muestreo	Tratamiento
M1T1	GnRH⊕	M1T3	Nx⊕
M2T1	GnRH+Nx⊕	M2T3	Nx+Nx⊕
M3T1	GnRH+Nx+Nx⊕	M3T3	Nx+Nx+Nx⊕
M4T1	GnRH+Nx+Nx+Nx⊕	M4T3	Nx+Nx+Nx-GnRH⊕
M1T2	GnRH⊕	M1T4	Ss⊕
M2T2	GnRH+Ss⊕	M2T4	Ss+Ss⊕
M3T2	GnRH+Ss+Ss⊕	M3T4	Ss+Ss+Ss⊕
M4T2	GnRH+Ss·Ss+Ss⊕	M4T4	Ss+Ss+Ss+GnRH⊕

⊕ Indica el compuesto aplicado antes del muestreo.

Su explicación es como sigue. M1T1 corresponde al muestreo 1 realizado después de administrar GnRH (⊕) en T1. Otro ejemplo. M4T3 corresponde al muestreo después de aplicar

GnRH posterior al tratamiento con Nx en el T3, destacando que previamente y de acuerdo al esquema de tratamientos presentado en la Figura 2, se hicieron tres administraciones de Nx que tuvieron cada una en su momento, el muestreo correspondiente

3.4. Radioinmunoanálisis para LH

Las concentraciones séricas de LH se determinaron en el Banco de Hormonas Proteicas del Centro de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, mediante la técnica propuesta por Niswender et al. (1969) para radioinmunoanálisis (RIA) con doble anticuerpo. El volumen de suero sanguíneo utilizado para la realización del RIA fue de 50 µl por cada muestra

Para el proceso de marcaje de la hormona LH con el isótopo radiactivo ^{125}I , se utilizo Iodogen como trazador iodado tomando como base el método descrito por Fraker y Speck (1978), citados por Chard (1987). Para el procedimiento de Marcaje se utilizaron los siguientes compuestos: 500 µCi de ^{125}I , 5 µg de hormona (USDA-bLH-B-6, AFP-11743B), 1.5 µg de IODO-GEN; 6 µg de Metabisulfito de Sodio (200 µl); 20 µg de Ioduro de Potasio (200 µl); 200 µl de PB (solución amortiguadora de fosfato) al 0.05M.

Una vez que se hizo la mezcla con esos compuestos en cada uno de los tubos, se colocaron en la columna de Sephadex 650-150, establecido el complejo anticuerpo-LH, fue precipitado usando un segundo anticuerpo (suero de cabra anti-IgG de conejo) Después de la incubacion, se removió el sobrenadante y la radiación precipitada fue contada en un lector de rayos gama. Con base en los resultados del ensayo preparatorio para el RIA, y de acuerdo a la actividad específica, eficiencia de marcaje y precipitabilidad del iodo en el marcaje, se alicuotaron muestras de 5000000 cuentas por minuto (cpm) aproximadamente en 5000 µl de PB-BSA (albumina sérica bovina) al 1% quedando aproximadamente 46000 cpm en 50 µl

Actividad específica, eficiencia de marcaje y precipitabilidad del iodogen el ensayo preparatorio para el RIA

ACTIVIDAD ESPECIFICA = 38.14 µCi/µg PROT.		
EFICIENCIA DE MARCAJE		=71.62%
IODO TOTAL =	263.3µCi	
PRECIPITABILIDAD		
FRACCION 6		= 86.0 %
FRACCION 7		= 86.0 %
IODO-GEN:	1.5 µCi	
IODO TEÓRICO:	0.5 µCi	
IODO RECUPERADO:	263.3 µCi	

Protocolo de curva estándar para las determinaciones hormonales de LH

	Amortiguador	1 ^o Anticuerpo (Ab)	H*	2 Ab	Proceso	Pansorbina	Proceso
CT			25 µl		<u>Incubar</u>	1000 µl	<u>Incubar</u>
UNE	975 µl		25 µl		<u>a</u>	1000 µl	<u>a</u>
B _v	775 µl	200 µl	25 µl	200 µl	4°C	1000 µl	tempera- tura
0.1	100 µl	625 µl	200 µl	25 µl	200 µl	1000 µl	ambiente
0.2	100 µl	625 µl	200 µl	25 µl	200 µl	1000 µl	por
0.4	100 µl	625 µl	200 µl	25 µl	200 µl	1000 µl	30 minutos
0.8	100 µl	625 µl	200 µl	25 µl	200 µl	1000 µl	<u>Centri- fugar</u>
1.6	100 µl	625 µl	200 µl	25 µl	200 µl	1000 µl	<u>a</u>
3.2	100 µl	625 µl	200 µl	25 µl	200 µl	1000 µl	4°C
6.4	100 µl	625 µl	200 µl	25 µl	200 µl	1000 µl	por 30 min
12.8	100 µl	625 µl	200 µl	25 µl	200 µl	1000 µl	a 3000 rpm

Titulación del primer anticuerpo

El protocolo anterior se elaboró después de la preparación del primer anticuerpo, que se realizó tomando una alícuota de 100 µl (dilución 1:300) de anti bLH (USDA), esta se diluyó en 3.33 ml de PBS-EDTA (100 ml y 0.76 gr respectivamente). Se realizaron diluciones desde 1:10000 hasta 1:320000 Posteriormente con esas diluciones y en presencia del antígeno marcado (bLH), se corrió la prueba de inmunoreactividad (RIA) con el propósito de conocer la dilución óptima del primer anticuerpo (anti bLH), obteniéndose una solución de trabajo de 1:40000 con una efectividad de 44.38 %.

En la penúltima parte del proceso, se mezcló el complejo anticuerpo-LH con pansorbina, misma que se preparó de la siguiente forma: 1.-en cada tubo se pusieron 15µl de la solución original; 2.-se centrifugo a 3000 rpm durante 10 minutos; 3.-se decantó el sobrenadante; 4 -se restituyó el volumen original y se centrifugó; 5.-Nuevamente se decantó el sobrenadante, y 6 -se resuspendió la pansorbina en 1 ml por tubo. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 5.60 y 18.31 por ciento respectivamente.

3.5. Variables en estudio

Los perfiles de LH se usaron para: 1.-Caracterizar el patrón (frecuencia y amplitud) pulsátil de la LH. 2.-Determinar si existen cambios en la secreción basal de LH en respuesta a los

tratamientos aplicados a las cabras experimentales. 3 -Establecer las características del pico preovulatorio. Por lo anterior se estudiaron las variables que a continuación se describen.

Patrón secretorio de LH. Cambios a través del tiempo de muestreo, reflejados en los niveles basales, características del pico preovulatorio, amplitud y frecuencia de pulsos de LH en los animales tratados y no tratados con Nx, así como antes y después del GnRH.

Pulso de LH, un pulso ocurrió cuando se presentó un aumento en la concentración de la hormona desde una muestra a la siguiente en la cual se excedió tres veces el nivel basal, mismo que fue seguido por una disminución gradual durante las dos siguientes muestras (Martin et al., 1983).

Amplitud de un pulso, se toma como la diferencia entre el nivel basal (promedio de los 10 valores más bajos) y las concentraciones máximas alcanzadas durante los pulsos en un periodo de muestreo. Esta variable depende de la frecuencia de los pulsos, misma que a su vez, está determinada por el estado fisiológico en que se encuentra la cabra. Durante el anestro estacional así como durante la fase lútea, la frecuencia de pulsos es baja, sin embargo la amplitud es grande (Martin et al., 1983)

Frecuencia de pulsos, es la cantidad de pulsos observados en un periodo de tiempo. En la fase lútea y durante el anestro se presenta un pulso cada tres o cuatro horas, mientras que durante la fase folicular se presentan de 4 a 6 por hora (Martin et al., 1983)

Características del Pico Preovulatorio de LH Para efectos de este trabajo se adopta la propuesta de Clarke (1995), quien considera que un pico preovulatorio de LH ocurre cuando los valores séricos se elevan por encima de 10 ng/ml y permanecen por arriba de este nivel al menos por tres horas.

Respuesta Ovulatoria y tiempo a la misma: Se considerará que una cabra ovuló en respuesta a GnRH cuando en un periodo de entre 4 y 10 horas después de su aplicación se detecte el pico preovulatorio de LH (McLeod y Haresign, 1984).

3.6. Análisis estadístico

A los datos generados en las variables continuas, concentración máxima, concentración promedio, pico preovulatorio de LH, tiempo a la concentración máxima y duración del pico preovulatorio de LH se realizaron análisis de varianza para determinar las diferencias entre

grupos. Se utilizó la prueba de X^2 para establecer independencia entre grupos para la variable discreta presentación de pico preovulatorio de LH (Olivares, 1994).

4. RESULTADOS

4.1. Niveles basales de LH

Los niveles basales de LH detectados (Cuadro 1) fueron similares ($P>0.05$) para todos los grupos de cabras, resultando para T1, 1.83 ng/ml, para T2, 1.96, para T3, 1.36 ng/ml y para T4, 1.40 ng/ml.

4.2. Niveles séricos de LH antes de iniciar tratamientos

Los valores obtenidos en la hora 0 (Cuadro 1), inmediatamente antes de aplicar los tratamientos fueron: 4.22 para T1, 4.23 para T2, 4.40 para T3 y 3.84 para T4 ng/ml, los cuales no fueron significativos ($P>0.05$) entre y dentro de tratamientos al compararse también los valores de las muestras obtenidas 12, 8 y 4 horas antes de la primera administración de GnRH. Nx y Ss en los tratamientos.

4.3. Respuesta a Nx, cambios en amplitud y frecuencia de Pulsos (Cuadros 1-4; Figura 3)

Los perfiles de secreción de LH en las cabras tratadas con Nx se muestran en el Cuadro 1. No se contemplan diferencias en los niveles de LH en la hora 0 ($P>0.05$), ni en la concentración promedio de LH ($P>0.05$) entre tratamientos. Las cabras que fueron tratadas con Nx antes del GnRH (T3), tuvieron un pico máximo de LH superior ($P<0.05$) a las de los tratamientos 1, 2 y 4. El nivel máximo de LH se presentó más tarde ($P<0.05$) en los tratamientos basados en Nx: (T1 a las 4.57 hs y T3 a las 5.11 hs) que en los que recibieron Ss antes (T4, 3.69 hs) o después del GnRH (T2, 3.00 hs). En la Figura 1, se presentan las gráficas correspondientes a los perfiles de LH observados después de la aplicación de Nx o Ss con o sin pretratamiento de GnRH.

En lo referente a la frecuencia y amplitud de pulsos de LH (Cuadro 2); el número total de pulsos de esta hormona por tratamiento en seis horas, no fue influenciado ($P>0.05$) por la administración de Nx o Ss antes (T3=20 y T4=16) ó después (T1=12 y T2=12) de aplicar la inyección de GnRH. La amplitud media de LH por pulso, fue significativamente superior ($P<0.05$) para los tratamientos en los cuales se administró Nx antes de GnRH (T3=6.84 y

T4=5.85) en comparación con T1 (4.58) y T2 (4.93), en los que la Naloxona se aplicó después de GnRH.

Cuadro 1
Respuesta de LH (ng/ml) en cabras tratadas con Naloxona y solución salina fisiológica durante el anestro estacional*

	T1 (GnRH+Nx)	T2 (Ss)	T3 (Nx)	T4 (Ss)	Nivel de significancia
Hora cero	4.22	4.23	4.40	3.84	P>0.05
Nivel basal	1.83	1.96	1.36	1.40	P>0.05
Promedio	4.44	4.26	5.86	4.40	P>0.05
Pico máximo*	5.77b	6.38b	9.44a	6.49b	P<0.05
Hora del pico máximo*	4.57a	3.00b	5.11a	3.69b	P<0.05

*Datos generados al promediar los valores correspondientes a cada cabra dentro de los tratamientos

*Diferente literal en hileras indica diferencias significativas.

Cuadro 2
Total de pulsos en seis horas y amplitud media (ng/ml) de LH sérica por pulso en cabras en anestro estacional tratadas con Nx y Ss antes o después de GnRH

	Antes de GnRH		Después de GnRH		Nivel de significancia
	Nx	Ss	Nx	Ss	
Total de pulsos de LH	20	16	12	12	P> 0.05
Amplitud media de LH/pulso*	6.84 ^a	5.85 ^a	4.58 ^b	4.93 ^b	P< 0.068

*Diferente literal en hileras indica diferencias significativas.

La información anterior fue confirmada al comparar los efectos de la Naloxona administrada sola, con (T1) o sin (T3) pretratamiento de GnRH (Cuadro 3). En ese sentido, se observa que tanto el número total y la amplitud de los pulsos de LH en respuesta a Nx, son afectados en forma negativa por la administración previa de GnRH (Figura 1).

Cuadro 3
Total de pulsos y amplitud (ng/ml) de pulsos observados en seis horas en cabras en anestro estacional que recibieron Nx y un pretratamiento con y sin GnRH

	Naloxona		Nivel de significancia
	Con GnRH	Sin GnRH	
Total de pulsos de LH*	12b	20a	P< 0.05
Amplitud media de LH/pulso*	4.53b	6.84a	P< 0.05

*Diferente literal en hileras indica diferencias significativas.

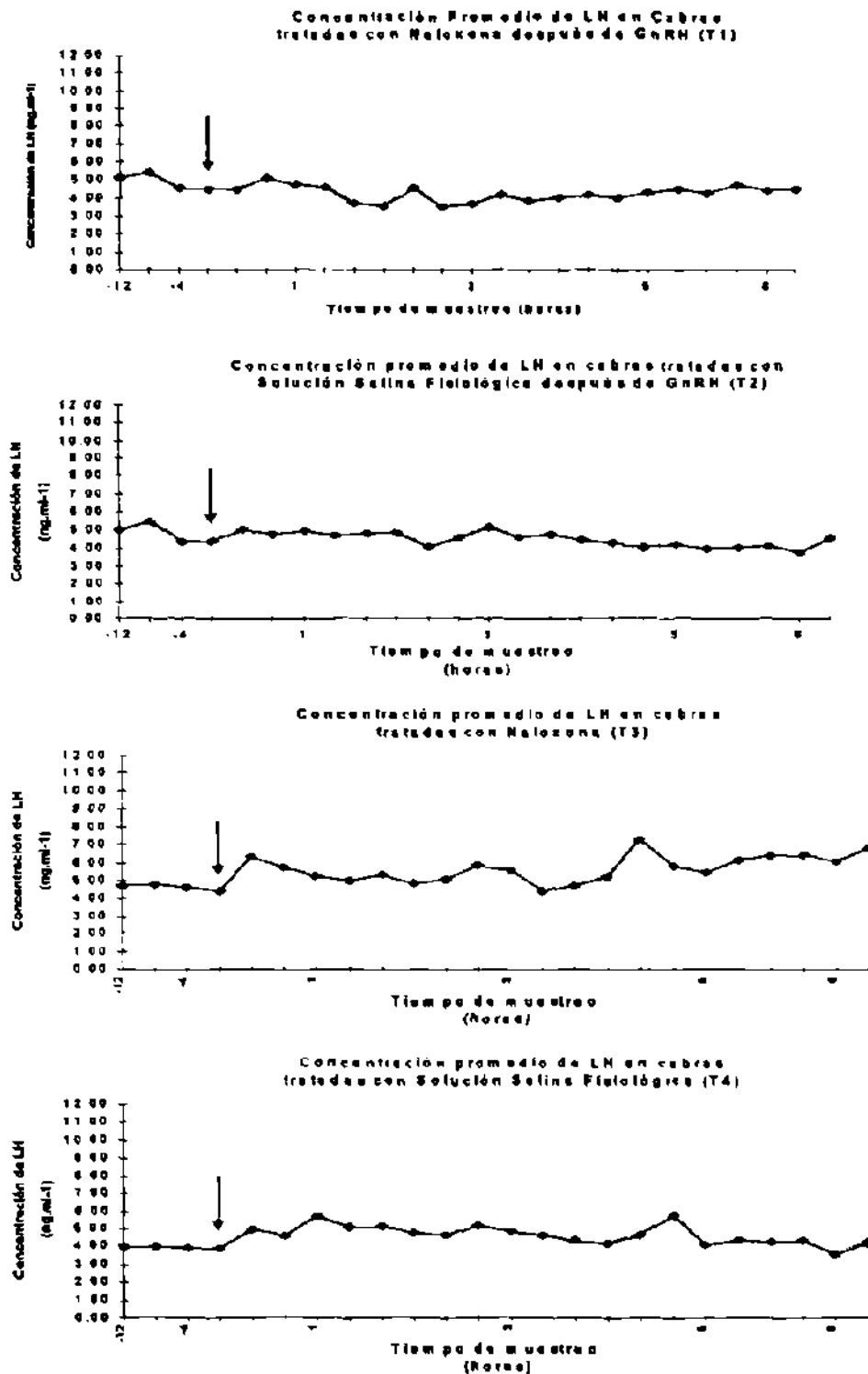


Figura 1.-Concentración promedio de LH en los grupos de cabras tratadas con Nx y Ss. con y sin GnRH previo. Los datos utilizados para la elaboración de estas gráficas, se obtuvieron del promedio general de tratamientos, no del promedio de valores por cabra como correspondió a la información presentada en los cuadros y que estuvo sujeta a los análisis estadísticos. Las flechas indican la hora 0, momento de aplicación de compuestos.

Entre las cabras testigo (T2 y T4), la frecuencia total y la amplitud de pulsos de LH no estuvieron influenciadas por el momento en que GnRH se aplicó, ya sea antes o después de la Naloxona (Cuadro 4; Figura 1).

Cuadro 4
Total de pulsos y amplitud media (ng/ml) en seis horas en cabras en anestro estacional que sirvieron como testigo y a las cuales solo se administró Ss con o sin tratamiento previo de GnRH

	Solución Salina		Nivel de significancia
	Con GnRH previo	Sin GnRH previo	
Total de pulsos de LH	12	16	P> 0.05
Amplitud media de LH/pulso	4.93	5.85	P> 0.05

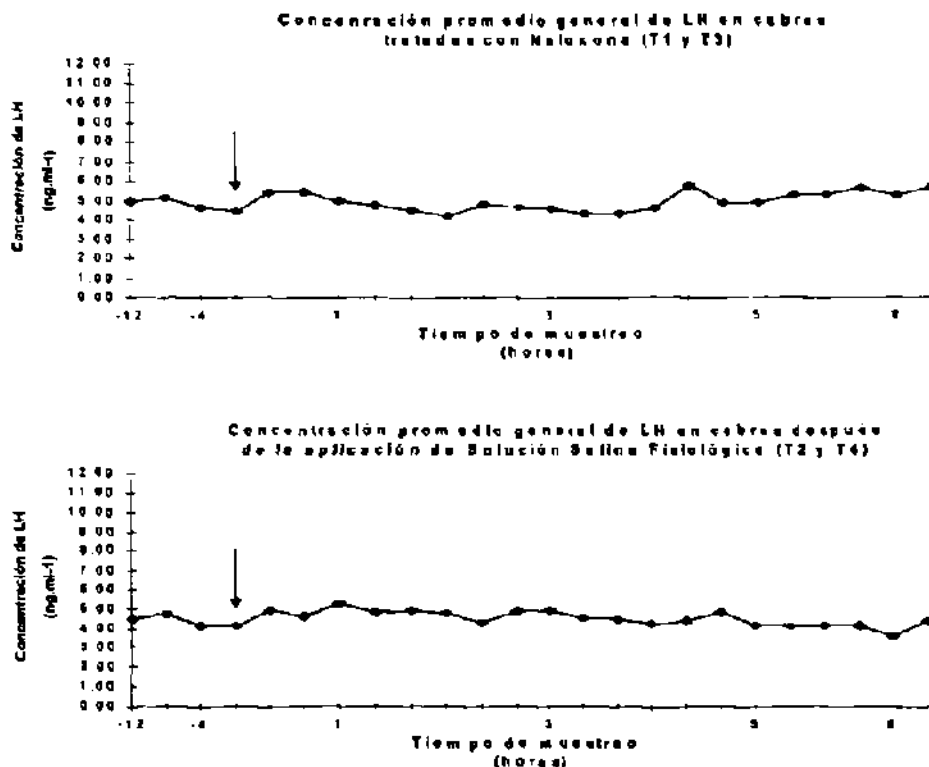


Figura 2.-Concentración promedio general de LH conjunta para los grupos de cabras tratadas con Nx (T1 y T3) y para los grupos a los que se administró Ss (T2 y T4). Los datos utilizados para la elaboración de estas gráficas, se obtuvieron del promedio general de tratamientos, no del promedio de valores por cabra como correspondió a la información presentada en los cuadros y que estuvo sujeta a los análisis estadísticos. Las flechas indican la hora 0, momento de aplicación de compuestos.

4.4. Efecto del GnRH sobre concentración y pico preovulatorio de LH (Cuadro 5; Figura 3)

En el Cuadro 5, se hace una comparación de las características de liberación de LH en respuesta a los tratamientos en los muestreos, inmediatamente después de que se administró GnRH dentro del Experimento. La concentración de LH antes del GnRH, es estadísticamente similar para los cuatro grupos a pesar de que en T3 es ligeramente superior.

La concentración máxima de LH observada en respuesta a los tratamientos queda como sigue: en GnRH (T1 y T2; 44.2416 ng/ml), es significativamente superior ($P < 0.01$) a los otros grupos. Al comparar T3 (16.053 ng/ml) y T4 (solución salina más muestreo intensivo más GnRH; 21.665 ng/ml) no se detectan diferencias ($p > 0.05$) significativas entre ellos; sin embargo, al compararlos con Ss (T4, primera administración; 6.0259 ng/ml) son completamente diferentes ($P < 0.01$). El tiempo a la concentración máxima de LH es similar para los tres grupos a los cuales se administró GnRH (T1 y T2 en promedio 2.19 h, T3: 1.69 h, y T4 2.56 h), y estos a su vez fueron menores ($P < 0.0001$) que los del grupo tratado con Ss (6.92 h). La concentración media de LH es mayor ($P < 0.05$) para el grupo T1 y T2 donde se observan 13.95 ng/ml. Los otros grupos no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos. Las concentraciones quedaron como sigue 4.34 ng/ml para T3, 5.65 ng/ml para T4, y 4.97 ng/ml para Ss

En lo que se refiere a la presentación del pico preovulatorio de LH y de acuerdo a la definición base de este trabajo, se puede decir que solamente T1 y T2 (analizados conjuntamente) lo alcanzaron al tener niveles sanguíneos promedio de 22.39 ng/ml y una duración de 5.03 horas, no así los grupos T3 y T4 que a pesar de tener concentraciones de 12.79 y 14.32 ng/ml respectivamente, el tiempo de duración de 1.62 y 2.87 h respectivamente para cada uno de los grupos no les proporciona la categoría de pico preovulatorio (Cuadro 5).

Cuadro 5
Características de liberación de LH en respuesta a GnRH administrado solo, con un pretratamiento de Naloxona y después de un muestreo intensivo

	T1 y T2 GnRH	T3 Nx+GnRH	T4 Ss+GnRH	Ss	Nivel de significancia
n=	8	4	4	3	
Concentración de LH en hora 0	3.91a	5.53a	4.17a	3.32a	$P > 0.05$
Concentración máxima de LH*	44.24a	16.05b	21.66b	6.03c	$P < 0.01$
Tiempo a la concentra- ción máxima*	2.19b	1.69c	2.56b	6.92a	$P < 0.01$

Cuadro 5 (Continuación)
Características de liberación de LH en respuesta a GnRH administrado solo, con un pretratamiento de Naloxona y después de un muestreo intensivo

	T1 y T2 GnRH	T3 Nx+GnRH	T4 Ss+GnRH	Ss*	Nivel de significancia
Concentración media de LH*	13.95a	4.34b	5.65b	4.97b	P<0.01
Pico preovulatorio*	Si	No	No	No	P<0.01
Concentración promedio de LH en aumento sostenido de LH.*	22.39a	12.79b	14.32b	—	P<0.05
Duración (h) del aumento sostenido de LH*	5.03a	1.62b	2.87b	—	P<0.01

T1 y T2: Valores promedio de tratamientos 1 y 2 que recibieron solamente y al mismo tiempo GnRH, no hubo tratamientos y muestreos sanguíneos intensivos previos. T3: Grupo de cabras que recibieron previo al GnRH, Naloxona y se sometieron a muestreos sanguíneos intensivos. T4: Grupo de cabras que recibieron Solución Salina fisiológica y se sometieron a muestreos sanguíneos intensivos previos al GnRH. Ss: Grupo de cabras testigo que recibieron una inyección de 2 ml de Solución Salina fisiológica sin muestreos sanguíneos intensivos previos; los valores de LH de esta columna son tomados como referencia y corresponden a las muestras tomadas después de la primera administración de Ss en T4. Valores son expresados en media de tratamientos. *Diferente literal en itálica, indica diferencias significativas entre tratamientos. Las concentraciones son en ng LH/ml de suero sanguíneo. El tiempo transcurrido de la respuesta a la concentración máxima y la duración de la elevación sostenida en la concentración de LH es en horas.

La frecuencia total de pulsos de LH observada en respuesta a GnRH en cabras durante el anestro estacional, fue independiente ($P>0.05$) de la administración de Nx (Cuadro 6). La amplitud media de los pulsos de LH detectados después de la administración de GnRH fue superior ($P<0.005$) para las cabras de T1 y T2 que conjuntamente promediaron 28.22 ng/ml de LH en comparación de 10.09 ng/ml de T3 y 15.82 ng/ml obtenidos en T4 (Cuadro 6).

Los perfiles de LH en respuesta al GnRH se presentan en la Figura 3, las gráficas fueron realizadas a partir de los valores promedio por tratamiento, en ellas se demuestran claramente las diferencias entre tratamientos.

Cuadro 6
Efecto del pretratamiento con y sin Nx y Ss sobre el total de pulsos de LH en 10 horas de muestreo y amplitud media de LH sérica en respuesta a GnRH por tratamiento en cabras en anestro estacional

LH	GnRH			Nivel de significancia
	Con Nx (T3)	Con Ss (T4)	Sin Nx (T1 y T2)	
Total de Pulsos por tratamiento	4	8	15	$P>0.05$
Amplitud media/pulso*	10.09b	15.82b	28.22a	$P<0.005$

*Diferente literal en itálica, indica diferencias significativas.

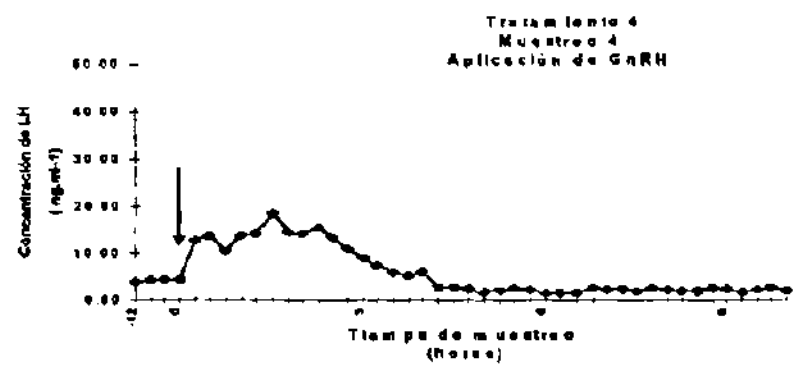
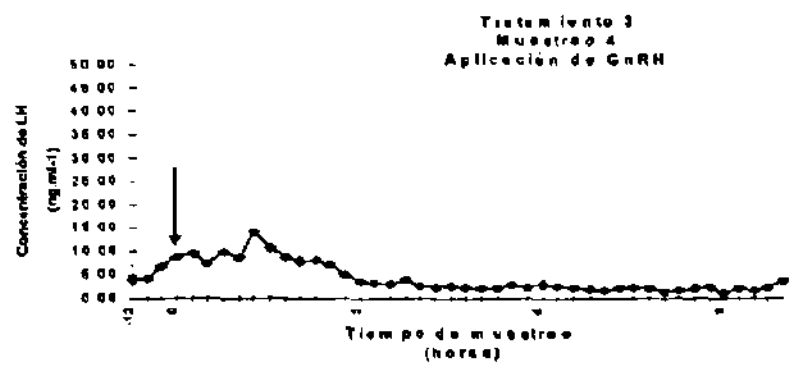
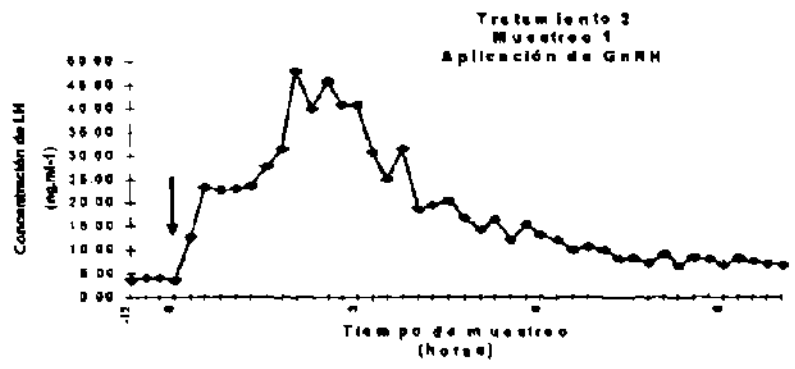
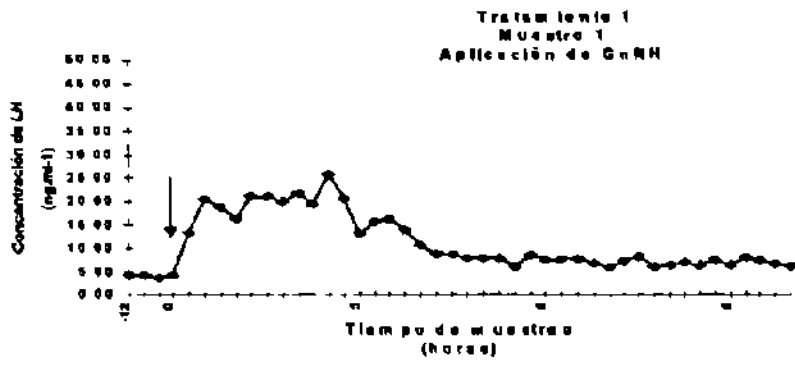


Figura 3.-Concentración promedio de LH en respuesta a GnRH en los diversos grupos de cabras tratados. Los datos utilizados para la elaboración de estas gráficas, se obtuvieron del promedio general de tratamientos, no del promedio de valores por cabra como correspondió a la información presentada en los cuadros y que estuvo sujeta a los análisis estadísticos. Las flechas indican la hora 0, momento de aplicación de compuestos.

4.5. Respuesta en la secreción de LH por muestreo, después de administrar cada uno de los compuestos incluidos en los tratamientos

4.5.1. Muestreo 1 (Cuadro 7)

Corresponden a este muestreo, el primero (Cuadro 7), las diferencias significativas entre tratamientos más destacadas. Antes de señalarlas, es importante hacer notar que la concentración sérica de LH no fue diferente ($P > 0.05$) entre los cuatro tratamientos en las horas de muestreo -12, 0 y 12 en relación a la administración de GnRH, Nx y Ss. La concentración promedio de LH fue significativamente superior ($P < 0.001$) en las cabras a las cuales se administró GnRH en los tratamientos 1 y 2 (de los que se presenta un promedio de respuesta). Los picos máximos de la gonadotropina en estos tratamientos, también fueron muy superiores ($P < 0.001$) en relación a las cabras que recibieron inyecciones de Nx y Ss. Estos últimos tratamientos no tuvieron diferencias significativas, pero sí lo fueron cuantitativamente, siendo la Naloxona quien elevó ligeramente los niveles de LH.

La elevación (pico) máxima de hormona luteinizante se presentó más temprano ($P < 0.001$) en las cabras tratadas con GnRH, y en ellas la descarga de LH fue del tipo preovulatorio (dentro de la cual se incluye la elevación máxima) y se inició inmediatamente después (a los 15 minutos) de administrar el decapeptido. Después de administrar la Naloxona se presentó en aproximadamente 49 minutos la elevación máxima de LH y fue diferente a la concentración máxima de LH observada en tratamiento 4, donde se administró solamente solución salina, ambas elevaciones no fueron del tipo preovulatorio, y dado el tiempo en que se presentaron, no necesariamente corresponden a una respuesta a los tratamientos (Cuadro 7).

Cuadro 7

Características de la concentración de LH (ng/ml) en diferentes momentos dentro del muestreo I en respuesta a los diferentes tratamientos.

	MIT1 y 2	MIT3	MIT4	Nivel de significancia
Hora -12	3.94	3.93	3.76	$P > 0.05$
Hora 0	3.91	3.94	3.32	$P > 0.05$
Hora 12	6.26	7.06	4.85	$P > 0.05$
Promedio*	13.95a	7.49b	4.97b	$P < 0.001$
Elevación máxima*	44.24a	12.03b	6.02c	$P < 0.001$
Hora de elevación máxima*	2.19a	5.75b	6.92b	$P < 0.001$

*Diferente literal en hileras indica diferencias significativas.

Cuadro 7 (Continuación)
Características de la concentración de LH (ng/ml) en diferentes momentos dentro del muestreo 1 en respuesta a los diferentes tratamientos

	M1T1 y T2	M1T3	M1T4	Nivel de significancia
Inicio de elevación máxima	12.95	No	No	
Hora de inicio de elevación máxima	0:15			

*Diferente literal en hileras indica diferencias significativas.

4.5.2. Muestreo 2 (Cuadro 8)

En el Cuadro 8, las diferencias significativas detectadas entre los tratamientos dentro del muestreo dos, se observaron en la variable concentración de LH al final de la elevación máxima, correspondiendo al tratamiento 3, el valor más alto.

Cuadro 8
Características de la concentración de LH (ng/ml) en diferentes momentos dentro del muestreo 2 (M2) en respuesta a los tratamientos (T)

	M2T1	M2T2	M2T3	M2T4	Nivel de significancia
Hora -12	6.18	6.61	5.34	4.66	P>0.05
Hora 0	4.10	4.90	5.61	4.79	P>0.05
Hora 12	4.34	5.40	5.18	4.05	P>0.05
Promedio	4.81	4.83	5.33	3.97	P>0.05
Pico máximo	6.02	6.83	6.82	5.79	P>0.05
Hora del pico máximo	4:55	4:15	3:00	2:05	P>0.05
Inicio del pico	5:48	6:44	5:86	5:79	P>0.05
Hora de inicio del pico	2:55	3:30	1:25	2:05	P>0.05
Final de pico*	4.12a	4.48a	2.67b	3.51a	P<0.05
Hora al final de pico	8:25	5:25	8:34	2:30	P>0.05

*Diferente literal en hileras indica diferencias significativas.

4.5.3. Muestreo 3 (Cuadro 9)

En el Cuadro 9, se resume la información generada por cada uno de los grupos de animales tratados incluidos en el muestreo tres. Solamente la variable, hora en que se presentó la elevación máxima de LH, específicamente para el tratamiento 3, fue superior y diferente ($P<0.05$) a los demás tratamientos.

Cuadro 9

Características de la concentración de LH en diferentes momentos dentro del muestreo 3, en respuesta a los diferentes tratamientos.

	M3T1	M3T2	M3T3	M3T4	Nivel de significancia
Hora -12	4.86	5.50	4.93	3.65	P>0.050
Hora 0	4.44	4.62	3.64	3.40	P>0.050
Hora 12	4.31	3.78	5.54	3.52	P>0.050
Promedio	4.81	4.73	4.77	4.28	P>0.050
Pico máximo	6.65	7.52	9.45	7.65	P>0.050
Hora del pico máximo*	2:55b	1:45b	6:35a	2:05b	P<0.050

*Diferente literal en hileras indica diferencias significativas.

4.5.4. Muestreo 4 (Cuadro 10)

En el muestreo 4, la concentración de LH, doce horas antes de administrar los tratamientos fue similar en todos los grupos (>0.05); sin embargo, en la hora 0, el tratamiento 3 presentó niveles séricos de LH superiores al resto de los tratamientos; este aspecto no influyó en la concentración promedio de LH a pesar de que cuantitativamente fue superior en los tratamientos 4 y 3 (Cuadro 10).

Cuadro 10

Características de la concentración de LH (ng/ml) en respuesta a los diferentes tratamientos dentro del muestreo 4.

	M4T1	M4T2	M4T3	M4T4	Nivel de significancia
Hora -12	4.42	3.64	3.95	3.91	P>0.05
Hora 0*	4.14b	3.18b	7.19a	4.17b	P<0.05
Hora 12*	3.48a	2.77ab	2.44ab	1.85b	P<0.10
Promedio	3.70	3.23	4.34	5.65	P>0.05
Pico máximo*	4.64b	4.75b	16.05a	21.66a	P<0.05
Hora del pico máximo	5:52a		1:41b	2:34b	P<0.05

*Diferente literal en hileras indica diferencias significativas.

El pico máximo de LH detectado en los tratamientos 3 y 4, fue significativamente ($P<0.05$) más alto que el observado en los tratamientos 1 y 2. Entre los primeros (3 y 4), también se presentaron diferencias. En relación a la respuesta diferente que se presentó entre los tratamientos con (3) y sin (4) Naloxona antes, se observó que el GnRH sin Naloxona previa provocó una mayor liberación de LH. Esos aumentos en la secreción de LH tardaron en presentarse no más de

dos horas y media, en el caso del tratamiento 1, la elevación máxima observada se presentó casi seis horas después de administrar Naloxona y al igual que en este tratamiento, en el 2, no se rebasaron los 5 ng/ml. Doce horas después de administrar los tratamentos, la LH descendió a niveles basales en los cuatro grupos. Se observa que los grupos testigos (T2 y T4), tratados solución salina antes o después del GnRH tuvieron concentraciones más bajas que los tratados en T1 y T3 (Cuadro 10).

4.6. Respuesta Comparada entre GnRH, Nx y Ss (Cuadro 11; Figura 5)

Este análisis comparativo incluye la respuesta a GnRH (promedio de los tratamientos 1 y 2; MIT1 y MIT2), Nx (MIT3) y Ss (MIT4) y corresponde a los datos obtenidos durante el primer muestreo, inmediatamente después de la administración de cada uno de los compuestos. En el Cuadro 11, se observa que la concentración de LH en la hora cero, fue similar ($P > 0.05$) para los grupos de cabras que recibieron ya sea GnRH, Naloxona (Nx) o Solución salina fisiológica (Ss). En lo referente a la concentración máxima de LH, los niveles observados en respuesta al GnRH (44.24 ng/ml) son significativamente superiores ($P < 0.01$) a los obtenidos cuando se aplicó Nx (12.04 ng/ml) y estos a su vez son mayores a obtenidos en Ss (6.06 ng/ml).

El tiempo en horas (h), transcurrido después de la administración de los tratamentos al momento de la concentración máxima de LH, fue menor ($P < 0.001$) cuando se aplica GnRH (2.19 h) que cuando se trata con Nx (5.75 h) o con suero salino (6.92 h), la información obtenida de la administración de Ss indica un pico en la concentración de LH, que no necesariamente es una respuesta al tratamiento (Cuadro 11).

La concentración promedio de LH por tratamiento, fue significativamente superior ($P < 0.01$) en los animales tratados con GnRH con 13.95 ng/ml contra 7.49 ng/ml de los que recibieron Naloxona y 4.97 ng/ml de los que se administró Ss. En este caso, al analizar las diferencias entre Nx y Ss se observa nuevamente una concentración mayor de LH en respuesta a Nx a pesar de que no existen diferencias significativas entre ellas (Cuadro 11).

Se presenta pico preovulatorio de LH solo en las cabras que recibieron GnRH como tratamiento (respuesta no independiente de tratamientos, $P < 0.01$), la concentración promedio observada en él fue de 22.39 ng LH/ml y su duración de 5.03 horas cumpliéndose la definición de pico preovulatorio sugerida en la metodología; no es así para las cabras tratadas con Ss y Nx. Una sola de las cabras tratadas con Nx presenta aumentos de LH por encima de los 10 ng LH/ml

sostenidos por tres horas, aunque la elevación no fue inmediata, como en los animales tratados con GnRH, ya que comenzó cuatro horas después de que se administró la Naloxona (Cuadro 11).

La frecuencia total de pulsos de LH fue independiente ($P>0.05$) de la administración de los compuestos utilizados en el estudio. La amplitud media de LH en esos pulsos, fue casi tres veces superior ($P<0.05$) para las cabras tratadas con GnRH (13.56 ng/ml) en comparación con las que recibieron Nx (6.84 ng/ml) o Ss (5.85 ng/ml). En la Figura 5, se plasman las diferencias típicas en los niveles séricos de LH obtenidos en el presente estudio, en respuesta ya sea a GnRH, Nx o Ss.

Cuadro 11
Comparación de las características de liberación de LH (ng/ml) en respuesta a GnRH (T1 y T2), Nx (T3, primera administración) y Ss (T4, primera administración) aplicados en cabras durante el anestro estacional.

	T1 y T2	T3	T4	Nivel de significancia
LH en la hora 0	3.91	3.95	3.32	$P>0.05$
Pico máximo de LH*	44.24a	12.04b	6.03c	$P<0.01$
Hora de pico máximo*	2.19b	5.75a	6.92a	$P<0.001$
Promedio de LH*	13.95a	7.49b	4.97b	$P<0.01$
Presentación de pico preovulatorio*	Si	No	No	$P<0.05$
Concentración de LH en pico	22.39	—	—	
Duración del pico preovulatorio*	5.03a	1.81b	—	$P<0.01$
Total de pulsos de LH en 6 horas	24	25	19	$P>0.05$
Amplitud media de pulsos*	15.36a	6.84b	5.85b	$P<0.05$

Valores son expresados en media de tratamientos. *Diferente literal en hilera indica diferencias significativas entre tratamientos. Las concentraciones de LH son en ng/ml de suero sanguíneo. El tiempo transcurrido de la respuesta a la concentración máxima y la duración de la elevación sostenida en la concentración de LH son en horas.

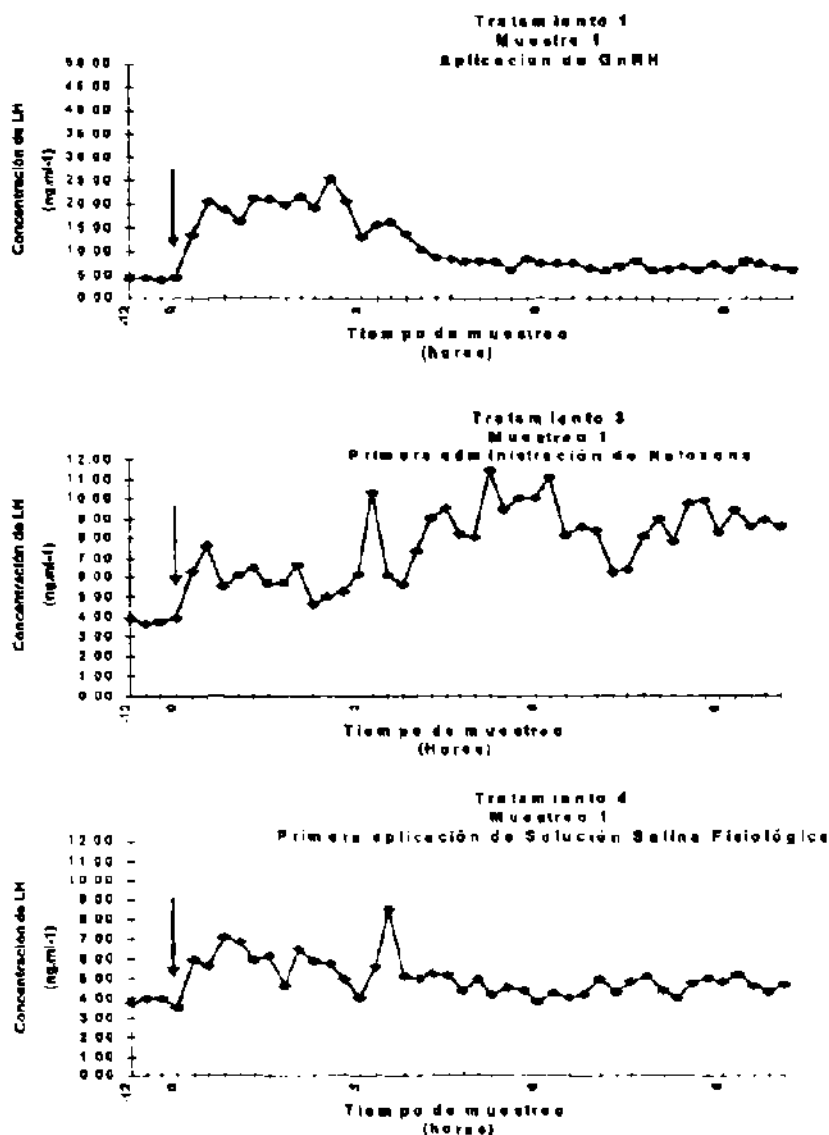


Figura 4.- Comparación de respuesta. Concentraciones séricas promedio de LH en cabras en anestro estacional a las que se inyectaron uno de tres compuestos: GnRH (T1); Nx (T3), y Ss (T4) La flecha indica la hora 0, momento en que fueron administrados los productos químicos y se inició el muestreo sanguíneo cada 15 minutos por 10 horas.

4.7. Efecto general de los tratamientos sobre la secreción de LH

En el Cuadro 12, se presentan en resumen, los efectos que sobre la secreción de LH tuvieron los cuatro tratamientos (T1-T4; ver Figuras 1 y 2) y los compuestos administrados en cada muestreo (M). La diferencia en cuanto al promedio general de secreción de LH, fue altamente significativa solo en respuesta a la administración de GnRH en los tratamientos 1 y 2,

dentro del muestreo 1 (MIT1 y MIT2), y no se afectó por la administración de Naloxona, solución salina y GnRH en los tratamientos 3 y 4 del cuarto muestreo (M4T3 y M4T4).

4.8. Promedio y pico máximo de LH (Respuesta general a tratamientos)

Del Cuadro 13, se desprende que el promedio de LH durante todo el periodo de tratamiento y la elevación (pico) máxima de LH fueron mayores ($P < 0.001$) para aquellos animales tratados con GnRH al principio (T1 y T2) del experimento, que los tratados con él al final (T3 y T4). En lo referente al promedio general de LH, se presentaron diferencias entre ellos, T1 (6.814) fue mejor que T2 (8.364), y T3 (5.714) fue mayor que T4 (4.97). El pico máximo hormonal más alto lo obtuvo T1, le siguieron en orden descendente: T2, T4 y T3. Los valores obtenidos en la variable nivel basal de LH, no presentaron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos (T1=1.83; T2=1.96; T3=1.36, y T4=1.40) incluidos en este trabajo.

Cuadro 12
Análisis de la varianza del efecto de GnRH, Naloxona y solución salina fisiológica administrados solos o combinados sobre la secreción de LH.

Muestreo y Tratamiento	Fuente de variación	Efecto principal	P
M1T1	GnRH⊕	Significativo	<0.001
M2T1	GnRH+Nx⊕	No significativo	>0.05
M3T1	GnRH+Nx+Nx⊕	No significativo	>0.05
M4T1	GnRH+Nx+Nx+Nx⊕	No significativo	>0.05
M1T2	GnRH⊕	Significativo	<0.001
M2T2	GnRH+Ss⊕	No significativo	>0.05
M3T2	GnRH+Ss+Ss⊕	No significativo	>0.05
M4T2	GnRH+Ss+Ss+Ss⊕	No significativo	>0.05
M1T3	Nx⊕	No significativo	>0.05
M2T3	Nx+Nx⊕	No significativo	>0.05
M3T3	Nx+Nx+Nx⊕	No significativo	>0.05
M4T3	Nx+Nx+Nx+GnRH⊕	No significativo	>0.05
M1T4	Ss⊕	No significativo	>0.05
M2T4	Ss+Ss⊕	No significativo	>0.05
M3T4	Ss+Ss+Ss⊕	No significativo	>0.05
M4T4	Ss+Ss+Ss+GnRH⊕	No significativo	>0.05

Cuadro 13
Efecto general total de los tratamientos sobre diferentes parámetros relacionados con los niveles séricos de LH (ng/ml)

	GnRH+Nx	GnRH+Ss	Nx+GnRH	Ss+GnRH	Nivel de significancia
Promedio de LH*	6.81b	8.36a	5.71c	4.97c	$P < 0.001$
Nivel basal de LH	1.83	1.96	1.36	1.40	$P > 0.05$
Pico máximo de LH*	25.75b	47.80a	14.17c	21.28b	$P < 0.001$

*Diferente literal en hileras indica diferencias significativas.

5. DISCUSIÓN

Durante el anestro estacional, las condiciones reproductivas que prevalecen en la cabra son parecidas a las de la oveja, y provocan un patrón de secreción de LH similar al que se observa durante la fase lútea, el anestro lactacional y la gestación. La frecuencia de pulsos de LH en comparación con la fase folicular se reduce significativamente debido a que el generador de pulsos llega a ser extremadamente sensible a las pequeñas pero suficientes cantidades de estradiol que son producidas por los folículos pequeños e intermedios localizados en el ovario durante el anestro estacional (Karsch, 1979). Los días largos también pueden afectar la pulsatilidad en la secreción de LH, sin embargo, su efecto es menos importante que el control realizado por el estradiol (Goodman et al., 1982).

En ovejas, al igual que en cabras, el patrón de secreción de LH, es de naturaleza pulsátil. Los niveles basales son de 0.1 a 2.0 ng/ml para fase lútea y anestro estacional de ovejas y cabras no gestantes (McLeod et al., 1982b; Dobson, 1983). Robinson et al. (1987), indican en ovejas en anestro estacional niveles basales de hasta 8 ng/ml. Gordon et al. (1987), señalan que la concentración basal menor a 1 ng/ml de LH, también es característica de ovejas en anestro lactacional. Los niveles basales de LH para esas etapas concuerdan con el rango de 0.4 y 1.5 ng/ml reportado por Buttle y Morant, (1986) para cabras gestantes.

La secreción basal de LH puede ser interrumpida con pequeños pulsos de vida corta (al menos 30 minutos), cada uno de entre 5 y 15 ng/ml. Durante la fase lútea del ciclo estral y durante el anestro estacional, los pulsos de LH ocurren irregularmente en intervalos de 3 a 12 horas (Baird, 1978; Baird et al., 1976; Scaramuzzi y Baird, 1979; Yuthasastrakosol et al., 1977; Friman y Haresign datos no publicados, citados por McLeod et al., 1982). Gordon et al. (1987), observaron en ovejas en anestro lactacional, la presentación de un pulso de LH cada 6 horas con amplitudes que van desde 1.5 hasta 3.5 ng/ml de LH. Buttle y Morant (1988), reportan pequeñas pero continuas salidas de LH desde la pituitaria de cabras gestantes, con pequeños pero regulares pulsos de LH cada 4 ó 5 horas para un total de 5 a 8 pulsos diarios. Estos hallazgos son similitudes a

los de la fase lútea, el anestro estacional y el anestro lactacional con la periodicidad de los pulsos de LH detectados por ellos durante la gestación de la cabra, en quienes dicen se mantienen.

5.1. Niveles basales de LH

Los niveles séricos basales de LH obtenidos en este trabajo, que son característicos de cabras en anestro estacional, fueron similares para todos los tratamientos y no sobrepasaron el límite superior (2.0 ng/ml de LH) del rango establecido para la misma etapa fisiológica de ovejas (McLeod et al., 1982b) y cabras durante la fase lútea (Dobson, 1983). Estas, son inferiores a 3.5 ng LH/ml, valor máximo promedio obtenido por Kaplan y Katz (1995) en cabras sujetas a fotoperiodos artificiales. Los valores basales de LH en este estudio, se encuentran dentro del rango sugerido por Robinson et al. (1987), que alcanza un nivel máximo de 8 ng/ml para ovejas en anestro estacional.

5.2. Niveles séricos de LH antes de iniciar los tratamientos

Los niveles séricos (alrededor de 4 ng/ml) de LH detectados a las -4, -8, -12 horas y minutos antes de administrar los tratamientos, fueron similares para todos los grupos de cabras. Esto indica uniformidad en el estado fisiológico de anestro estacional en el cual se mantenían, confirmado además, por la ausencia de respuesta biológica aparente a las inyecciones de prostaglandina $F_{2\alpha}$. Estos valores promedio de LH fueron superiores a los niveles basales obtenidos por Robin et al. (1994) en cabras en anestro estacional, cuyo valor máximo promedio fue de 1.0 ng/ml y son también altos en comparación con 1.5 ng/ml, valor reportado como nivel superior del rango considerado como basal reportado por Dobson, (1983) para la fase lútea de cabras. Los valores de LH aquí detectados, están por debajo de los establecidos para la fase folicular, que van desde 5 hasta 100 ng/ml (Dobson, 1983). Sin embargo son similares o ligeramente superiores a los obtenidos (3.5 ng/ml) por Kaplan y Katz (1995) en cabras sujetas a fotoperiodo artificial. Los niveles de LH más altos, pueden ser una característica propia de las cabras durante el

anestro o ser consecuencia del método de RIA empleado, aunque existen reportes de valores de LH que alcanzan hasta 8 ng/ml en ovejas en anestro.

5.3. Respuesta a Nx

Está definida la función inhibitoria de los péptidos opioides sobre la secreción de gonadotropinas, especialmente de LH en diferentes especies, incluyendo la oveja. Esa función inhibitoria depende del sitio receptor y el tipo de opioide involucrado. Aunque para que se presenten esos efectos también es determinante la etapa fisiológica dentro y entre estaciones por la que pasa el animal. En la oveja, el periodo de anestro estacional ha sido comparado con el periodo prepuberal, en los dos periodos la LH esta suprimida por el efecto negativo del estradiol sobre el generador de pulsos de GnRH que en esos tiempos es altamente sensible al esteroide (Cosgrove et al., 1993). Interactuando con el estradiol puede haber mecanismos inhibitorios de origen noradrenérgicos, dopaminérgicos y opioidérgicos (Schall et al., 1991).

Los efectos de un antagonista de los péptidos opioides, la Naloxona, han confirmado los puntos de vista anteriores, y su efecto positivo sobre la secreción de LH depende de la etapa fisiológica por la cual atraviesa el animal (Brooks et al., 1986a). Las variables analizadas en la mayoría de trabajos en los cuales se utiliza Nx son: concentración media, amplitud y frecuencia de pulsos de LH.

En el presente estudio la concentración media de LH, no fue afectada por la Naloxona sola (5.86 ng/ml) o con un pretratamiento con GnRH (4.44 ng/ml). Brooks et al. (1986a) reportan concentraciones promedio de LH (en ng/ml) para ovejas maduras en el anestro temprano de 2.15, medio de 2.07 y tardío de 2.86; y aunque los valores hormonales aquí encontrados fueron ligeramente superiores a los de este autor, están dentro del rango de los niveles basales para LH sugeridos por Robinson et al. (1987) y son más parecidos a los valores obtenidos con ovejas jóvenes tratadas con Nx (Brooks et al., 1986a).

La administración de Nx en cabras en anestro estacional, no afecta la frecuencia y la amplitud de pulsos de LH. Fue posible llegar a esta conclusión al no encontrarse diferencias significativas entre las cabras tratadas con Nx y las testigo a las que administró Ss. El pretratamiento con GnRH, tampoco propició diferencias entre las cabras tratadas con Nx y las del grupo testigo que recibieron Ss. Sin embargo, en comparación con las que se trataron solamente con Nx y Ss, las variables estudiadas tuvieron valores más bajos en ambos grupos de cabras (Nx y Ss) pretratados con GnRH.

La forma pulsátil en que se libera la LH, se vió afectada por la administración previa de GnRH. Las cabras en las que se aplicó Nx y recibieron un pretratamiento con GnRH, tuvieron en total, menos pulsos (12 contra 20) y más baja amplitud media (4.58 ng/ml contra 6.84 ng/ml) de LH que las que fueron tratadas solamente con Nx.

En la literatura no existen antecedentes de este efecto del GnRH y su uso como pretratamiento a la Naloxona. Una explicación probable es que las reservas de LH fueron agotadas al responder la hipófisis al decapeptido. La caracterización de esta respuesta fue posible gracias al esquema de muestreo diseñado que permitió coleccionar muestras de suero sanguíneo hasta por 108 horas después de que se inició la administración de los tratamientos.

Con base en lo anterior, es posible pensar que después de un gran estímulo, como el de una dosis alta de GnRH, se provoque el vaciado de las reservas de LH, y que se requieran varios días antes de que la hipófisis pueda responder a otro estímulo, aunque sea de baja intensidad que como en este caso, se hizo con la aplicación de Naloxona. En ese sentido se pueden enfocar futuros trabajos de investigación.

La amplitud media de los pulsos de LH en ng/ml, reportada por Brooks et al. (1986a), en ovejas tratadas con Nx a la mitad (8.29) y al final (10.43) del anestro, fue muy superior al valor más alto (6.84) aquí reportado. Los resultados que obtuvieron Brooks et al. (1986a) en el anestro temprano (3.75 ng LH/ml) son más coincidentes con los que aquí se presentan. En otro trabajo, Brooks et al. (1986b), reportan alturas de pulsos que van desde 11.61 (testigo) hasta 16.25 (Nx) ng LH.ml⁻¹ en ovejas en anestro y mencionan que a pesar de esta variación, los tratamientos no presentaron diferencias significativas, coincidiendo en ese sentido con este trabajo.

Muy pocos pulsos y niveles circulantes de LH reducidos se observaron durante el periodo de tratamiento luego de administrar Naloxona o solución salina. En el caso de las cabras tratadas con solución salina se refleja el estado de anestro. Tal patrón es característico de cabras y ovejas de lana en anestro estacional (Mongomery et al., 1985). La respuesta a Naloxona fue similar a la reportada en ovejas de lana, en las cuales se señala que no se afectó la secreción de LH luego de que se administró.

En este trabajo se comprueban para cabras en anestro estacional, las observaciones en ovejas intactas en anestro estacional realizadas por Meyer y Goodman (1986), Brooks et al. (1986a y b) y Yang et al. (1988), quienes concluyeron que la Nx no afecta la secreción de LH al no observar diferencias en la pulsatilidad y amplitud con las hembras testigo.

5.4. Respuesta a GnRH

Todas las cabras tratadas con GnRH respondieron al tratamiento, como se evidencia por los patrones endógenos de liberación de LH. A pesar de que en los tratamientos en los cuales el decapeptido se administró después de la Naloxona y la solución salina no se mantuvo la categoría de pico preovulatorio. La respuesta al GnRH coincide con la obtenida en estudios realizados en ovejas por Brown et al. (1988) y Crighon et al. (1974) y fue inferior a la que obtuvieron McLeod et al. (1982) en borregas tratadas con dosis bajas de GnRH administradas en forma pulsátil. El GnRH induce en forma inmediata un aumento sostenido en los niveles séricos de LH. En los tratamientos 1 y 2, se produjeron picos de LH tipo preovulatorio cuya duración promedio fue de 5.03 horas y que comenzaron 15 minutos después de aplicar el tratamiento, alcanzando un valor máximo promedio por tratamiento de 44.24 ng/ml alrededor de 2.19 horas post GnRH. Ocho horas después de la inyección, la concentración promedio de LH disminuyó considerablemente pero fue significativamente más alta que los valores correspondientes a las cabras tratadas con Naloxona, solución salina y GnRH después de Naloxona y solución salina.

Se detectó un patrón de liberación pulsátil en la mayoría de las cabras tratadas con GnRH, y a pesar de haber una gran variación entre tratamientos, no hubo diferencias significativas. Sin embargo, la amplitud del pulso de LH entre tratamientos fue diferente, coincidiendo con las diferencias entre tratamientos para la variable concentración promedio de LH durante el aumento sostenido.

Una de las causas posibles de las diferencias, tanto en la amplitud de pulsos como en la concentración promedio de LH durante el aumento sostenido, pueden tener su origen en el estrés, ocasionado por los tres periodos de muestreo intensivo a los que se sometieron las cabras luego de aplicar Nx y Ss antes de estimular a la hipófisis con el GnRH. Se ha comprobado que el estrés suprime la secreción pero no la producción de LH desde la pituitaria (Moberg, 1985; citado por Kaplan y Katz, 1995). Esta glándula, durante el anestro, contiene pequeñas cantidades de LH bioactiva que es liberada hacia la sangre cuando se inyecta una cantidad suficiente de GnRH (Faulkes et al., 1990).

Aunado a lo anterior, durante el anestro estacional, el hipotálamo de la cabra para secretar en forma adecuada GnRH endógeno que propicie un pico preovulatorio de LH, requiere ser expuesto antes a cantidades pequeñas pero constantes del mismo decapeptido, tal y como lo demostraron Knighth et al. (1988) al administrar varias inyecciones múltiples con dosis bajas de GnRH.

Ese hecho fue tratado de corroborar por Robin et al. (1994), quienes probaron después de un tratamiento con un progestágeno, la aplicación de dos inyecciones de 125 µg de GnRH cada una con diferencia de 48 horas, no obteniendo en ningún caso picos preovulatorios de LH ni de FSH. Se obtuvieron resultados similares cuando se aplicó una sola inyección de GnRH. Otro grupo de animales se trató con PMSG en lugar del GnRH, y la respuesta no se hizo esperar. El 100 por ciento de las cabras tratadas presentó picos preovulatorios tanto de LH como de FSH. Estos resultados, los explicaron los autores basándose en la vida media corta del GnRH (Fractel) empleado y en la vía de administración: *im*, la cual suponían permitiría una primera exposición del hipotálamo al GnRH exógeno. Con estos antecedentes es posible discutir y probablemente plantear investigaciones que traten de establecer si el GnRH exógeno, actúa a nivel hipófisis o a

nivel hipotálamo, para provocar la respuesta secretoria de gonadotropinas en cabras durante el anestro estacional.

Estos resultados son similares a los reportados por Robinson et al. (1987), quienes trabajando con ovejas sincronizadas con 30 mg de acetato de fluorogestona en esponjas vaginales mantenidas por 12 días y una inyección de 500 ui de PMSG al retirar la esponja, reportaron concentraciones basales del orden de 1 a 8 ng LH/ml. La concentración pico fue de 58 ng/ml y el intervalo de los niveles basales al pico fue de 2.4 horas, la duración de la oleada preovulatoria fue de 6 a 8 horas y el tiempo desde el primer aumento hasta el retorno a los niveles basales fue de 8 a 10 horas.

Nuestros resultados son significativamente menores a los reportados por Haresign et al (1975), quienes, en ovejas ciclando durante la época reproductiva natural no encontraron diferencias en la concentración máxima de LH en el pico preovulatorio en el estro natural (205 ng/ml) y en el estro sincronizado con progesterona implantada el día 8 del ciclo y mantenida por 12 días (185 ng/ml). Condiciones similares dió a conocer para la duración de la oleada de LH, en el estro natural: 12.8 horas y en el estro sincronizado: 11.2 horas

Comparados con los picos preovulatorios obtenidos por Robin et al. (1994), en cabras en anestro estacional, a las que después de un tratamiento con progestágenos se les administró una inyección de PMSG (90.4 ng/ml) o de GnRH (81.0 ng/ml), algunos de los valores aquí obtenidos (individuales de hasta 76.4 ng/ml), son ligeramente inferiores a los obtenidos por ese autor. Sin embargo la mayoría, son significativamente menores. Esos valores altos en el pico preovulatorio, Robin et al (1994), los atribuyen o a la técnica del RIA empleado o a la raza de cabras empleada. Conclusión similar fue a la que se llegó en este trabajo luego de revisar los valores medios de LH circulante para todos los tratamientos.

Los resultados observados en este trabajo coinciden con los obtenidos en vaquillas Holstein sincronizadas previamente y a las cuales se les administraron 5 y 10 µg de GnRH, en ellas, los niveles de LH se elevaron en los siguientes 15 minutos después del GnRH alcanzando niveles parecidos a los preovulatorios en aproximadamente dos horas.

En esas vaquillas, la LH se mantuvo alta por seis horas y no se encontraron diferencias significativas entre las dos dosis de GnRH (Gong et al., 1995).

En relación a la dosis, la respuesta al GnRH es controversial, ya que en muchos de los casos permite pensar en una asociación con la dosis; sin embargo, Brown et al. (1988) cuando aplicaron una inyección masiva de 125 µg de GnRH (dos horas después de terminar la administración de un tratamiento pulsátil de 250 ng de GnRH cada dos horas durante 34 horas), obtuvieron 1.5 horas después, niveles pico de 21.9 ng Ng LH/ml. El momento en que se presentó el pico máximo fue ligeramente menor al de este trabajo. Sin embargo la magnitud de la respuesta en este trabajo fue muy superior y puede deberse al agotamiento de las reservas de LH ocasionado por la estimulación constante de las inyecciones reducidas y múltiples de GnRH.

Existen diferentes definiciones de lo que se considera un pico preovulatorio. Las dos más bajas en lo que corresponde al tiempo de duración son proporcionadas por McLeod y Haresign, (1984) y Clarke (1995). McLeod y Haresign (1984), lo definen como un aumento sostenido por más de 6 horas y concentraciones séricas arriba de 10 ng/ml. Los niveles pico de esta hormona deben ser de mayores de 30 ng/ml El pico comienza en el momento cuando se alcanzan por primera vez los 10 ng/ml. Clarke (1995), considera que un pico preovulatorio de LH ocurre cuando los valores séricos se elevan por encima de 10 ng/ml y permanecen por arriba de este nivel al menos por tres horas. Aún bajo las benévolas condiciones de Clarke (1995), los tratamientos 3 y 4 del presente trabajo, no alcanzan la categoría de pico preovulatorio.

Coincidentes también con el presente estudio, Greyling y Niekerk (1990), trabajando durante la época reproductiva con cabras Boer pretratadas con un progestágeno intravaginal y luego de administrar inyecciones via iv o im de PMSG al retirar el progestágeno, obtuvieron niveles máximos promedio durante el pico preovulatorio de LH de 64.2 y 40.1 ng/ml respectivamente para cada una de las vías de administración. El valor del pico preovulatorio espontáneo de los animales testigo (solamente progestágeno) fue de 48.0 ng/ml de LH. A pesar de las grandes diferencias entre los valores mínimo y máximo no reportan diferencias significativas entre ellos.

Brown et al (1988), estudiaron el efecto del 125 µg de GnRH en ovejas en anestro, observando valor máximo de 21.9 ng/ml, alrededor de 1.5 horas después de la inyección y el pico preovulatorio se inició 0.5 horas después del GnRH. Ocho horas post inyección, la concentración media de LH se redujo, pero fue significativamente mayor que los valores detectados en los testigos.

La medición de las concentraciones de LH tiene como objetivo monitorear el tiempo y la amplitud del pico preovulatorio de LH e indicar el momento de la ovulación. En reportes previos de trabajos realizados en cabras (Ritar et al., 1984) y ovejas (Cumming et al., 1973), se señala que la ovulación ocurre entre 18 y 28 horas después del pico preovulatorio. En el presente trabajo, a pesar de que se considera dentro de las variables en estudio, dadas las condiciones no fue posible evaluar la respuesta ovulatoria al monitorear los niveles de progesterona después de los tratamientos, por lo que solamente se supone que ocurrió ovulación cuando se presentó el aumento sostenido tipo pico preovulatorio de LH.

6. CONCLUSIONES

Del presente trabajo, se desprenden las siguientes conclusiones, aplicables cuando las condiciones sean similares, en cabras adultas durante su anestro estacional:

- El nivel basal promedio de LH obtenido en este trabajo fue 1.64 ng/ml.
- La concentración promedio de LH durante el tiempo en que no se administraron tratamientos fue de 4.17 ng/ml.
- El GnRH provocó una elevación tipo descarga preovulatoria de LH en las cabras a las cuales se administró GnRH solo.
- En los tratamientos en los cuales se administró GnRH después de Nx y Ss y fueron sometidas a tres muestreos intensivos previos, la descarga de LH fue afectada y no alcanzó la categoría de pico preovulatorio, posiblemente por el estrés ocasionado por los muestreos intensivos a los cuales fueron sometidas
- La concentración máxima de LH en respuesta al tratamiento con GnRH sin Nx previa fue 44.24 ng/ml y se presentó 2.19 horas después de su administración.
- La concentración media de LH después de aplicar el GnRH fue 13.95 ng/ml, en comparación con la concentración promedio de 5.31 obtenida cuando se aplicó el GnRH con un pretratamiento de Nx, Ss y tres muestreo intensivos previos.
- La Naloxona no afecta la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH, sin embargo, cuando se aplica GnRH antes, estas dos variables se alteran y se observa una reducción significativa en sus valores.
- La evidencia generada en este trabajo indica que los niveles reducidos de LH observados durante el anestro, no dependen de péptidos opioides. Esto lleva a suponer que el efecto inhibitorio sobre el generador de pulsos de LH, podría ser de otro origen, tal vez esteroidal.

7. LITERATURA CITADA

- Ariens K.J., A.R. Smith and R. de Ureis. 1974. The mammalian pineal gland and its control of hypothalamic activity. *Prog. Brain Res.* 41:149.
- Ascoli M. y D.I. Segaloff. 1996. Hormonas adenohipofisarias y sus factores liberadores hipotalámicos. Cap. 55. En: Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica, 9ª Edición, por Hardman J.G., Limbird L.E. y Goodman Gilman A. Editorial McGraw-Hill Interamericana, México. pp 1447.
- Baird D.T., I. Swanston and R.J. Scaramuzzi 1976. Pulsatile secretion of LH and ovarian steroids in sheep during the luteal phase of the estrous cycle. *Endocrinology* 98:1490.
- Barb C.R., J.B. Barret, J.T. Wright, R.R. Kraeling and G.B. Rampacek .1990. Opioid modulation of LH secretion by pig pituitary cell in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 90: 213.
- Barb C.R., R.R. Kraeling and G.B. Rampacek. 1991. Opioid modulation of gonadotropin and prolactin secretion in domestic farm animals. *Domestic. Anim. Endocrin.* 8:15.
- Barth T., J. Kiessling, A. Walther, G. Koban, H. Mai, R. Beyer, E. Braver. 1990. Results of investigations into the occurrence, diagnosis and therapy of acycilia in cows. *Monatshefte für veterinarmedizin* 4 10, 329.
- Baulieu E.E 1990. From morphine to opioid peptides. Pain, stress, reproduction. In: *Hormones. from molecules to disease.* Edited by: E.E. Baulieu and P.A. Kelly. Hermann Publishers in Arts and Science. Chapman and Hall, New York and London. pp 187
- Bhaot R. and M. Wilkinson. 1983. Opiatergic control of gonadotropin secretion during puberty in the rat: a neurochemical basis for the hypothalamic "gonadostat"? *Endocrinology* 113:596.
- Bittman E.L., F.J. Karsch and J.W. Hopkins. 1983a. Role of pineal gland in ovine photoperiodism: Regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.* 113:329.
- Bittman E.L., R.J. Dempsey and F.J. Karsch . 1983b. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to day length in the ewe. *Endocrinology.* 113:2276.
- Blank M.S., A.E. Panerai and H.G. Freisen. 1979. Opioid peptides modulate luteinizing hormone secretion during sexual maturation. *Science.* 203:1129.
- Bloom F.E. 1996. Neurotransmisión y sistema nervioso central, Cap. 12. En: Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica, 9ª Edición, por Hardman J.G., Limbird L.E. y Goodman Gilman A. Editorial McGraw-Hill Interamericana, México. pp 283.
- Borgeat P., G. Chavancy, A. Dupont, F. Labrie, A. Arimura and A.V. Schally. 1972. Stimulation of adenosine 3',5' - cyclic monophosphate accumulation in the anterior pituitary gland in

- vitro by synthetic luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:2677.
- Brooks A.N., G.E. Lamming, P.D. Less and N.B. Haynes. 1986a. Opioid modulation of LH secretion in the ewe. *J.Reprod. Fert.* 76:693.
- Brooks A.N., N.B. Haynes, K. Yang and G.E. Lamming. 1986b. Ovarian steroid involvement in endogenous opioid modulation of LH secretion in seasonally anoestrous mature ewes. *J. Reprod. Fert.* 76:709.
- Brown B.W., Y. Cognie, P. Cheruneau, N. Poulin and O.A. Salama. 1988. Ovarian capillary blood flow in seasonally anoestrous ewes induced to ovulate by treatment with GnRH. *J. Reprod. Fert.* 84: 653.
- Buttle H.L. and S.V. Morant. 1988. The pattern of luteinizing hormone secretion during pregnancy in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 11: 129.
- Byerley D.J., T.E. Kiser, J.K. Bertrand and R.R. Kraeling. 1992. Releasing of luteinizing hormone after administration of Naloxone in pre and peripuberal heifers. *J. Anim. Sci.* 70:2794.
- Clarke I.J. 1995. Evidence that the switch from negative to positive feedback at the level of the pituitary gland is an important timing event for the onset of the preovulatory surge in the ewe. *Journal of Endocrinology.* 145: 271-282.
- Clarke I.J. and J.T. Cummins. 1985. GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary gland. *J.Reprod. Fert.* 73:425.
- Clayton R.N. and K.H. Catt. 1980. Receptor binding affinity of gonadotropin releasing hormone analogs: analysis of radioligand receptor assays. *Endocrinology.* 106:1154.
- Conn P.M. and N.F. Crowley 1991. Review article: Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *New England Journal Medical.* 324: 93.
- Cosgrove, J.R., F de Rensis and G.R. Foxcroft. 1993. Opioidergic pathways in animal reproduction: Their role and effects of their pharmacological control. *Anim Rep. Sci.* 33:373.
- Crighton, D.B., J.P. Foster, W. Haresign, and S.A. Scott. 1975. Plasma LH and progesterone levels after single or multiple injections of synthetic LH-RH in anoestrous ewes and comparison with levels during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 44: 121.
- Crowley W.F. Jr. and J.L. Jameson. 1992. Gonadotropin -releasing hormone deficiency: perspectives from clinical investigation. *Endocrine Review.* 13: 635.
- Cunning I.A., J.M. Buckmaster, M.A. de B. Blockey, J.R. Goding, C.G. Winfield and R.W. Baxter. 1973. Constancy of interval between luteinizing hormone release and ovulation in the ewe. *Biol. Reprod.* 9: 24.

- Currie W.D., S.J. Cook and N.C. Rawlings. 1991. LH secretion in ovariectomized ewes: effects of morphine and ovarian steroid interactions with Naloxone during the breeding season and anestrus. *Can. J. Anim. Sci.* 71:333.
- Chard, T. 1987. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. 3rd Edition. Elsevier. Oxford, G.B. p 50
- Chenault J.R., D.D. Kratzer, R.A. Rzepkowski and M.C. Godwin 1990. LH and FSH response of Holstein heifers to fertyrelm acetato, Gonadorelin and Buserelin. *Theriogenology*. 34: 81.
- Ching M., 1983. Morphine suppresses the proestrous surge of GnRH in pituitary portal plasma of rats. *Endocrinology* 112:2209.
- Deaver D.R. and R.A. Dailey. 1983. Effects of ovarian secretions and dopamine on secretion of luteinizing hormone and prolactin in ewes. *J. Anim. Sci.* 57:978.
- Demura R., M. Ono, H. Demura, K. Shizume and H. Ouchi. 1982. Prolactin directly inhibits basal as well as gonadotropin-stimulated secretion of progesterone and 17 β -estradiol in the human ovary. *J. Clin. Endocr. Metab.* 54:1246.
- Dobson H 1983. A radioimmunoassay laboratory handbook Liverpool University Press. Liverpool, G.B. pp 72.
- Drost M. and W.W. Thatcher. 1992 Application of gonadotrophin releasing hormone as therapeutic agent in animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 28:11.
- Ebling F.J.P., M.L. Schwartz and D.L. Foster. 1989. Endogenous opioid regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion during sexual maturation in the female sheep. *Endocrinology*. 125:369.
- Eskes C.A., M. Wilkinson and R. Bhanot. 1984. Short day exposure eliminates the LH response to Naloxone in golden hamsters. *Neuroendocrinology*. 39:381.
- FAUANL. 1996. Boletín del Departamento de Meteorología y Climatología. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Faulkes C.G., D.H. Abbott, J.U.M. Jarvis and F.E. Sherriff. 1990. LH responses of female naked mole-rats *Heterocephalus glaber*, to single and multiple doses of exogenous GnRH. *J. Reprod. Fert.* 89:317.
- Ferin M., D. Van Vugt and A. Chernick. 1983. Central nervous system peptides and reproductive function in primates. In: *Neuroendocrine aspects of reproduction*, Ed. R.L. Norman. Academic Press, London. pp 69.
- Ferland L., B. Marchetti, C. Séquin, F.A. LeFebvre, J.J. Reeves and F. Labrie. 1981 Dissociated changes of pituitary luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) receptors and responsiveness to the neurohormone induced by 17 β -estradiol and LHRH in vivo in the rat. *Endocrinology*. 109:87.

- Ferland L., G.S. Kledzik, L. Cusan and F. Labrie. 1978. Evidence for a role of endorphins in stress and suckling induced prolactin release in the rat. *Molec. Cell. Endocr.* 12:267.
- Foster J.P. and D.B. Crighton. 1974. Luteinizing Hormone (LH) release after single injections of synthetic LH releasing hormone (LH-RH) in the ewe at three different reproductive stages and comparison with natural LH release at oestrus. *Theriogenology*. 2:87.
- Ganong W.F. 1991. Role of the nervous system in reproduction. *Reproduction in domestic animals*. Academic Press. pp. 1.
- Glowinski J. 1990. Nerve cells and their chemical messages. In: *Hormones: From molecules to disease*. Edited by: E.E. Baulieu and P.A. Kelly. Hermann Publishers in Arts and Science. Chapman and Hall, New York and London. pp 181.
- Goodman R.L.: 1986. Functional organization of the adrenergic and dopaminergic systems inhibiting LH secretion in anoestrous ewe. *Biol. Reprod.* 34 (Suppl. 1):33.
- Goodman R.L. and F.J. Karsch. 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*. 107:1286.
- Goodman R.L. and F.J. Karsch. 1982. Differential suppression of gonadotropins by ovarian steroids. *Endocrinology*. 112:1286.
- Goodman R.L. and S.L. Mayer. 1984. Effects of pentobarbital anesthesia on tonic luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for active inhibition of luteinizing hormone in anestrus. *Biol. Reprod.* 30:374.
- Goodman R.L., E.L. Bittman, D.L. Foster and F.J. Karsch. 1982. Alterations in the control of luteinizing hormone pulse frequency underlie the seasonal variation in estradiol negative feedback in the ewe. *Biol. Reprod.* 27: 580.
- Gong J.G., T.A. Bramley, C.G. Gutierrez, A.R. Peters and R. Webb 1995. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *J. Reprod. Fert.* 105: 263-270.
- Gordon K., M.B. Renfree, R.V. Short, and I.J. Clarke. 1987. Hypotalamic-pituitary portal blood concentrations of β -endorphin during suckling in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 79:397.
- Greyling J.P.C. and C.H. van Niekerk. 1990. Effect of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and route of administration after progestagen treatment on oestrus and LH secretion in the Boer goat. *Small Ruminant Research*. 3: 511.
- Hadley Mac E. 1996, *Endocrinology, Fourth Edition*. Prentice Hall. NJ, USA. p 518.
- Hafez E.S.E. 1952. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. *J. Agric. Sci.* 42:189.

- Hafez E.S.E. 1996. Reproducción, hormonas y factores de crecimiento y Ciclos reproductivos. En: Reproducción e inseminación artificial en animales, E.S.E. Hafez Ed. 6ª Edición, Editorial Interamericana-McGraw Hill. pp 55.
- Haresign W , J.P. Foster, N.B. Haynes, D.B. Crighton, and G.E.Lamming. 1975. Progesterone levels following treatment of seasonally anoestrous ewes with synthetic LH-releasing hormone. *J. Reprod. Fert.* 43: 269-279.
- Haresign W and G E Lamming. 1978. Comparison of LH release and luteal function in cyclic and LH-RH-treated anoestrous ewes pretreated with PMSG or oestrogen. *J. Reprod. Fert.* 52:349.
- Havern, R.L., C.S. Whisnant, and R.L.Goodman. 1991. Hypotalamic site of catecholamine inhibition of luteinizing hormone in the anestrous ewe. *Biol. Reprod.* 44:3 476.
- Herbert J. P.M. Stacey and D.H. Thorpe. 1978. Recurrent breeding seasons in pinealectomized or optic-nerve sectioned ferrets. *J. Endocrinol.* 78:389.
- Hofmann R.A. and R.J. Reiter. 1965 Pineal gland: influences on gonads of male hamsters. *Science.* 148:209.
- Horton R.J.E., J.T. Cummings and I.J. Clarke. 1987. Naloxone evokes large amplitude GnRH pulses in luteal phase ewes. *J. Reprod. Fert.* 81:277.
- Hunter W.M. and F.C. Greenwood. 1962. Preparation of iodine-131 labelled growth hormone of high specific activity. *Nature.* 194: 495
- Kalra S.P. 1981. Neural loci involved in Naloxone induced luteinizing hormone release: Effects of a norepinefrine synthesis inhibitor. *Endocrinology.* 108: 1085.
- Kalra S.P. and P.S. Kalra. 1983. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocr. Rev.* 4:311.
- Kania B.F. 1991. Inhibition of reticulum-rumen motility by gamma endorphin in sheep. *Small ruminant Research* 6: 267.
- Kam G. and J. Martinet. 1975. Prolactin levels and duration of postpartum anoestrus in lactating ewes. *Nature , Lond.* 257:63.
- Kaplan D.H. and L.S. Katz. 1995. Luteinizing hormone response to estradiol positive feedback is not an effective endocrine parameter to monitor photoresponsiveness in ovariectomized goats (*Capra hircus*). *Small Ruminant Research.* 18:2239.
- Karsch F.J., E.L. Bittman, D.L. Foster, R.L. Goodman, S.J. Legan and J.E. Robinson. 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec. Prog. Horm. Res.* 40:185.
- Kinght C.H, C.J. Wilde, B.J. McLeod and W. Haresign. 1988. Exogenous GnRH induces ovulation in seasonally anestrous lactating goats. *J.Reprod. Fert.* 82, 2:679.

- Kolb e. 1989. Regulation and control of gonadoliberrin secretion in sheep and cattle. *Monatshefte fur Veterinarmedizin*. 44:14, 490.
- Kordon C. and S.V. Drouva. 1992. Gonadotropin regulation, oestrogens, and the immune system. *Hormone Research*. 37:11.
- Kubo K. Y. Kiyota and S. Fukunaga. 1983. Effects of third ventricular injection of β -endorphin on luteinizing hormone surges in the female rat: sites and mecharusms of opioid actions in the brain. *Endocr. Japan* 30:419.
- Labrie F. 1990. Glycoprotein hormones: Gonadotropins and thyrotropin, Chapt. V. In: *Hormones: From molecules to disease*. Edited by: E.E. Baulieu and P.A. Kelly. Hermann Publishers in Arts and Science. Chapman and Hall, New York and London.
- Lacalandra G.M., A. Lonoci and R.L. Sciorsci. 1985. Stimolazione della libido nei becchi in periodi di mattivita sessuale stagionale. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* 39:118.
- Lamming G.E., S.R. Moseley and J.R. McNeilly. 1974. Prolactin releasing in the sheep. *J. Reprod. Fert.* 40:151.
- Legan S.J. and F.J. Karsch. 1979. Neuroendocrine regulation of estrous cycle in seasonal breeding in the ewe. *Biol. Reprod.* 20:74.
- Legan, S.J., F.J. Karsch, and D.L. Foster. 1977. The endocrine control of seasonal reproductive function in the ewe: A marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*. 101:818
- Lincoln D.W., H.M. Fraser, G.A. Lincoln, G.B. Martin and A.S. McNeilly. 1985. Hypotalamic pulse generators. *Rec. Prog. Horm. Res.* 41:369.
- Mallampanti R.S., A.L. Pope and L.E. Casida. 1971 *Effect of suckling on postpartum anestrus in ewes lambing in different seasons of the year.* *J. Anim. Sci.* 32:673.
- Malven P.V., D.F.B. Bossut and M.A. Diekman. 1984. Effects of Naloxone and electropuncture treatment on plasma concentrations of LH in sheep. *J. Endocrin.* 101:75.
- Malven P.V., J. R. Parfet, D.W. Gregg, R.D. Allrich and G.E. Moss. 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.
- Mattioli M., F. Conte, G. Galeati and F. Seren. 1986. Effect of Naloxone on plasma concentration of prolactin and LH in lactating sows. *J. Reprod. Fert.* 76:167.
- McCann S. M. 1988. The anterior pituitary and hipotalamus. In: J.E. Griffin and S.R. Ojeda Ed., *Textbook of Endocrine Physiology*. Oxford University Press, New York, Oxford. pp 70.
- McLeod B.J. and W. Haresign. 1984. Evidence that progesterone may influence subsequent luteal function in the ewe by modulating preovulatory follicle development. *J. Reprod. Fert.* 71: 381.

- McLeod B.J., W. Haresign and G.E. Lamming. 1982a. The induction of ovulation and luteal function in seasonally anoestrous ewes treated with small-dose multiple injections of GnRH. *J. Reprod. Fertil.* 65:215.
- McLeod B.J., W. Haresign and G.E. Lamming. 1982b. Response of seasonally anoestrous ewe to small-dose multiple injections of GnRH with and without progesterone pretreatment. *J. Reprod. Fertil.* 65:223.
- McNatty K.P., N.L. Hudson, K. Ball and S. Forbes. 1988. Treatment of seasonally anoestrous Romney ewes with continuous infusion of low doses of GnRH: effects on estrus, ovulation and plasma progesterone concentration. *Theriogenology*. 30:5, 953.
- McNeilly A.S. 1979. Effects of lactation on fertility. *Br. Med. Bull.* 35:151.
- Meyer S.L. and R.L. Goodman. 1986. Separate neural systems mediate the steroid-dependent and steroid-independent suppression of tonic luteinizing hormone secretion in the anoestrous ewe. *Biol. Reprod.* 35: 562.
- Miller R.P. and C. Aehnelt. 1977. Application of ovine luteinizing hormone (LH) radioimmunoassay in the quantification of LH in different mammalian species. *Endocrinology*. 101: 760.
- Moenter S.M., A. Caraty, F.J. Karsch 1990. The estradiol induced surge of gonadotropin releasing hormone in the ewe. *Endocrinology Philadelphia* 127.2, 1375.
- Montgomery, G.W., G.B. Martin and J. Pelletier. 1985. Changes in pulsatile LH secretion after ovariectomy in Ile de France ewes in two seasons. *J. Reprod Fert.* 73: 173.
- Niswender G.D., L.E.J.R. Reichert, A.R. Midgley and A.V. Nalbandov. 1969. Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. *Endocrinology*. 84: 1166.
- Ojeda S.R. 1988. Female reproductive function. In: *Textbook of endocrine Physiology*. Edited by J.E. Griffin and S.R. Ojeda. p 140.
- Olivares S. E 1994. *Paquete Computacional de Diseños Estadísticos*. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Marín, N.L. México.
- Pang C.N., E. Zimmerman and C.H. Sawyer. 1977. Morphine inhibition of the preovulatory surges of plasma luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the rat. *Endocrinology* 101:1726.
- Pelletier, J. 1976. Influence of LH-RH on LH and FSH releases in domestic animals. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 16: 213.
- Quigley M.E., K.L. Sheehan, R.F. Casper and S.S.C. Yen. 1980. Evidence for an increased opioid inhibition of luteinizing hormone secretion in hyperprolactinemic patients with pituitary microadenoma. *J. Clin. Endocrin. Metabol.* 50:427.

- Racadot J. 1990. The hypothalamus-pituitary system: an anatomical overview; Chapt. II. In: *Hormones: From molecules to disease*. Edited by: E.E. Baulieu and P.A. Kelly. Hermann Publishers in Arts and Science. Chapman and Hall, New York and London.
- Ramirez V.D., H.H. Feder and C.H. Sawyer. 1984. In *Frontiers in neuroendocrinology*. L. Martini and W. F. Ganong, Eds. Raven Press. Vol. 8, p 27
- Rao A.V.N., W.M. Palmer, M.A. Sheikeldin. 1989. Gonadotrophin releasing hormone induced oestral, hormonal and vaginal resistance changes and their temporal relationships in anoestrous cows pretreated with and without beta estradiol. *Indian Veterinary Journal*. 66:12, 1137.
- Rasmussen, D.D., J.H. Liu, P.L. Wolf and S.S.C. Yen. 1983. Endogenous opioid regulation of gonadotropin-releasing hormone release from human fetal hypothalamus in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57: 881.
- Raymond V., P.C.K. Leung, R. Veilleux, G. LeFevre and F. Labrie. 1984. LHRH rapidly stimulates phosphatidyl-inositol metabolism in enriched gonadotrophes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 36: 157.
- Reisine T. y G. Pasternak. 1996. Analgésicos opioides y sus antagonistas. Cap. 23. En: *Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 9ª Edición, por Hardman J.G., Limbird L.E. y Goodman Gilman A. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. pp 557.
- Riskind P.N., W.J. Millard and J.B. Martin. 1984. Evidence that thyrotropin-releasing hormone is not a major-prolactin releasing factor during suckling in the rat. *Endocrinology*. 115:312.
- Ritar A.J., W.M.C. Maxwell and S. Salamon. 1984. Ovulation and LH secretion in the goat after intravaginal progestagen sponge-PMSG treatment. *J. Reprod. Fert.* 72: 559.
- Robin N., J.P. Laforest, J.G. Lussier and L.A. Guilbault. 1994. Induction of estrus with intramuscular injections of GnRH or PMSG in lactating goats (*Capra hircus*) primed with a progestagen during seasonal anestrus. *Theriogenology* 42: 107.
- Robinson T.J., R.J. Scaramuzzi and C.A. Smith. 1987. The time of mating and of LH release and subsequent fertility of anoestrous Border Leicester X Merino ewes treated with progestagen and pregnant mare serum gonadotropin. *Anim. Reprod. Sci.* 13: 23.
- Rodriguez C., R. 1984. *Vademécum académico de medicamentos*, Tomo II. Universidad Autónoma de México, México. pp 593.
- Salinas C.S. 1981. Evaluación de métodos de muestreo para estimar densidad de arbustos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agronomía, universidad Autónoma de Nuevo León. Marín, N.L. México.
- Salvat. 1980. *Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas*. Salvat Mexicana de Ediciones, México. pp 1073.

- Sancho G. 1988. Sobredosificación de opiáceos. Tratado de medicina práctica, 2ª Ed. México. pp503.
- Sarkar, D.K. and S.S.C. Yen. 1985. Changes in like immunoreactivity in pituitary portal blood during the estrous cycle and after ovariectomy in rats. *Endocrinology*. 116: 2075.
- Schall R.E., F.J.P. Ebling, F.J. Karsch and D.L. Foster. 1991. Postpuberal maturation of opioid regulation of luteinizing hormone secretion in the female ovine. *Biol. Reprod.* 44:760.
- Schallenberger E., D.W. Richardson and E. Knobil. 1981. Role of prolactin in the lactational amenorrhoea of the rhesus monkey (*Macaca mulata*) *Biol. Reprod.* 25:370.
- Short R.V. 1976. Lactation-central control of the reproduction. *Ciba found. Symp.* 45:73.
- Short R.V. 1984. Breast feeding. *Sci. Amer.* 250:35.
- Sirinathsinghji D.S.J., M. Motta and L. Martini. 1985. Induction of precocious puberty in the female rat after chronic Naloxone administration during the neonatal period: the opiate "brake" on prepubertal gonadotrophin secretion. *J. Endocrinol.* 104:299.
- Sirinathsinghji D.S.J. and L. Martini. 1984. Effects of bromocriptine and Naloxone on plasma levels of prolactin, LH and FSH during sucking in the female rat: responses to gonadotropin releasing hormone. *J. Endocrin.* 100:170.
- Southee, J.A., M.G. Hunter and W. Haresign. 1988. Function of abnormal corpora lutea in vivo after GnRH induced ovulation in the anoestrous ewe. *J.Reprod Fert* 84 131.
- Steele M.K. and W.F. Ganong. 1986. In *Frontiers in neuroendocrinology*. W. F. Ganong and L. Martini, Eds. Raven Press. Vol. 9, pp 99.
- Tamarkin L., S.M. Reppert and D.C. Klein. 1979. Regulation of pineal melatonin in the Syrian hamsters. *Endocrinol.* 104:385.
- Tepperman J. 1980. "The pineal: MSH and skin pigment control". In *Metabolic and endocrine physiology Year Book*. Medical Publishers, Inc. Chicago-London. p 90
- Thatcher W.W., M. Drost, J.D. Savio, K.L. Macmillan, K.W. Entwistle, E.J. Schmitt, R.L. De la Sota, G.R. Morris. 1993. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 33:27.
- Van Vugt P.A., G. Bakst, I. Dyrenfurth and M. Ferin. 1983. Naloxone stimulation of luteinizing hormone secretion in the female monkey: influence of endocrine and experimental conditions. *Endocrinology*. 113:1858.
- Walker S.K., R.J. Lampe, T.M. Heard, C.D. Matthews and R.F. Seamark. 1990. Embryo wastage in the ewe following induction of ovulation with synthetic GnRH. *Aust. Vet. J.* 67, 11: 415.

- Wardlaw S.L., L. Thuron and A.G. Frantz. 1982. Effects of sex esterooids on brain β -endorphin
Brain Res 245:327.
- Wardlaw S.L., W.B. Wehrenberg, M. Ferin and A.G. Frantz. 1980. Failure of β -endorphin to
stimulate prolactin release in the pituitary stalk-sectioned monkey. Endocrinol. 107:1663
- Whisnant C.S., F.N. Thompson, T.E. Kiser and C.R. Barb. 1986a. Effects of Naloxone on serum
luteinizing hormone, cortisol and prolactin concentrations in anoestrous beef cows J
Anim. Sci. 62:1340.
- Whisnant C.S., T.E. Kiser, F.N. Thompson, and C.R. Barb. 1986b. Opioid inhibition of
luteinizing hormone secretion during the postpartum period in suckled beef cows. J. Anim
Sci. 63:1445.
- Wise M.E. 1990. Gonadotropin releasing hormone secretion during the postpartum aneestrous
period of the ewes. Biology of Reproduction. 43:5, 719.
- Wright P.J., P.E. Geytenbeek, I.J. Clarke and J.K. Findlay. 1980. Pituitary responsiveness to LH-
RH, the occurrence of oestradiol-17 β induced LH positive feedback and the resumption of
oestrus cycles in ewes postpartum. J. Reprod. Fert. 60:171.
- Wright P.J., P.E. Geytenbeek, I.J. Clarke and J.K. Findlay. 1981. Evidence for a change in
oestradiol negative feedback and LH pulse frequency in postpartum ewe. J. Reprod. Fert
61:97.
- Wright P.J., P.E. Geytenbeek, I.J. Clarke and J.K. Findlay. 1984. Induction of plasma LH surges
and normal luteal function in acyclic postpartum ewes by the pulsatile administration of
LH-RH. J. Reprod. Fert. 71:1.
- Yeates N.T.M. 1949. The breeding season of the sheep with particular reference to its
modification by artificial means using light J Agric. Sci. 39:1.
- Yen S. 1990. Chapt. X, Clinical Endocrinology of Reproduction, in: Hormones: From molecules
to disease. Edited by E.E. Baulieu and P.A. Kelly. Hermann Publishers in Arts and
Science. Chapman and Hall, New York and London.
- Yuthasastrakosol P., W.M. Palmer and B.E. Howland. 1973. Hormone levels in the aneestrous and
cycling ewe. J. Anim. Sci. 37:334.
- Yang K., N.B. Haynes, G.E. Lamming and A.N. Brooks. 1988. Ovarian steroid hormone
involvement in endogenous opioid modulation of LH secretion in mature ewes during the
breeding and non-breeding seasons. J. Reprod. Fert. 83: 129.
- Yuthasastrakosol P., W.M. Palmer and B.E. Howland. 1977. Release of LH in acyclic ewes.
J. Reprod. Fert. 50:319

8. APENDICE DE FIGURAS

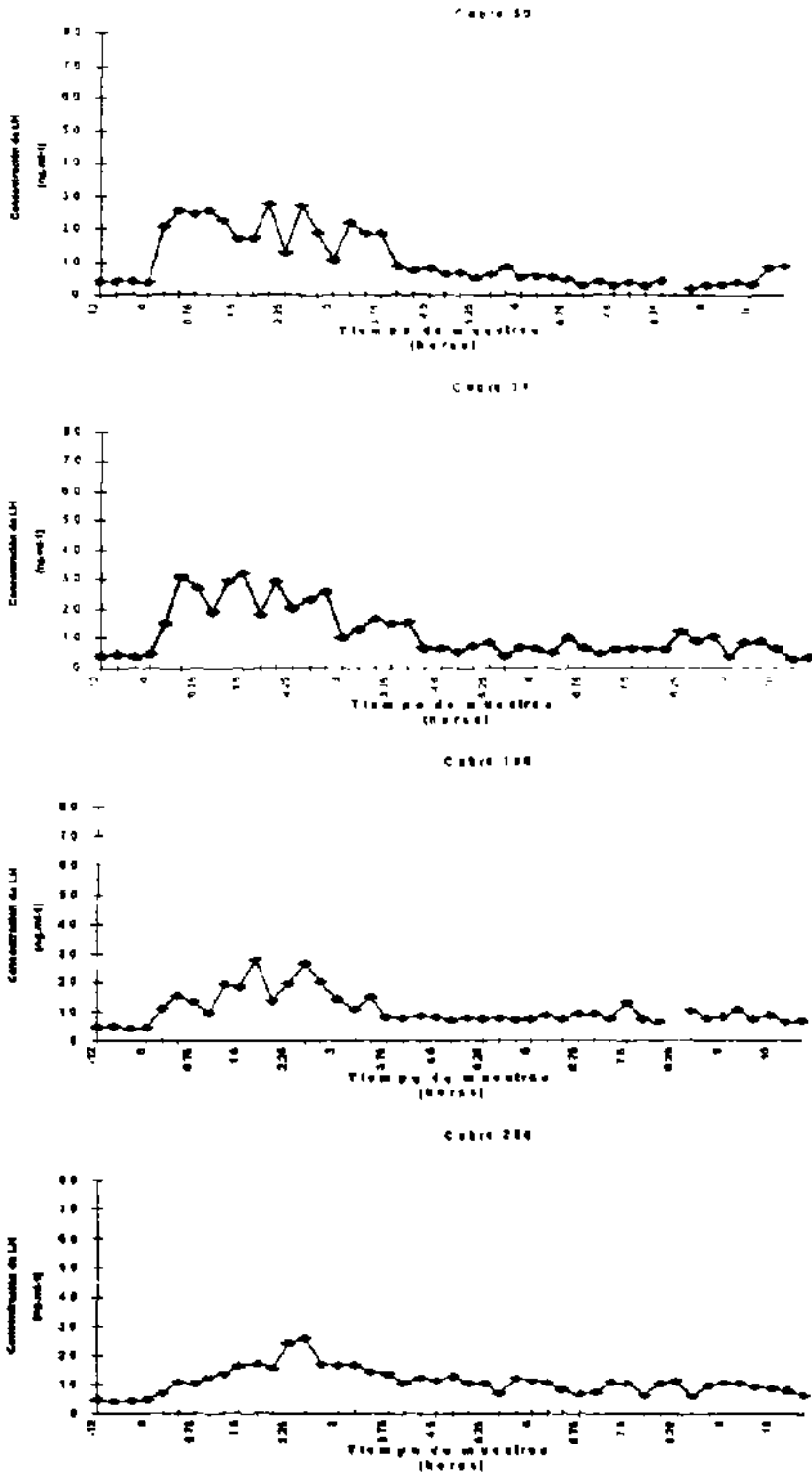


Figura A1 - Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró GnRH en la hora 0 (tratamiento I; primera administración de GnRH; muestreo I).

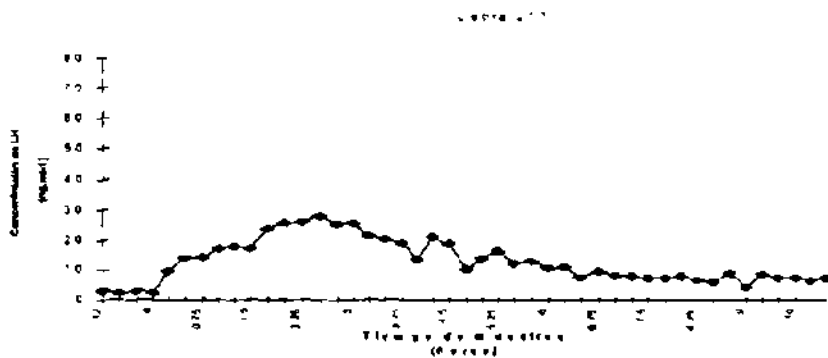
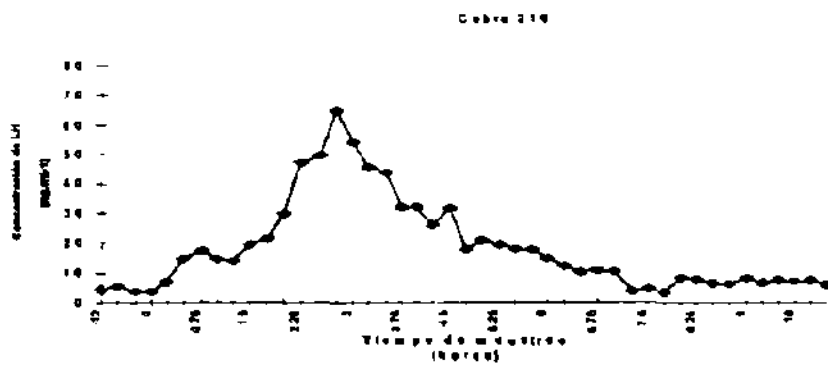
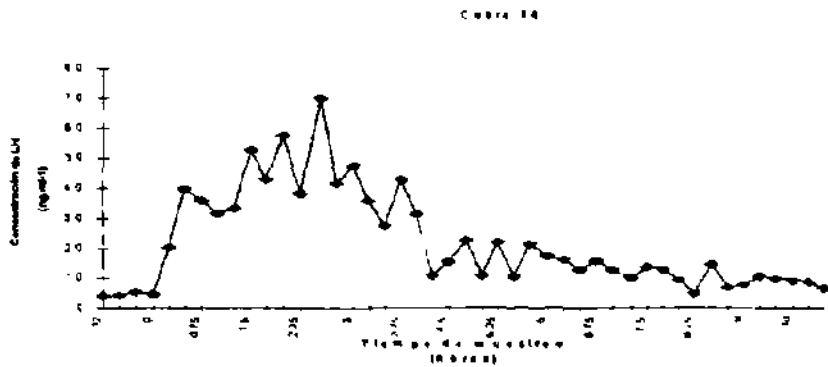
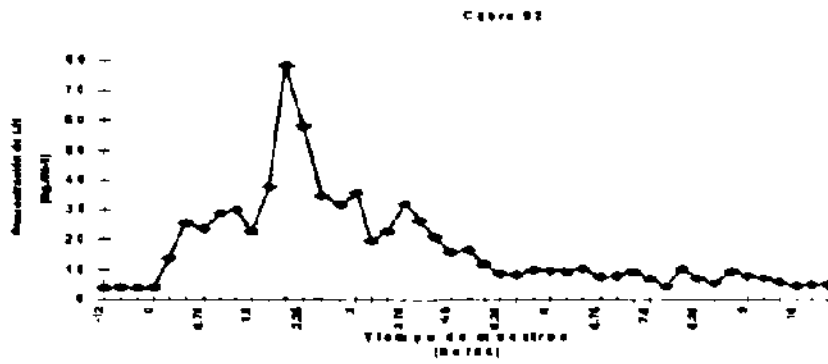


Figura A2. - Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró GnRH en la hora 0 (tratamiento 2; administración de GnRH; muestreo 1).

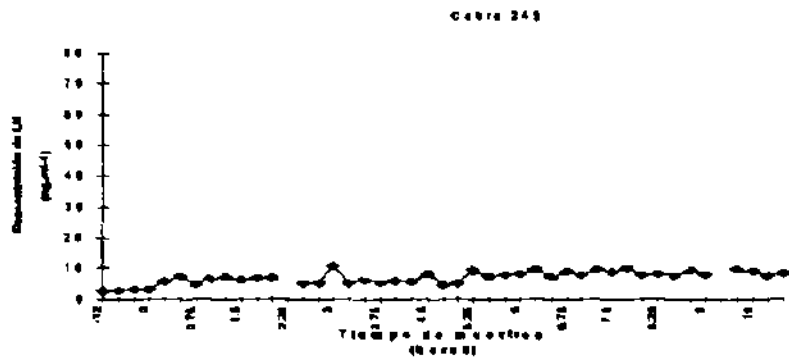
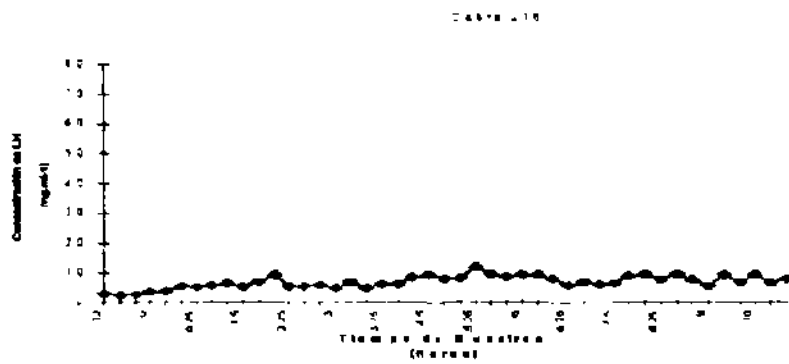
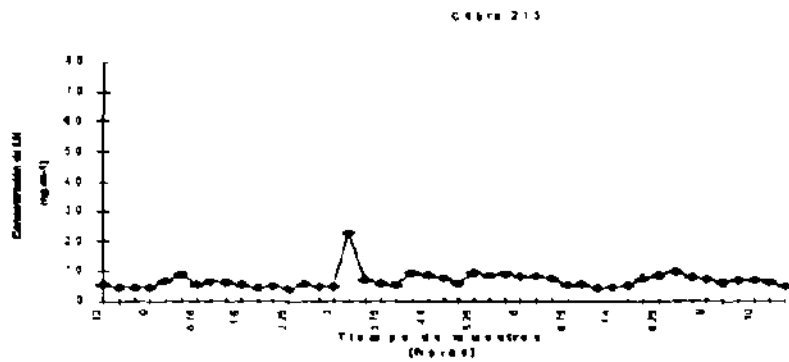
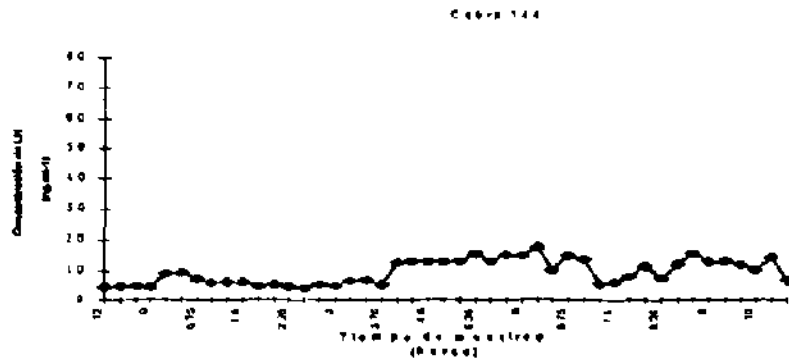


Figura A3.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró naloxona en la hora 0 (tratamiento 3; primera administración de naloxona; muestreo 1).

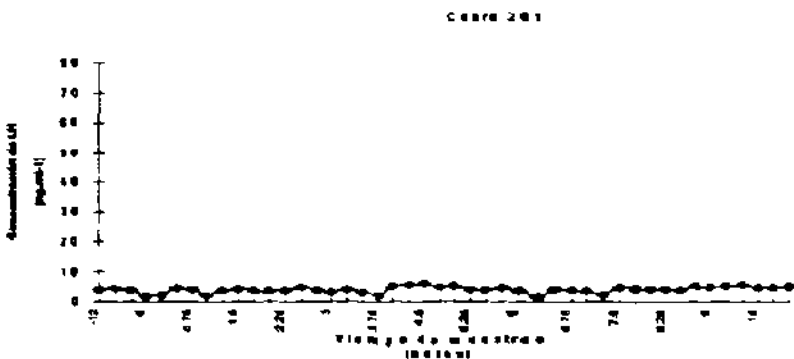
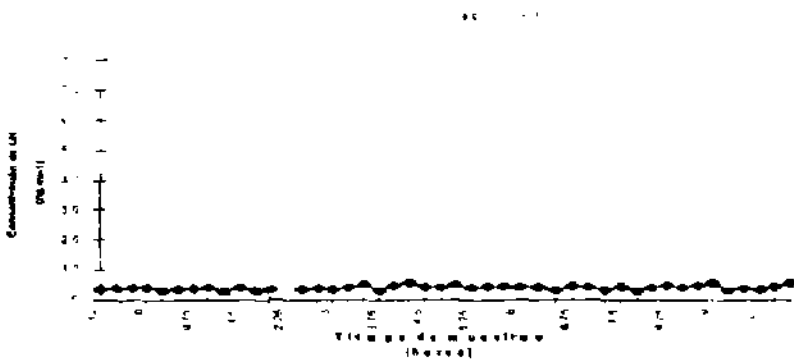
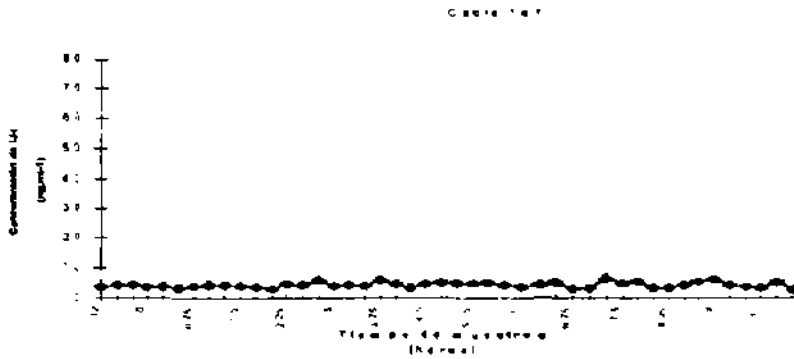
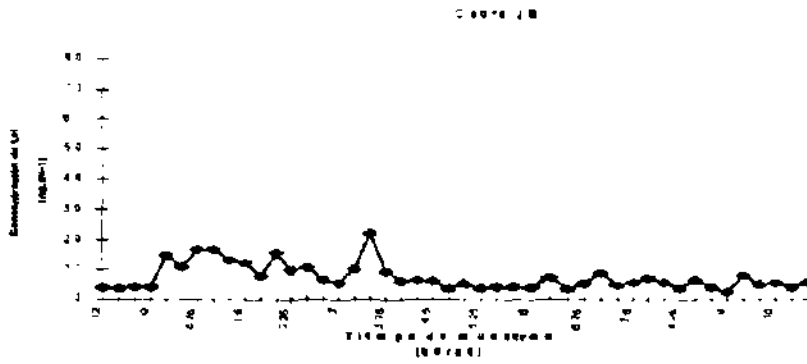


Figura A4. - Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina en la hora 0 (tratamiento 4; primera administración de solución salina; muestreo 1).

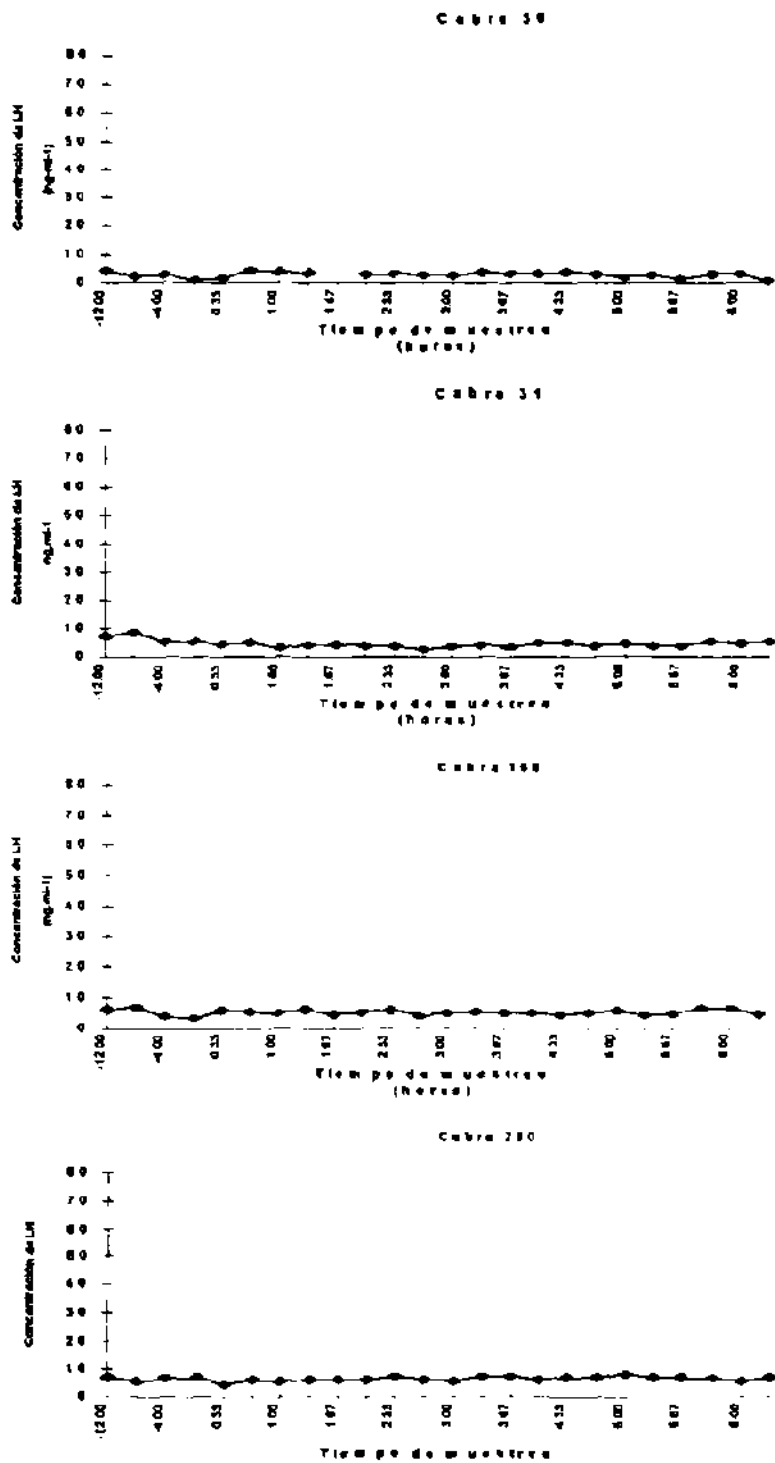


Figura A5. - Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró naloxona en la hora 0 (tratamiento 1; primera administración de naloxona, muestreo 2).

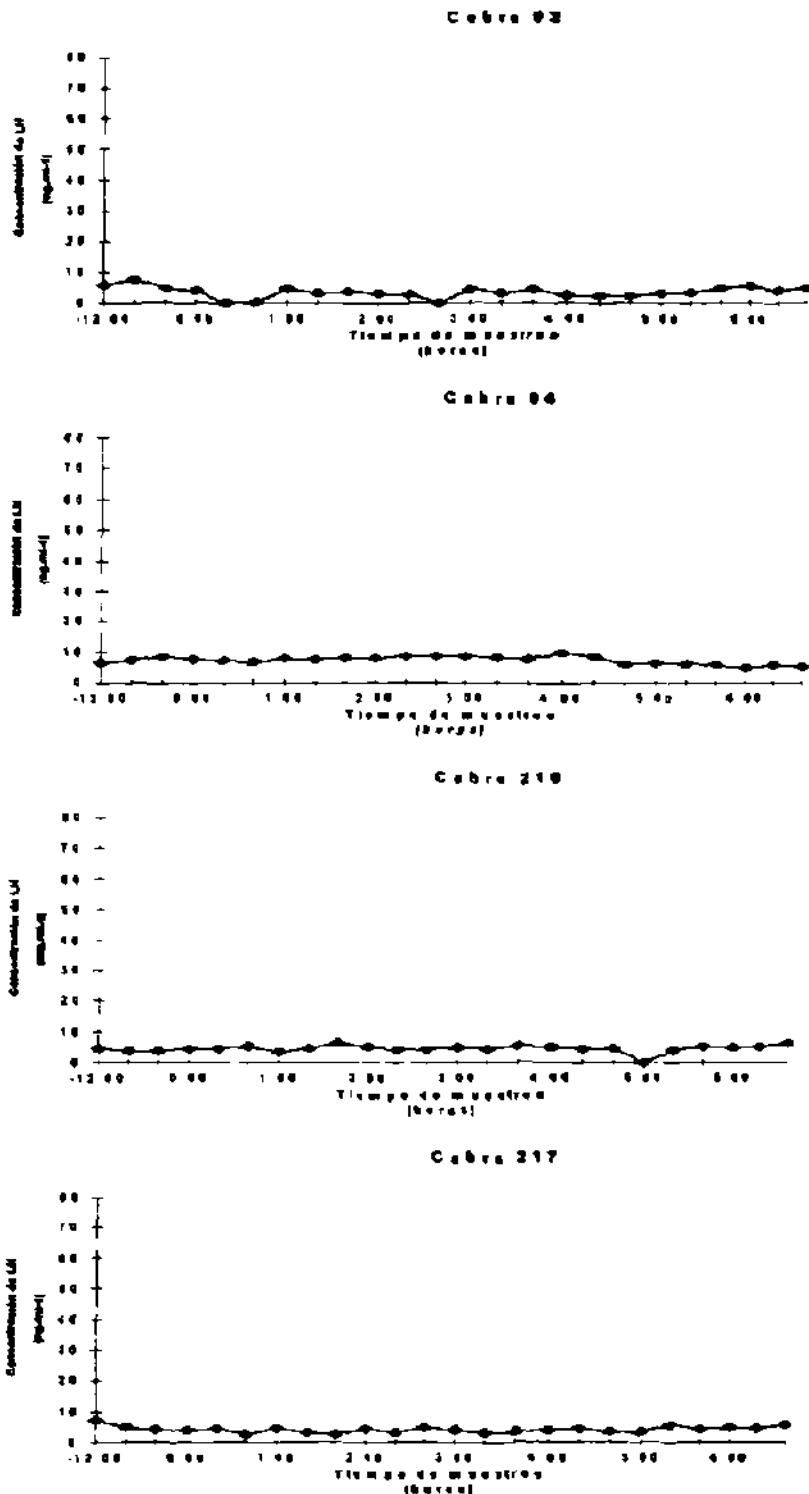


Figura A6.- Perfil de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina fisiológica en la hora 0 (tratamiento 2; primera administración de solución salina muestreo 2).

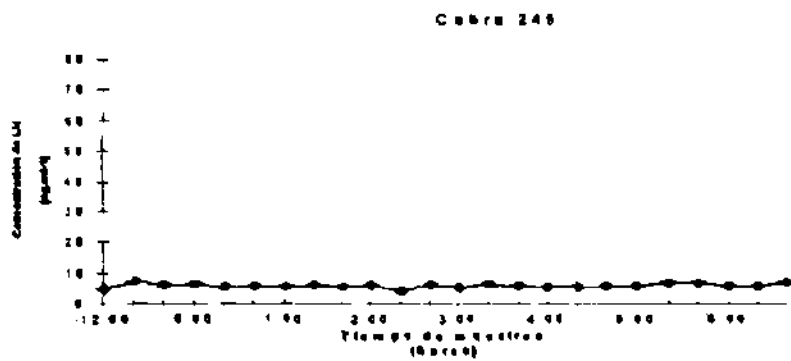
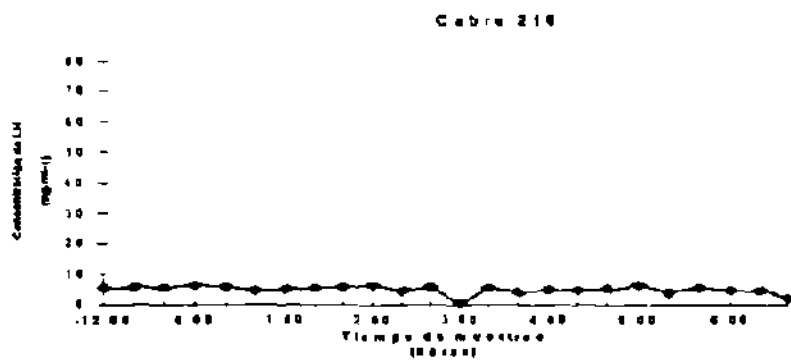
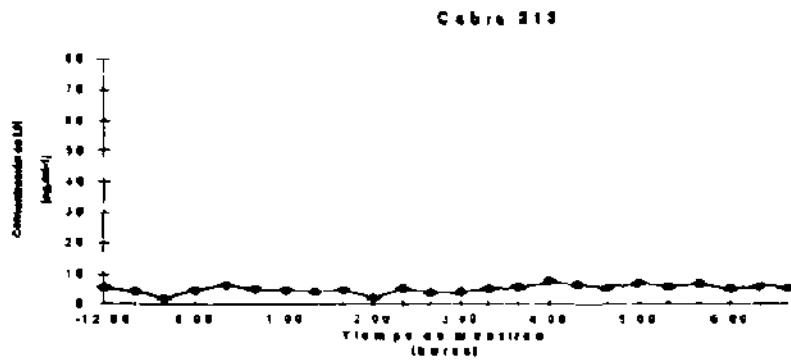
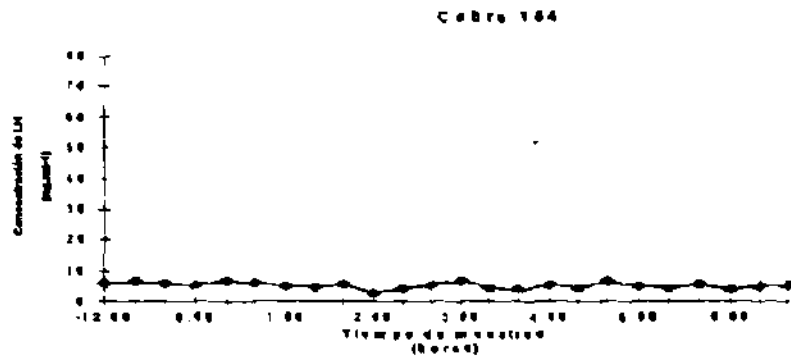


Figura A7.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró naloxona en la hora 0 (tratamiento 3; segunda administración de naloxona muestreo 2).

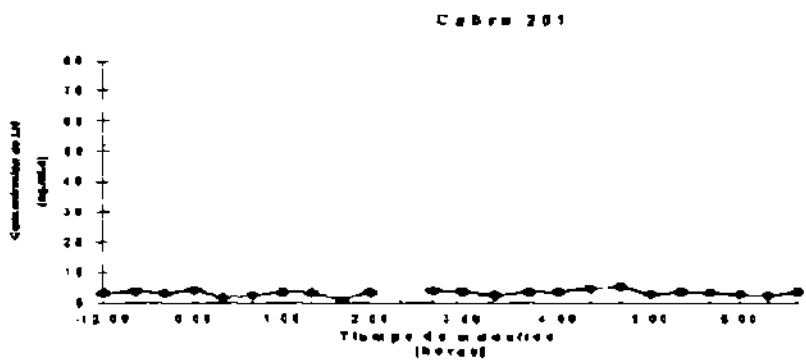
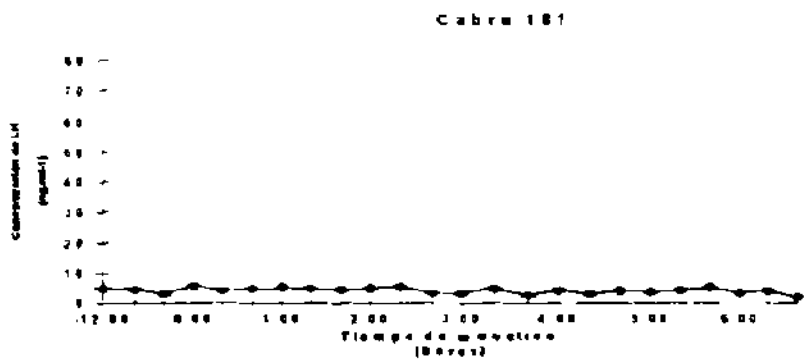
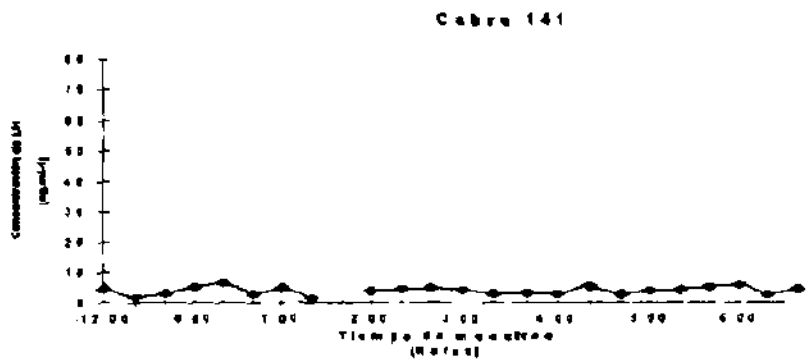
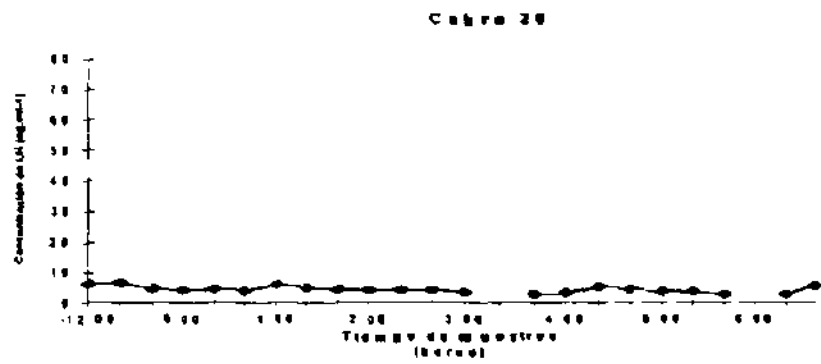


Figura A8. - Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina en la hora 0 (tratamiento 4, segunda administración de solución salina, muestreo 2).

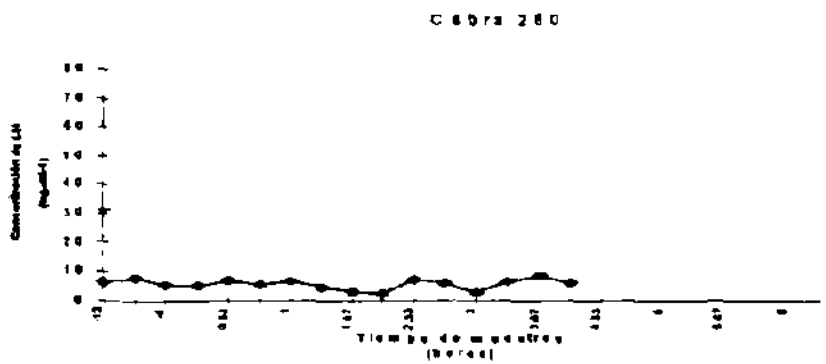
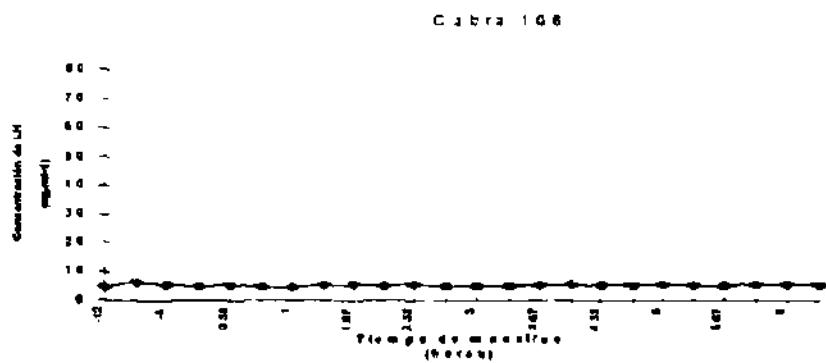
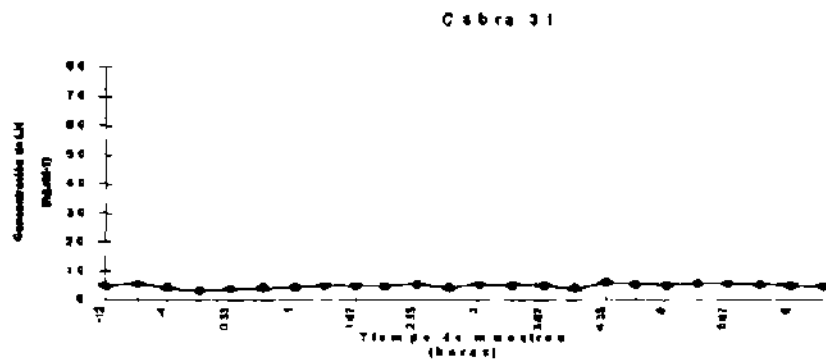
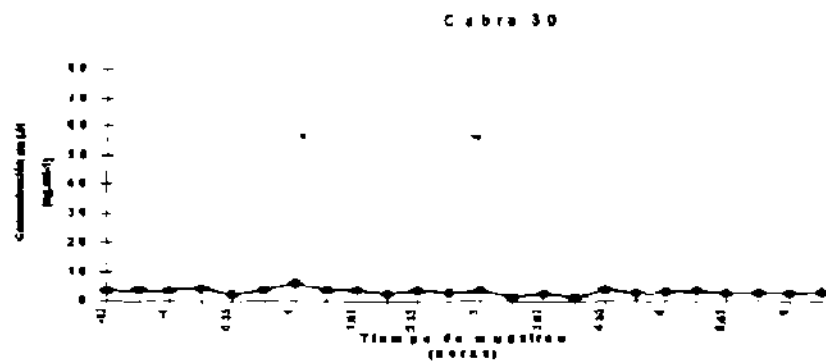


Figura A9. - Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró naloxona en la hora 0 (tratamiento 1; segunda administración de naloxona; muestreo 3).

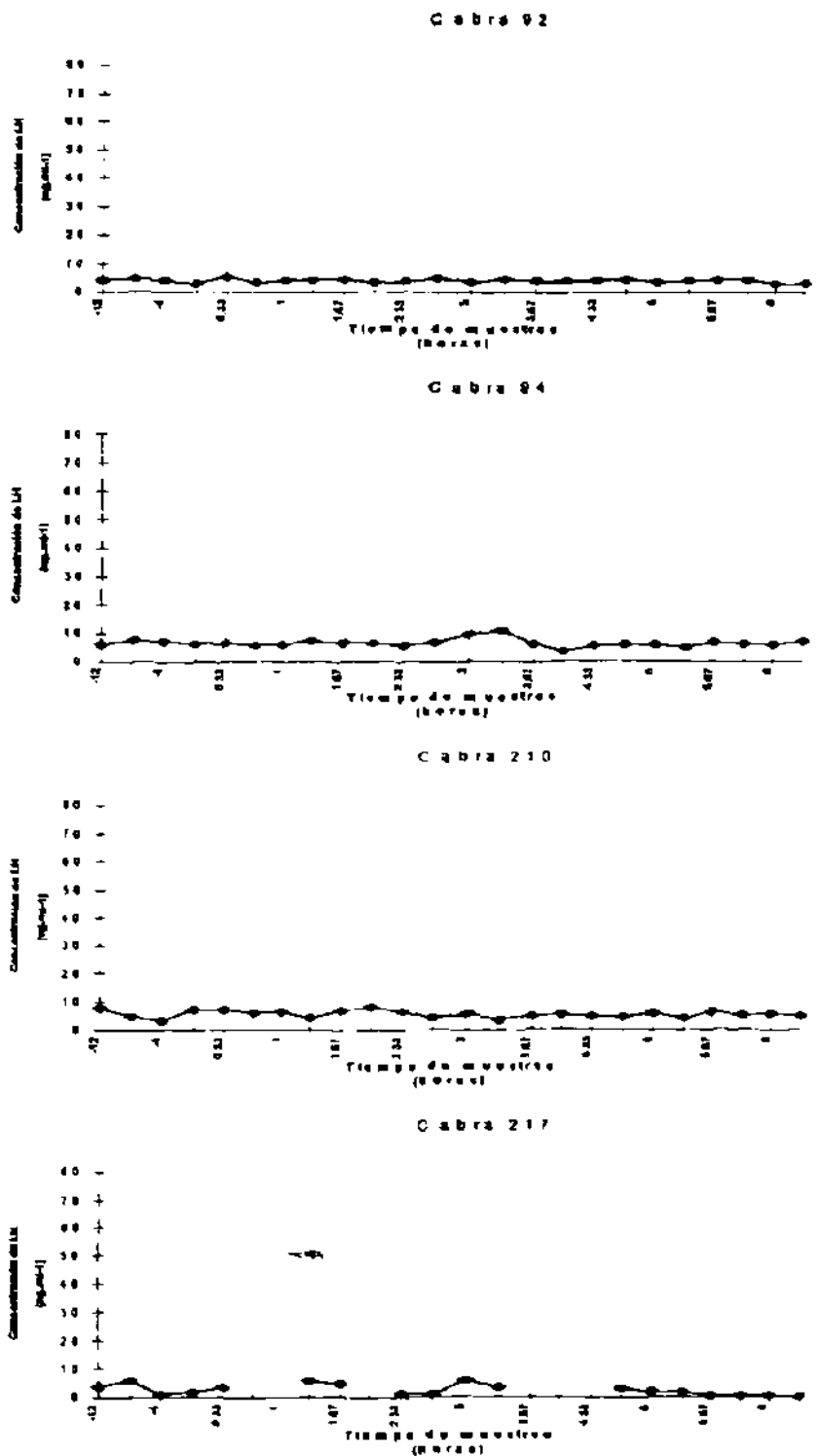


Figura A10.- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina fisiológica en la hora (tratamiento2, segunda administración de solución salina, muestreo 3)

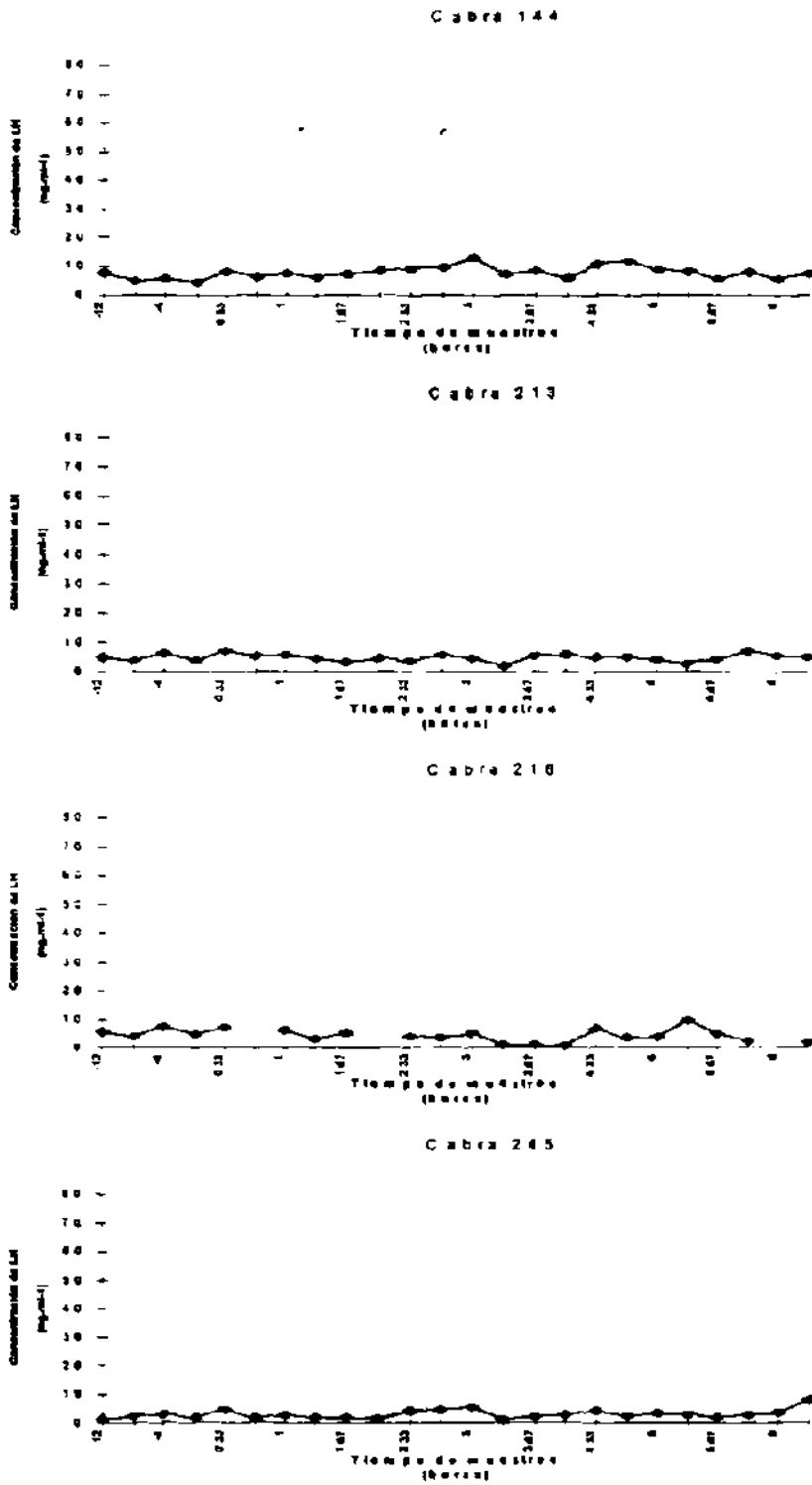
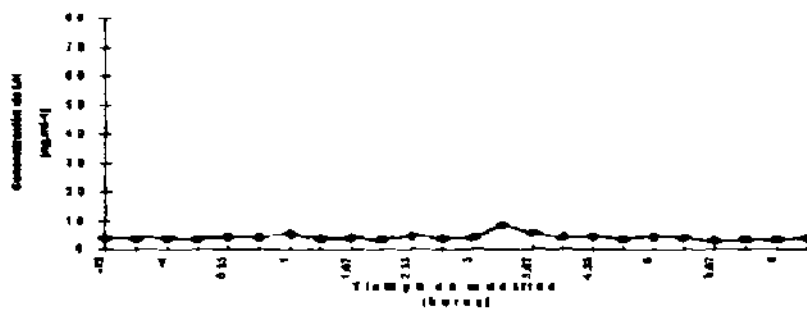
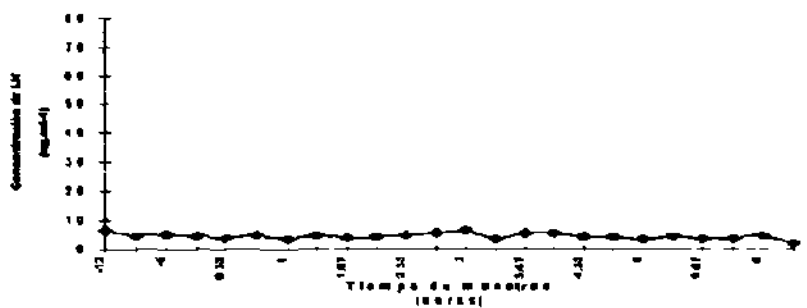


Figura A11 - Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró naloxona en la hora 0. (tratamiento 3, tercera administración de naloxona, muestreo 3).

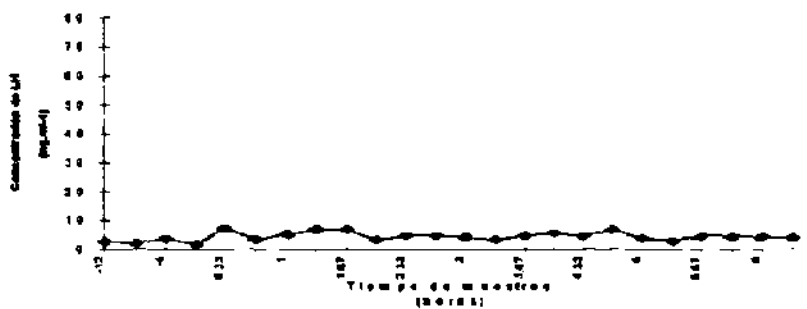
Cabra 26



Cabra 141



Cabra 181



Cabra 201

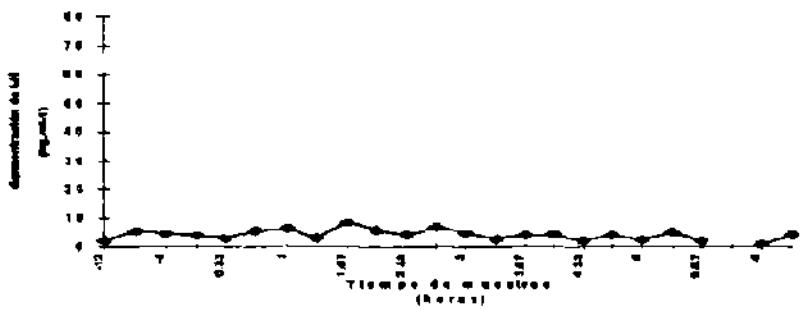


Figura A12- Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina en la hora 0 (tratamiento 4; tercera administración de solución salina; muestreo 3).

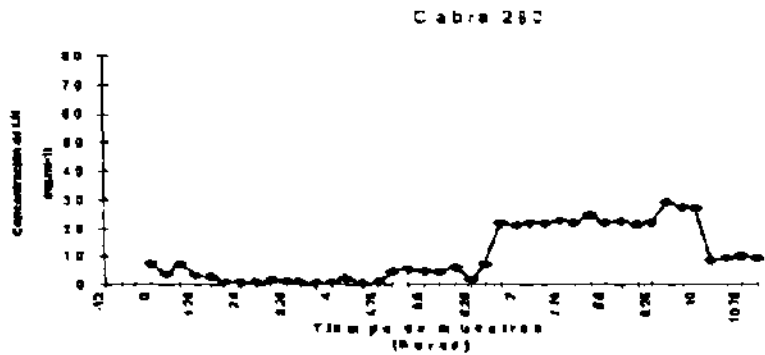
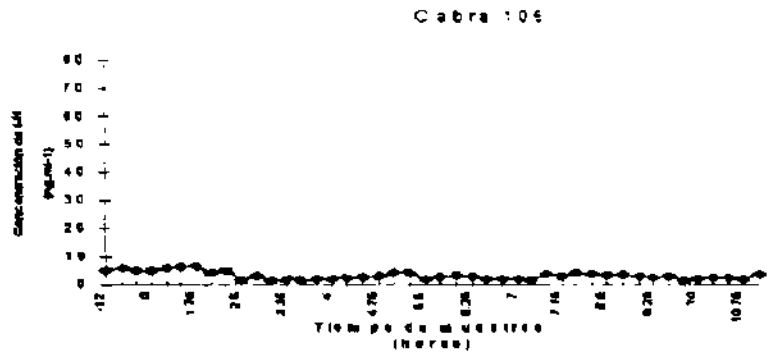
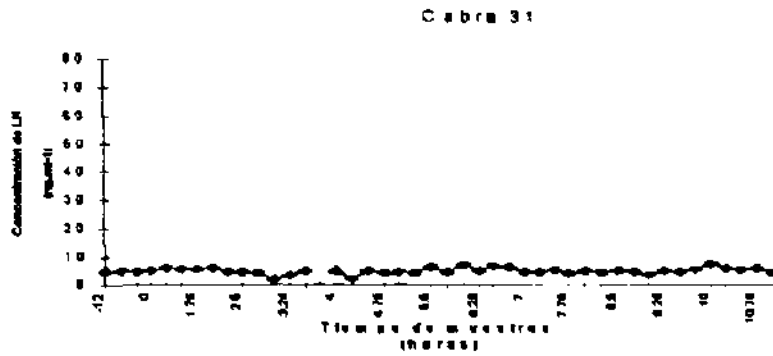
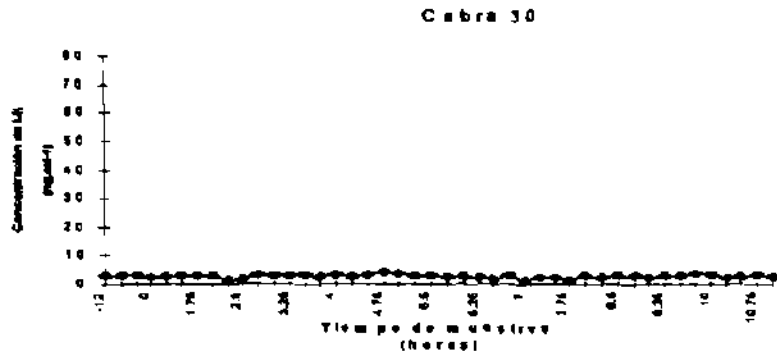


Figura A13.- Perfiles de LH observados en cada cabra, después de que se administró naloxona en la hora 0 (tratamiento 1; tercera administración de naloxona; muestreo 4).

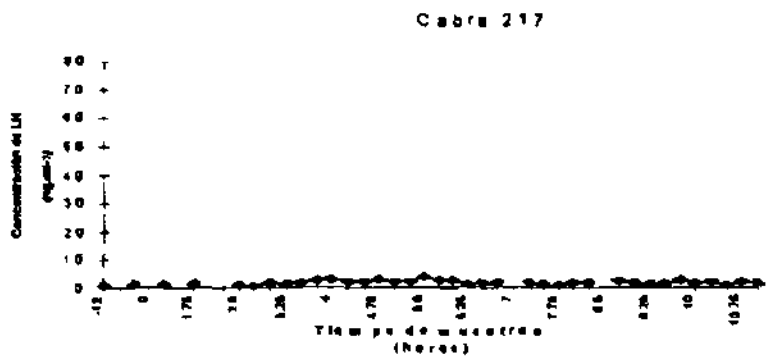
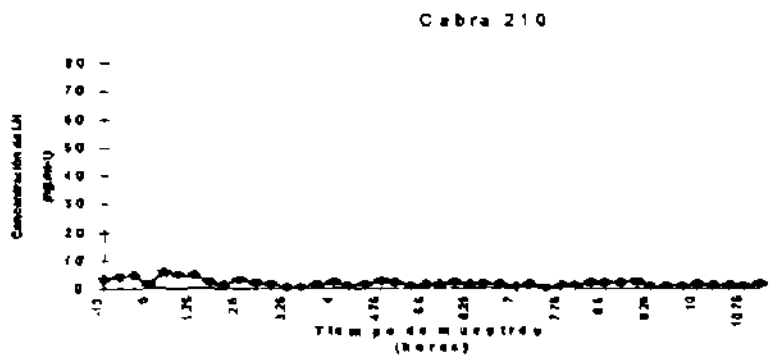
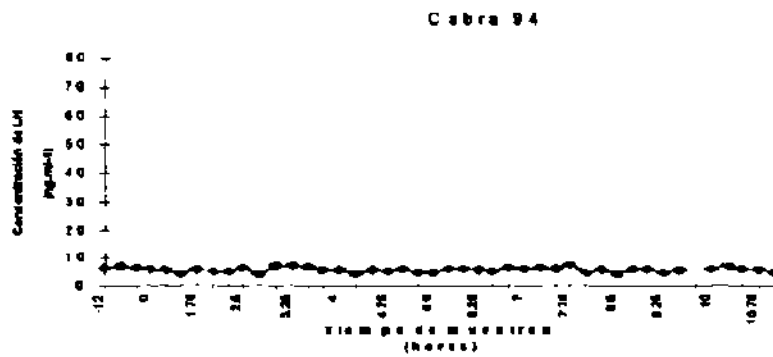
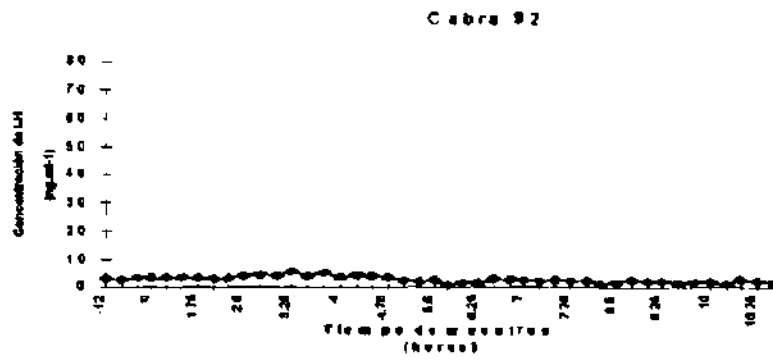


Figura A14 - Perfiles de LH observados en cada cabra, antes y después de que se administró solución salina fisiológica (tratamiento 2; tercera administración de solución salina; muestreo 4).

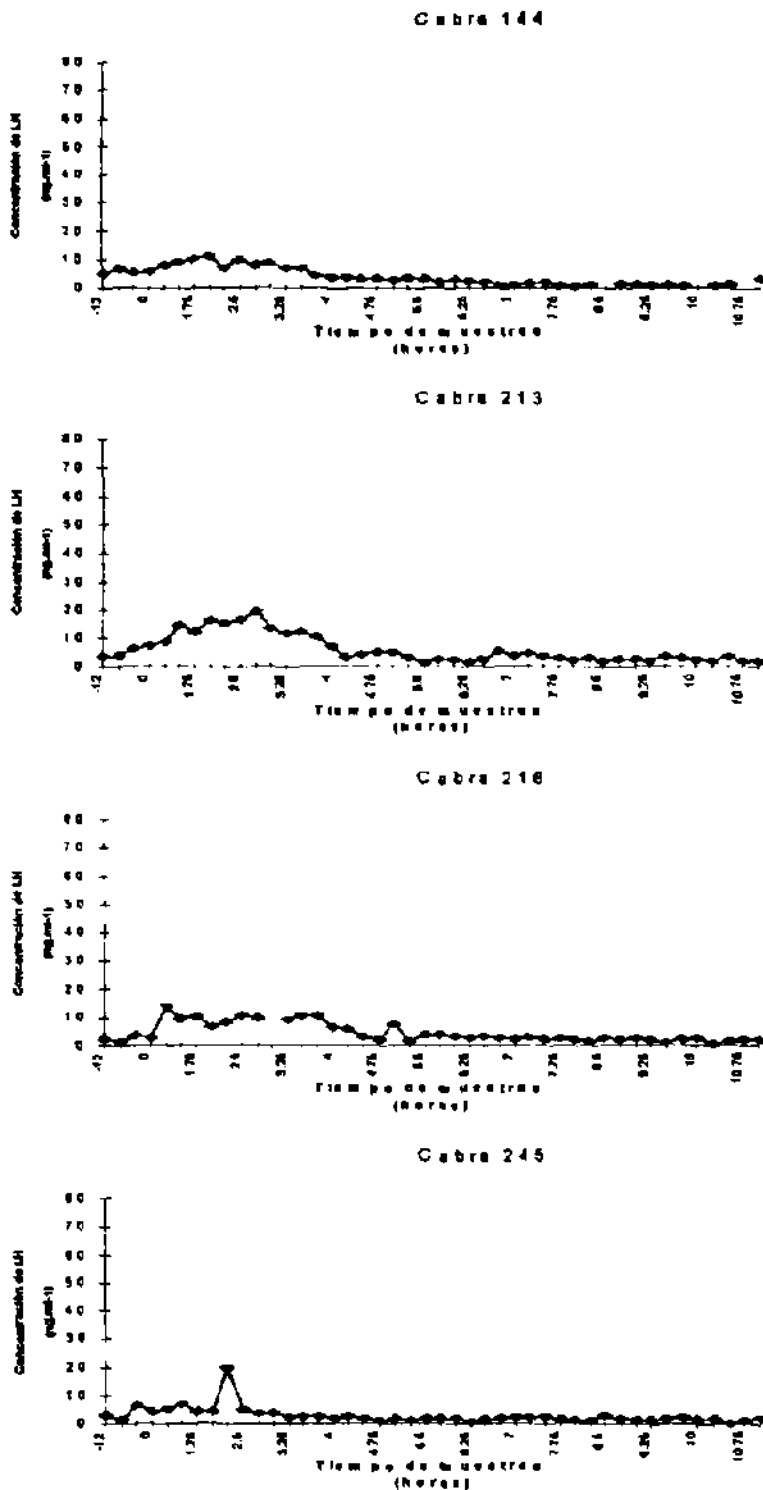


Figura A15.- Perfiles de LH observados en cada cabra, después de que se administró GnRH en la hora 0 (tratamiento 3, administración de GnRH: muestreo 4).

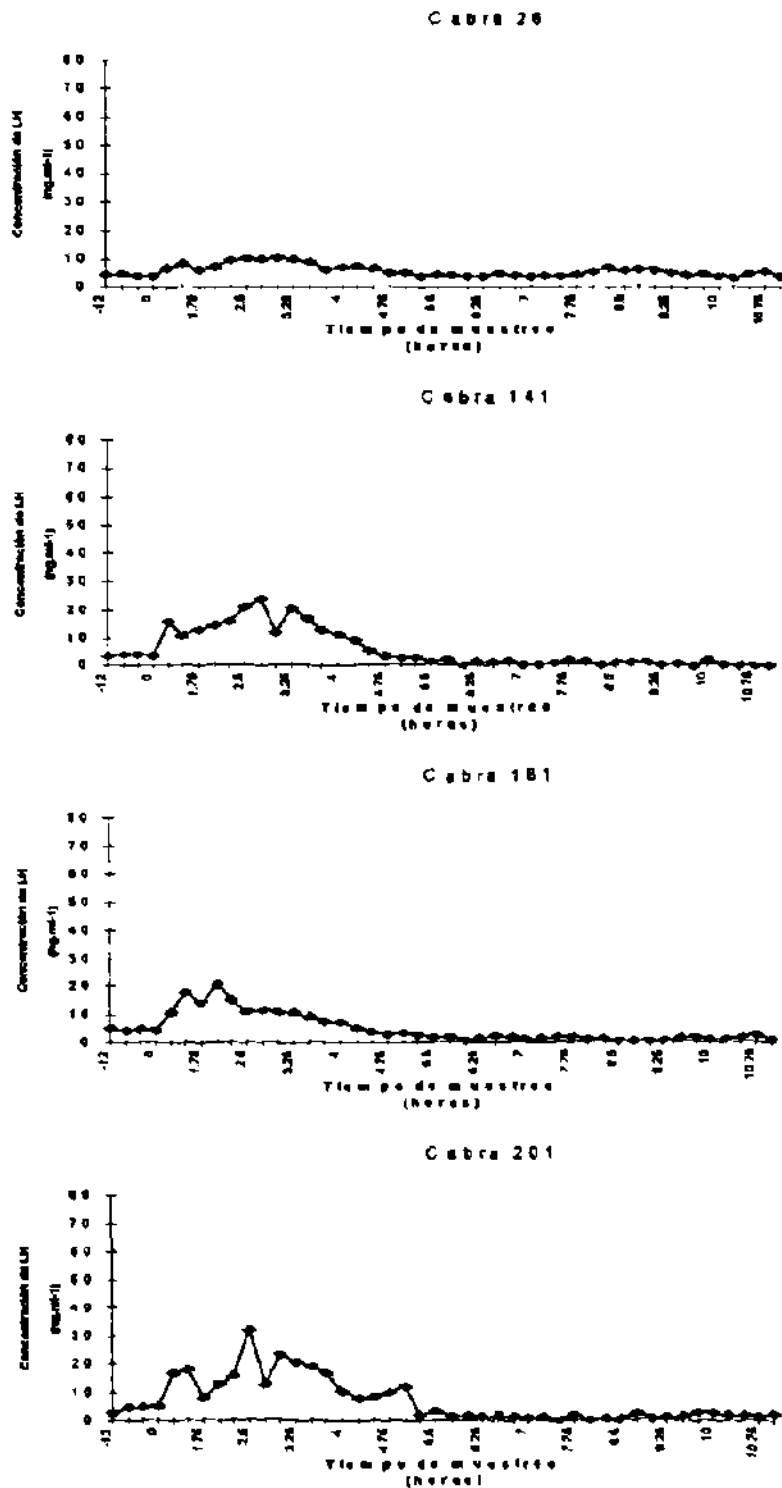


Figura A16.- Perfiles de LH observados en cada cabra, después de que se administró GnRH en la hora 0 (tratamiento 4; administración de GnRH; muestreo 4).



