

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DETERMINACIÓN DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN LECHE DE VACAS
CON LACTANCIA INDUCIDA MEDIANTE DOS PROTOCOLOS DISTINTOS**

Por

**Valentina CABRERA³
Yanela PURTSCHER¹**



TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2012**



FV-29571

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:



Dr. Daniel Cavestani

Segundo Miembro (tutor):



Dra. Gretel Ruprechter

Tercer Miembro:

Dr. Martín Aguerre

Fecha:

22 de Junio de 2012

Autores:

Br. Valentina Cabrera

Br. Yanela Purtscher

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gretel Ruprechter por su tutoría, apoyo, buena disposición y total dedicación en este trabajo.

Al Dr. Jorge Gil por la creación del trabajo experimental e información brindada.

A la Dra. Ana Meikle por su colaboración y orientación.

A los Brs. Diego Mérola y Gonzalo Rosas por haber realizado el trabajo de campo en el tambo.

A la empresa PILI S.A por financiar esta tesis.

Al todo el personal del tambo por su ayuda brindada.

Al Dr. Daniel Cavestany por su colaboración.

Al personal de Biblioteca y Hemeroteca por la proporción del material bibliográfico.

Al personal del Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria por su ayuda durante el trabajo experimental.

A nuestros familiares y parejas por su apoyo incondicional y por su confianza durante toda nuestra carrera.

A nuestros amigos y compañeros por ayudarnos y acompañarnos en estos años de estudio.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
Desarrollo de la glándula mamaria.....	11
<i>Rol hormonal en la mamogénesis</i>	12
<i>Lactogénesis</i>	13
<i>Galactopoyesis</i>	14
Estado Metabólico de la vaca lechera en transición.....	14
Metabolismo de estradiol y progesterona.....	16
Protocolos de inducción.....	17
<i>Concentraciones de estradiol y progesterona en leche de vacas inducidas</i>	21
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Animales.....	25
Tratamientos.....	25
Determinaciones Hormonales.....	26
Análisis Estadístico.....	27

RESULTADOS.....	28
Producción de Leche.....	28
Concentración de 17 β estradiol.....	29
Concentración de progesterona.....	31
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Descripción	Página
Cuadro 1: Tratamientos utilizados para la inducción a la lactancia.	26
Figura 1: Producción de leche diaria de vacas inducidas a la lactancia y vacas control.....	28
Figura 2: Producción de leche diaria en el primer mes de lactancia según tratamiento (T1:E ₂ +P ₄ , T2:E ₂ +P ₄ +E ₂ +P ₄ y control) y paridad (multíparas vs primíparas).....	29
Figura 3: Concentración de 17β estradiol en leche de vacas inducidas a la lactancia y vacas control.....	30
Figura 4: Concentración de 17β estradiol en el primer mes de lactancia según tratamiento (T1:E ₂ +P ₄ , T2:E ₂ +P ₄ +E ₂ +P ₄ y control) y paridad (primíparas vs multíparas).....	30

RESUMEN

La inducción hormonal a la lactancia se utiliza como una medida alternativa para no descartar animales con buen material genético que presentan fallas a la concepción. Esto se logra mediante la administración de estradiol y progesterona básicamente, pero es discutido el periodo de administración de estas hormonas. En este trabajo se estudió la producción láctea y la concentración de estradiol y progesterona en leche obtenida mediante inducción hormonal de lactancia utilizándose dos tratamientos distintos, comparándose con vacas posparto. Se seleccionaron 36 vacas Holando, las cuales se dividieron en tres grupos: control 6 vacas y 6 vaquillonas próximas a parir y 2 grupos (T1:E₂P₄ y T2:E₂P₄+E₂P₄) compuestos de 6 vacas y 6 vaquillonas cada uno. Se utilizaron dos protocolos de inducción de lactancia, a ambos lotes se les administró GnRH el día -6, progesterona y estradiol durante los días 1 al 7, PGF₂α el día 7 y dexametasona del día 15 al 18. Se diferencian en que el T2:E₂P₄+E₂P₄ recibió 5 días más de estradiol y progesterona, los días 14 a 18. Además se vuelve a administrar PGF₂α el día 14 en el T1:E₂P₄ y el día 18 en el T2:E₂P₄+E₂P₄. Se tomaron muestras de leche el 5°, 12°, 19°, 26° día de lactancia. Se determinó el tratamiento más efectivo mediante: cantidad de leche producida y determinación de residuos de estradiol y progesterona en leche entera a través de RIA. Todos los animales iniciaron su lactancia, y la producción láctea fue similar en ambos grupos tratados, pero menor que la producción obtenida de vacas control. Al comparar entre paridad (primíparas vs multíparas) se observa que en vacas primíparas la producción de leche es mayor en el T2:E₂P₄+E₂P₄, y en multíparas no existen diferencias en la producción entre ambos tratamientos. No se encontraron residuos de progesterona en ninguna de las muestras analizadas. En animales primíparas la concentración de estradiol fue mayor que en multíparas. La concentración de estradiol es más alta en la leche de los animales del T2:E₂P₄+E₂P₄ hasta el día 19 de lactancia comparado con la concentración de estradiol encontrada en el T1:E₂P₄. Al comparar la concentración de estradiol en leche del T1:E₂P₄ con el lote control se observa que no existen diferencias significativas en el primer mes de lactancia. Debido a estos resultados concluimos que el tratamiento de 7 días (E₂P₄) es el más indicado para la inducción hormonal a la lactancia en animales multíparas, mientras que los animales primíparas producen más leche con el tratamiento prolongado (12 días), presentando altos residuos de estradiol.

SUMMARY

(15)

Hormonal induction on lactation is used as an alternative action for not discarding animals with good genetic material that had failures to conception. This is achieved by the administration of estradiol and progesterone basically, but is discussed the period of administration of these hormones. In this work was studied milk production and estradiol and progesterone concentration in milk obtained by hormonal induction of lactation using two different treatments and compared with postpartum cows. Thirty six Holstein cows were used and divided into three groups: control six cows and six heifers near calving, and 2 groups (T1:E₂P₄ and T2:E₂P₄+E₂P₄) composed six cows and six heifers each. Two different protocols to induce lactation were used, both lots were given GnRH day -6, progesterone and estradiol during days 1 to 7, PGF₂ α day 7 and dexamethasone days 15 to 18. They differ in that the T2:E₂P₄+E₂P₄ receives 5 more days of estradiol and progesterone days 14 to 18. Besides PGF₂ α is given again day 14 in T1:E₂P₄, and day 18 in T2:E₂P₄+E₂P₄. Milk samples were taken on 5°, 12°, 19° and 26° of lactation. The most effective treatment was determined by means of: milk yields produced and determination of residues of estradiol and progesterone in whole milk by RIA. All animals initiate their lactation and milk yields obtained was similar in both treatment groups, but lower than production of control cows. When compared between parity (primiparous vs multiparous) is observed that primiparous milk production is higher in T2:E₂P₄+E₂P₄, and in multiparous there are no differences in production between both treatments. No residues of progesterone were found in the samples analyzed. In primiparous cows the concentration of estradiol is higher than multiparous. The concentration of estradiol is higher in the milk of animals of T2:E₂P₄+E₂P₄ until day 19 of lactation, compared with the concentration found in T1:E₂P₄. Comparing estradiol concentration in milk of T1:E₂P₄ with the control group shows that there are no significant differences on the first month of lactation. Because of these results we conclude that treatment of 7 days (E₂P₄) is the most suitable for hormonal induction of lactation in multiparous cows, while the primiparous produce more milk with prolonged treatment (12 days), presenting high residues of estradiol.

INTRODUCCIÓN

En las últimas cinco décadas se ha observado una disminución significativa de la fertilidad en rodeos lecheros de todo el mundo, coincidiendo con un incremento en la producción de leche (Hernández y Morales, 2001). En Uruguay la producción de leche ha mostrado un proceso constante de crecimiento, aumentando el 20% respecto a los valores alcanzados a finales de la década del 90. La producción por vaca en ordeño y por año creció un 47%, lo que refleja un mejor manejo animal, ya sea a nivel de la nutrición y/o de la selección genética (Davezies, 2008). La intensidad de selección genética para altas producciones ha reducido la fertilidad, viéndose reflejado en baja expresión del estro, oocitos/embriones defectuosos e infecciones uterinas (Dobson y col, 2007). Actualmente es común, en los sistemas de producción intensiva de leche, que el porcentaje de concepción en vacas de primer servicio no sea mayor de 35 % (Hernández y Morales, 2001). La falla en la concepción, o infertilidad, constituye el problema reproductivo más importante en los rodeos lecheros; considerándose la principal causa de baja productividad en la empresa lechera. Sin embargo, la baja fertilidad no es provocada por la lactancia como proceso fisiológico, sino por los cambios metabólicos que impone la producción de grandes volúmenes de leche y el inadecuado consumo de alimento. Así, las vacas lecheras después del parto caen en un balance energético negativo (BEN), lo cual significa que la suma de la energía necesaria para su propio mantenimiento y la que requieren para producir es mayor que la consumida, por lo que se ven obligadas a utilizar sus reservas corporales. El BEN afecta el control neuroendocrino de la reproducción, llevando a una baja fertilidad (Butler, 2000).

La inducción de la lactación es un método eficiente para que las vacas improproductivas produzcan, ya que puede ser adaptado a las condiciones de campo, teniendo una buena rentabilidad. Una ventaja adicional de la inducción a la lactancia es que existen evidencias de que el 20% de las vacas sometidas al tratamiento vuelven a una vida reproductiva normal, pudiendo quedar gestantes (Valdez y col, 2003). En la década del '60 se comenzaron a realizar las primeras inducciones artificiales de lactancia en vacas, las cuales se lograban con la administración de estrógenos y progesterona por períodos prolongados de tiempo para lograr el desarrollo de la glándula mamaria, seguido por dosis relativamente altas de estrógenos para iniciar la secreción de leche. En general, la producción de leche así obtenida era menor que la producida naturalmente, e incluso una proporción de vacas no iniciaba su lactancia (Cowie, 1971). Smith y Schanbacher (1973) modificaron los procedimientos de la década del '60, aumentando la dosis diaria de estrógenos e inyectando vía subcutánea 17β estradiol y progesterona, durante 7 días. Sin embargo, la producción lechera obtenida luego de este tratamiento era variable, y generalmente más baja que la esperada para vacas posparto. Fulkerson y McDowell (1975) demostraron que una serie de inyecciones con dexametasona inducían la lactancia en animales previamente tratados con estrógenos y progesterona. Jewell (2002) realizó un ensayo en el cual demostró que la sincronización del estro con prostaglandina ($PGF2\alpha$) previo al tratamiento de inducción con estrógenos y progesterona aumenta la tasa de éxito. Mellado y col (2006) modificaron el tratamiento tradicional de 7 días por un tratamiento más largo, el cual podría provocar una acción mamotrófica mayor, asemejándose más a una mamogénesis fisiológica (Mellado y col, 2006). Por otra parte se ha reportado que la administración

hormonal por períodos prolongados podría insensibilizar al órgano blanco, por lo cual sería de interés conocer el efecto de un descanso de 7 días durante un tratamiento prolongado (Meikle, 2001). En Uruguay no hemos encontrado reportes sobre inducción hormonal a la lactancia; y sería de interés conocer si vacas inducidas logran niveles productivos comparables con animales control. Además como se mencionó anteriormente el protocolo progesterona, estrógenos, dexametasona ha sido reportado como exitoso, sin embargo se desconoce si un tratamiento prolongado de ambas hormonas (progesterona y estrógenos) con un período de descanso de 7 días, puede resultar en mejores rendimientos.

Otro aspecto a tener en cuenta es la presencia de residuos en leche proveniente de vacas inducidas. Se consideran impropias para el consumo humano las leches procedentes de animales enfermos y mal nutridos, así como las que contengan calostro, residuos medicamentosos u hormonales (Fehlhaber y Janetschke, 1992). La Organización Mundial de la Salud ha establecido ciertas recomendaciones, orientadas a señalar para una amplia serie de sustancias las cantidades máximas consideradas inocuas (tasa de tolerancia). Para asegurar que los residuos presentes en los alimentos como resultado del empleo de medicamentos o sustancias químicas desciendan hasta los valores de tolerancia, se ha creado el concepto de tiempo de espera. Por tal se entiende el tiempo que debe transcurrir entre la última administración del producto químico y el sacrificio o la obtención de leche y huevos con destino a la alimentación humana (Fehlhaber y Janetschke, 1992). La mayoría de los estudios en los cuales se determinó la concentración residual de las drogas administradas para la inducción de la lactancia demostraron que las concentraciones séricas y en leche de las hormonas utilizadas son similares a las encontradas en vacas post-parto (Ribeiro, 2009). Jewell (2002) reportó que las concentraciones de progesterona en leche de vacas sometidas a un protocolo de inducción (en el cual la última dosis administrada de progesterona fue 13 días antes del inicio de la lactancia) fueron muy bajas desde el primer día de lactancia, sin diferencias significativas entre el grupo de vacas inducidas y las no tratadas. Davis y col (1983) determinaron que la concentración de estrógenos en leche de vacas inducidas a la lactancia fue menor que la encontrada en leche comercial. No se encontraron reportes de residuos a nivel internacional cuando se prolonga el tratamiento de esteroides dejando un descanso.

El principal objetivo de nuestra tesis es investigar si la leche obtenida de vacas inducidas artificialmente a la lactancia mediante un protocolo en el cual se administran estradiol y progesterona por 7 días (T1:E₂P₄) o un protocolo en el cual se administran estradiol y progesterona por 7 días, se deja un descanso de 5 días y se vuelven a administrar ambas hormonas por 5 días más (T2:E₂P₄+E₂P₄) presenta residuos hormonales, luego del tiempo de espera correspondiente, que puedan ser perjudiciales para la salud humana. También estudiaremos la producción de leche que se obtiene mediante distintos protocolos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Desarrollo de la Glándula mamaria

La glándula mamaria se localiza en la región inguinal; normalmente los bovinos tienen cuatro pezones y glándulas funcionales, cada pezón tiene un conducto galactóforo o canal estriado y drena una glándula separada (Chung y Jacobson, 1999).

Los alvéolos o acinos mamarios son la unidad funcional de la glándula mamaria. La leche se forma en las células del epitelio que tapizan los alvéolos mamarios (Lacasa, 2003). Los alvéolos están rodeados por células mioepiteliales contráctiles que participan en el reflejo de expulsión de la leche (o bajada de la leche). A su vez están agrupados en unidades conocidas como lobulillos; los lobulillos se agrupan en unidades más grandes llamadas lóbulos (Chung y Jacobson, 1999). Éstos se comunican mediante un tubo colector a la cisterna de la glándula. Esta cisterna desemboca en la cisterna del pezón por un repliegue de la mucosa. El pezón se abre al exterior mediante un fino canal único, el conducto galactóforo, ocluido por un esfínter liso (Lacasa, 2003).

El desarrollo de la glándula mamaria está relacionado al desarrollo reproductivo, lo cual ocurre en distintas fases: durante la vida fetal, la pubertad, la preñez y la lactación (Squires, 2010). La glándula mamaria, como todas las glándulas multicelulares, es epitelial. Esto indica que se origina del ectodermo germinal y de los brotes mamarios primitivos. En la vaca el brote mamario aparece aproximadamente el día 40 de la gestación. En el día 80 el pezón y el brote primario están formados. El brote primario origina a la cisterna del pezón. Al momento del nacimiento, el pezón, la cisterna del pezón, y la cisterna de la glándula están formados. El crecimiento de los brotes secundarios produce la mayoría de los conductos que drenan los alvéolos en la glándula madura. El crecimiento y desarrollo de la glándula luego del nacimiento está estimulado por el inicio de la actividad ovárica en la pubertad (Akers, 2002).

La glándula mamaria es uno de los pocos tejidos que puede repetidamente desarrollarse, diferenciarse y regresar (Akers, 2002). Al nacimiento, el tejido no epitelial de la glándula mamaria, incluyendo el tejido conectivo y los vasos sanguíneos y linfáticos, ya están formados. Sin embargo el tejido glandular y secretorio todavía es rudimentario. Desde los 2 o 3 meses de vida hasta un tiempo antes de la pubertad la glándula se encuentra en una fase de crecimiento alométrica en la cual crece más rápido que otras partes del cuerpo. Durante este período el tejido adiposo y los conductos mamarios crecen rápidamente, pero no se forma ningún alveolo. En la pubertad, la glándula mamaria bovina pesa entre 2 y 3 kilos, de los cuales 0,5 a 1 kg corresponde a tejido parenquimatoso (10-20% de células epiteliales, 40-50% tejido conectivo, 30-40% adipocitos). Entre la pubertad y la preñez ocurren muy pocos cambios (Squires, 2010).

Durante la gestación temprana crecen los conductos mamarios, y desde la mitad de la preñez en adelante hay un extenso desarrollo lóbulo alveolar. La creación de la estructura lóbulo alveolar durante la gestación no implica la secreción de leche por las células alveolares. El crecimiento y desarrollo durante este período determina el

número de células secretoras de leche y por lo tanto el potencial de producción lechera (Squires, 2010). Las células alveolares deben sufrir progresivos cambios estructurales y bioquímicos para la producción láctea al parto. También se deben desarrollar las células mioepiteliales que rodean los alvéolos y su vascularización. El reflejo de eyección de leche se produce por la contracción (inducida por la oxitocina) de las células mioepiteliales para aumentar la presión interna de los alvéolos y así forzar la salida de la secreción por los ductos. La secreción mamaria, primero como calostro y luego como leche provee al neonato los nutrientes necesarios para la buena salud y el desarrollo temprano. Nutricionalmente la leche de todos los mamíferos contiene cantidades variables de proteínas, carbohidratos y grasas suspendidas en un medio acuoso (Akers, 2002).

Distintas hormonas están involucradas en el ciclo de la lactación. Las hormonas reproductivas (estrógenos, progesterona, prolactina y oxitocina) actúan directamente en la glándula mamaria. Las hormonas metabólicas (hormona del crecimiento (GH) y su mediador el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I), glucocorticoides, hormona tiroidea (TRH) e insulina) regulan indirectamente la producción de leche debido al flujo de nutrientes que llega a la glándula mamaria. La glándula mamaria también produce hormonas incluyendo GH, prolactina, péptido relacionado a la hormona paratiroidea y leptina (Squires, 2010).

Rol hormonal en la mamogénesis

El término mamogénesis se refiere al desarrollo del parénquima de la glándula mamaria.

Los estrógenos y la progesterona son hormonas esteroideas sintetizadas en el ovario a partir del colesterol. Los estrógenos son responsables del desarrollo de los órganos genitales durante la pubertad y de los caracteres sexuales secundarios (Jewell, 2002). Los estrógenos estimulan el crecimiento de los ductos mamarios, aumentan el estroma y la formación de grasa (Tucker, 2000). Durante el ciclo estral la concentración de estrógenos aumenta con el desarrollo folicular y la aparición del folículo dominante, pero con la ovulación la concentración disminuye a medida que aumenta la progesterona (Ribeiro, 2009). La progesterona es la hormona de la gestación, siendo su principal función en el aparato genital de la hembra el mantenimiento de las condiciones óptimas para el buen término de la misma. A su vez tiene un rol importante en la lactancia ya que junto con los estrógenos favorece el desarrollo lóbulo-alveolar de la glándula mamaria durante la preñez (Jewell, 2002). La ausencia de aumento simultáneo de las dos hormonas esteroideas en el ciclo estral probablemente explica el fracaso del desarrollo del tejido parenquimatoso durante este período (Ribeiro, 2009). Durante la preñez la concentración de estradiol es alta con un aumento significativo en las últimas semanas antes del parto. Por lo tanto es necesario que las concentraciones de estrógenos y progesterona se encuentren en niveles altos para provocar el desarrollo mamario durante la preñez (Ribeiro, 2009).

La función de los glucocorticoides es la diferenciación de las células alveolares; esta diferenciación es esencial para que luego la prolactina pueda inducir la síntesis de proteínas de la leche (Tucker, 2000). En general la concentración de glucocorticoides en sangre es baja, y excepto los episodios que provocan estrés, se

mantiene estable durante toda la gestación. La concentración basal es entonces suficiente para su actuación en la mamogénesis. Los receptores específicos para los glucocorticoides presentes en las células mamarias aumentan a lo largo de la gestación, llegando a triplicarse en número en el último trimestre (Ribeiro, 2009).

Lactogénesis

La lactogénesis es el inicio de la síntesis láctea, que ocurre al final de la preñez y primeros días posparto. Se divide en un proceso de diferenciación (etapa I) y otro de activación (etapa II) basado en diferencias en la secreción láctea, expresión genética y propiedades funcionales y estructurales de las células alveolares (Neville y col, 2002). La etapa I de la lactogénesis consiste en la diferenciación parcial enzimática y citológica de las células alveolares y coincide con la secreción limitada de leche antes del parto. El segundo estadio comienza con la secreción copiosa de todos los componentes de la leche, poco tiempo antes del parto y continúa varios días después del mismo en la mayoría de las especies (Chung y Jacobson, 1999). Por lo tanto, la etapa I de la lactogénesis se puede caracterizar por cambios químicos graduales y cambios morfológicos, y la etapa II es el resultado de la precisa regulación del status metabólico del animal para favorecer la gran demanda de substratos de la glándula mamaria (Neville y col, 2002).

Para que la acción lactogénica sea adecuada, se precisa la presencia de prolactina en la glándula mamaria, de glucocorticoides, de insulina y GH (Tucker, 2000). Los estrógenos también son responsables del inicio de la lactogénesis al parto. Iniciando la lactación de dos maneras: 1) causan la liberación de prolactina desde la glándula pituitaria anterior hacia la sangre, 2) aumentan el número de receptores de prolactina en las células mamarias (Jewell, 2002).

Durante la preñez la progesterona se encuentra en altos niveles, bloqueando la lactogénesis de diversas maneras: suprimiendo la habilidad de la prolactina de aumentar el número de sus receptores en la glándula mamaria; y bloqueando los receptores de glucocorticoides. Sin embargo el bloqueo de la progesterona no es absoluto. Si así fuera, la lactación y gestación simultáneas sería imposible (Chung y Jacobson, 1999). Por lo tanto el inicio de la secreción copiosa de leche alrededor del parto requiere de la interacción sistemática de una caída de progesterona combinada con un aumento de prolactina y glucocorticoides (Knight y col, 1998).

Inyecciones de glucocorticoides en vacas no lactantes con desarrollo del tejido lóbulo-alveolar inducen el inicio de la lactancia. En el ganado vacuno, los glucocorticoides son intensamente liberados en respuesta a los estímulos de ordeño, y esta respuesta no cambia con el progreso de la lactancia (Ribeiro, 2009). Muchos estudios han demostrado que la administración exógena de glucocorticoides a dosis terapéutica inhibe la producción de leche, y esto puede significar que altas concentraciones pueden evitar el reflejo de eyección de leche; pero dosis bajas pueden utilizarse para aumentar la producción (Fulkerson y McDowell, 1975). En resumen, es probable que los glucocorticoides sean especialmente importantes para la diferenciación de las células alveolares durante la lactogénesis, y por lo menos una mínima concentración es necesaria para el mantenimiento de la lactancia (Ribeiro, 2009).

Galactopoyesis

La galactopoyesis es el mantenimiento de la actividad secretora de leche durante todo el proceso de lactación (Caravaca y col, 2003).

Para conservar la lactación se requiere mantener el número de células alveolares, la actividad de síntesis por célula y la eficiencia del reflejo de expulsión de leche (Chung y Jacobson, 1999).

Las hormonas liberadas por la glándula pituitaria son esenciales para la regulación endócrina de la secreción de leche. Estudios muestran que la prolactina, GH, los glucocorticoides y las hormonas tiroideas son requeridas para mantener la lactancia (Caravaca y col, 2003). También son necesarias para el mantenimiento de la síntesis de leche la hormona paratiroidea y la insulina (Ribeiro, 2009). El ordeño frecuente es esencial en la galactopoyesis. Aunque el complejo de control hormonal de la lactancia funcione correctamente, sin el ordeño frecuente de la ubre, la síntesis de leche no va a persistir (Tucker, 1985). En los bovinos el estímulo del ordeño es necesario para la liberación de prolactina, hormona adrenocorticotropa (ACTH) y oxitocina a la sangre. El vaciado de la glándula mamaria se lleva a cabo por la oxitocina, hormona responsable de la contracción de las células mioepiteliales resultando en la eyección de leche. La eliminación de la leche es capaz de prevenir la muerte celular que se inicia aproximadamente dos días después de la interrupción del ordeño (Neville, 2006). La prolactina es secretada desde la hipófisis mediante un reflejo neuroendócrino en respuesta al estímulo de succión sobre la ubre. Aunque la prolactina es claramente necesaria para el mantenimiento de la lactancia, las concentraciones plasmáticas de prolactina no se correlacionan con la tasa de secreción de leche (Neville, 2006).

La GH aumenta la producción de leche en rumiantes, y es por esto que la GH tiene un uso comercial en los rodeos lecheros con el nombre de somatotropina bovina recombinante (rBST) un producto biotecnológico capaz de aumentar la producción (tanto de leche como de carne) por unidad de alimento consumido (Ribeiro, 2009).

Por lo menos una mínima concentración de glucocorticoides es necesaria para el mantenimiento de la lactancia. En rumiantes existe evidencia de que los glucocorticoides son limitantes para la producción de leche, y por más que la adrenalectomía reduzca la producción de leche, la misma puede ser restaurada con el tratamiento de glucocorticoides (Akers, 2002).

Está demostrado que las hormonas tiroideas presentan un efecto galactopoyético dado que luego de su administración aumenta la producción de leche, logrando un mayor efecto en vacas de alta producción y las más viejas (Tucker, 1985).

La insulina está implicada en la captación de los nutrientes hacia la glándula mamaria durante la lactancia. Cuando existe un exceso de glucosa la insulina estimula la lactancia (Tucker, 2000).

Estado Metabólico de la vaca lechera en transición

Las vacas lecheras experimentan grandes adaptaciones metabólicas entre las últimas semanas de la preñez y la lactancia temprana. El llamado período de transición ha sido definido de diversas maneras, pero en general, es considerado

como aquel período que transcurre desde tres semanas antes del parto hasta tres o cuatro semanas luego del parto (Correa, 2001). Durante este período: la gestación, el descenso del consumo de materia seca durante la gestación tardía, la lactogénesis y el parto tienen dramáticos efectos en el metabolismo de vacas lecheras (Grummer, 1995); el animal debe adaptarse a los cambios que le exigen el pasar de un estado de preñez y sin producir leche a estar vacía y produciendo leche (Correa, 2001).

Las vacas al final del período de gestación y al inicio de la lactación muestran una alta demanda energética, que si no se manejan apropiadamente pueden causar ciertos desordenes metabólicos y nutricionales que van a repercutir significativamente sobre la eficiencia y economía del sistema de producción de leche (Fernández, 2009).

Durante las 2-4 últimas semanas de gestación se produce un aumento sustancial de las necesidades energéticas debido al desarrollo fetal y a las necesidades de síntesis de calostro. Esta situación se acompaña de una disminución de un 30 a 35% en la ingestión de materia seca (Fernández, 2009) durante las últimas tres semanas preparto, provocando una diferencia energética entre las necesidades del animal y los aportes alimentarios, generándose un BEN (Grummer y col, 2004). Esta diferencia energética es aún mayor en vaquillonas que en vacas debido a que las primeras tienen mayores requerimientos, deben de afrontar la preñez y su propio crecimiento (Grummer, 1995).

Las adaptaciones que ocurren a nivel del organismo para afrontar los cambios durante el período de transición suceden principalmente a nivel del tejido adiposo, hígado, músculo, intestino y glándula mamaria (Grummer, 1995). El metabolismo cambia de un estado anabólico preparto a otro catabólico posparto, donde la grasa del tejido adiposo principalmente y la proteína del músculo esquelético en menor grado son movilizadas en respuesta al BEN causado por la copiosa producción láctea (Chilliard, 1999).

La demanda de glucosa por la glándula mamaria es tres veces más alta al comienzo de la lactancia que la del útero grávido al final de la gestación (Correa, 2001). El déficit energético conduce a una disminución de los niveles de glucosa e insulina en sangre que estimulan la movilización de grasa resultando en un aumento en los ácidos grasos no esterificados (AGNE) en sangre que son utilizados por el hígado (Fernández, 2009). Ésta movilización de reservas corporales, puede determinar una pérdida de peso de entre 50 y 70 kg lo que equivale a un 30 a 40% de las reservas grasas, causando un descenso de la condición corporal (CC) en vacas que producen 40 litros de leche por día en sistemas de estabulación (Chilliard, 1999).

Los AGNE son utilizados por la glándula mamaria provocando el aumento de la grasa en la leche y también por el hígado donde son consumidos en la β -oxidación para producción de energía, oxidados a cuerpos cetónicos o almacenados como triglicéridos (TG) o exportados bajo la forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Grummer y col, 2004). Al ser superada la capacidad hepática de hidrólisis de los TG y su salida como VLDL, se predispone a la degeneración grasa hepática y cetosis (Grummer, 1995).

Es durante el período de transición que las deficiencias y/o desequilibrios nutricionales suelen ser el origen de las denominadas “enfermedades de la producción” que, además de incluir a los clásicos desórdenes metabólicos (cetosis, hígado graso, hipocalcemia puerperal, tetania hipomagnésica), abarca a un conjunto de afecciones clínicas o subclínicas, como afuncionalidad de los preestómagos, afecciones podales, trastornos reproductivos y mayor incidencia de algunas enfermedades infecciosas (Corbellini, 2000).

Metabolismo de estradiol y progesterona

Los estrógenos naturales son esteroides con 18 átomos de carbono, un anillo fenólico y un grupo hidrófilo β . El 17β estradiol es el más potente de los principales estrógenos que se encuentran tanto en humanos como en animales. Es el principal producto secretado por el ovario y se oxida fácilmente y se transforma en estrona en el hígado y está ligado en más del 50% a proteínas plasmáticas. Los estrógenos están distribuidos en todo el cuerpo y se acumulan en el tejido adiposo. La eliminación de estrógenos esteroides se da principalmente a través del metabolismo hepático. El 17β estradiol, estrona o estriol son eliminados como conjugados de glucurónido o sulfato. Los estrógenos y sus metabolitos son eliminados principalmente a través de la orina pero además son eliminados a través de la bilis (donde la mayoría son reabsorbidos desde el tracto intestinal) y la leche. El benzoato de estradiol se produce por la esterificación del 17β estradiol. Los estrógenos esterificados poseen absorción retardada luego de su administración. Una vez en la circulación, el éster es hidrolizado y la actividad biológica vuelve a ser la del 17β estradiol normal. Por lo tanto la duración de la acción depende de la absorción y no del metabolismo. La concentración de estradiol en plasma muestra un pico a las 6 horas luego de administrar 17β estradiol vía intramuscular y disminuye a niveles basales a las 36 horas. Al administrar benzoato de estradiol intramuscular la concentración de estradiol en plasma no aumenta tan rápidamente como con 17β estradiol, sino que alcanza un pico y disminuye más lentamente regresando a niveles basales a las 96 horas (Bó y col, 2006).

La progesterona es una hormona esteroidea de 21 átomos de carbono. Presenta una corta vida media en sangre de 10-20 minutos. Aunque se elimina con rapidez sus acciones sobre los tejidos continúan después de haber desaparecido del plasma. Cerca del 2% de la progesterona circulante es libre, mientras que el 80% se une a la albúmina y el 18% se une a la globulina. La progesterona es convertida en el hígado a pregnadiol, el cual es conjugado a ácido glucurónico y excretado por la orina en su mayoría, también por bilis y leche (Booth y McDonald, 1988).

La progesterona liberada por un dispositivo intravaginal bovino (CIDR) es estructuralmente idéntica a la endógena y tiene un rol importante sobre la dinámica folicular ovárica de los niveles supra luteales ($> 1\text{ng/ml}$) obtenidos a los pocos minutos de la introducción del dispositivo (Bó y col, 2002).

La opción más efectiva y ampliamente difundida para la suplementación con progestágenos ha sido la inserción de dispositivos intravaginales de liberación controlada (DIV) y sus perfiles sanguíneos han sido objeto de numerosos estudios, por ejemplo Nation y col (2000) realizaron un estudio sobre vacas Holando y Jersey primíparas en anestro en el cual registraron los valores máximos de progesterona en

sangre 24 horas luego de la inserción de un dispositivo CIDR el cual permaneció insertado en los animales por un lapso de 5 días. Los niveles circulantes fueron descendiendo progresivamente hasta 2.6 ng/mL al día 4, valor en el que se mantuvieron al día 5 cuando se retiró el dispositivo. Luego de retirado el dispositivo, la concentración de progesterona desciende a niveles subluteales las 6 horas.

Recientemente ha surgido en el mercado una fuente alternativa de aplicación de progestágenos a los ya tradicionales DIV. La novedad consiste en la aplicación parenteral de progesterona natural en base oleosa de liberación lenta, la cual es administrada mediante inyección subcutánea y mantiene niveles luteales en sangre por al menos 5 días (Cavestany y col, 2008). En un experimento diseñado para comparar los niveles plasmáticos de progesterona obtenidos mediante la aplicación de la progesterona inyectable comparada con un DIV se determinó que las concentraciones circulantes de progesterona se mantuvieron por encima de 1 ng/ml durante largos periodos en ambos casos. Si bien alcanzaron altos niveles a la hora de su administración las concentraciones descendieron previamente al retiro de los dispositivos; con un promedio entre grupos de $164,4 \pm 56,4$ hrs mientras que para los DIV $178,3 \pm 46,4$ hrs, lo cual disminuiría la posibilidad del empleo de la solución inyectable por periodos superiores a los 7 días (Cavestany y Martínez, 2010).

Protocolos de inducción

Desde que en el año 1931 Turner y Gardner, concluyeron que la morfogénesis mamaria necesita de la presencia de estrógenos para el desarrollo de los conductos galactóforos, y de estrógenos-progesterona para el desarrollo lóbulo-alveolar; se han desarrollado muchas técnicas para inducir la lactancia artificialmente en vacas (Erb y col, 1976).

Los primeros trabajos requerían de 60 a 180 días de administración de hormonas. Se creía que éste era el tiempo requerido para el completo desarrollo de la glándula mamaria (Smith y Schanbacher, 1973).

Luego, Smith y Schanbacher (1973) reportaron que inyecciones de 17β estradiol y progesterona por 7 días pueden causar la formación de calostro en vacas y vaquillonas no lactantes ni preñadas. En este protocolo se trataron animales destinados al sacrificio debido a fallas reproductivas (ovarios quísticos, retención del cuerpo lúteo, metritis, etc.). Las vacas fueron inyectadas 2 veces por día, por 7 días con 17β estradiol y progesterona vía subcutánea. La mayoría de las vacas tratadas iniciaron su lactancia. El ordeño regular de dos veces por día comenzó cuando la glándula se distendía por el fluido y las ubres estaban llenas y turgentes, y persistió de manera similar a una lactancia fisiológica. En cuanto a la posterior vida reproductiva, algunas vacas comenzaron a ciclar normalmente luego de iniciada la lactancia. Durante una normal lactogénesis, la progesterona en sangre es baja, mientras que los estrógenos son altos; esto es debido a que la progesterona bloquea la lactogénesis. Es por esto que se sugiere que la alta variabilidad presente en este estudio fue debido a un aumento en la síntesis de progesterona por parte del animal, lo cual llevó a que algunas vacas no respondieran al tratamiento, o lo hicieran dando muy poca leche. Una desventaja encontrada por estos autores fue que los altos niveles de estrógenos podían causar una intensa actividad estral, lo cual, junto con

la relajación de los ligamentos pélvicos, resultaban en daños físicos como fractura de pelvis en algunas vacas (Smith y Schanbacher, 1973).

Smith y Schanbacher (1974) desarrollaron otro ensayo, en el cual realizaron variaciones del tratamiento reportado por los mismos autores el año anterior. Se modificó la relación estrógenos/progesterona, variando también las dosis de ambas hormonas. En todos estos grupos las vacas tratadas iniciaron su lactancia, por lo tanto la relación estrógenos/progesterona no sería un factor crítico para el inicio de lactancia. La dosis de estrógenos puede variar entre 20 mg a 60 mg sin afectar los resultados. Al extender el protocolo a 10 días no se observó ninguna superioridad en comparación con el tratamiento por 7 días. En este estudio también demostraron que al variar la vía de inyección de las hormonas de subcutánea a intramuscular, no se inicia la lactancia, y que si se sustituye el 17β estradiol por estrona (un estrógeno menos potente que el 17β estradiol), tampoco se inicia la lactancia.

Fulkerson y McDowell (1975) demostraron el uso de la dexametasona como factor desencadenante para la lactación. A todas las vaquillonas del experimento se les inyectaron estrógenos y progesterona, y luego se trataron 2 grupos con dexametasona a dosis distintas. El desarrollo de la ubre de estas vaquillonas luego de las inyecciones de estrógenos y progesterona fue similar al de aquellas vacas que se encontraban al inicio del último trimestre de la gestación. Las ubres de las vaquillonas que luego se inyectaron con dexametasona continuaron creciendo, hasta parecerse a las ubres de las vacas en lactancia temprana posparto. En cuanto a la producción de leche, sólo los grupos a los cuales se les administró dexametasona produjeron valores similares a los de vacas posparto. Por lo cual se concluye que la dexametasona es un factor desencadenante responsable del inicio de la lactancia. El grupo de dosis alta de dexametasona produce significativamente menos secreción que el grupo de dosis bajas; lo cual lleva a los autores a concluir que parecería haber una dosis óptima de dexametasona, y que por encima de ella la lactancia se inhibe en vez de desencadenarla (Fulkerson y McDowell, 1975).

Chakriyarat y col (1978) determinaron los perfiles hormonales de estradiol, progesterona, prolactina y glucocorticoides antes y durante el tratamiento de inducción a lactancia. Las vacas se inducen con el protocolo de 7 días, y los días 18 al 20 se les administra dexametasona. En cuanto a la producción de leche, los autores concluyeron que en promedio las vacas inducidas a la lactancia producen el 70% de la mayor producción obtenida por ellas en lactancias fisiológicas previas. Las inyecciones con dexametasona parecen aumentar la producción lechera, ya que las vacas que las recibieron produjeron más. Estas inyecciones fueron incluidas en el protocolo debido a que los glucocorticoides aumentan en plasma normalmente al parto, y si se administran glucocorticoides a animales preñados, se puede inducir la lactancia. Además existe un aumento significativo de la superficie que ocupan células epiteliales y alveolos luego de inyectar dexametasona. Al medir los perfiles hormonales, determinaron que concentraciones elevadas de prolactina durante el procedimiento de inducción, tienen una correlación positiva con la lactogénesis. Las vacas que tienen mayores producciones de leche, tienen menores concentraciones de estradiol y progesterona previo al tratamiento, con aumentos rápidos de concentración de estradiol y progesterona durante el tratamiento, y concentraciones elevadas de prolactina luego del día 14 de iniciado el protocolo (Chakriyarat y col, 1978).

Peel y col (1978) realizaron un ensayo para determinar la importancia de la prolactina y del ordeño en la inducción artificial de la lactancia. Al igual que en los reportes anteriores la producción de leche inducida mediante el tratamiento de estradiol y progesterona creado por Smith y Schanbacher en 1973, fue variable y sustancialmente inferior a la producción normal de vacas posparto. Concluyeron también que continuar con la administración de 17β estradiol por 4 días más, o administrar reserpina (tranquilizante que estimula la liberación de prolactina), no mejora los rendimientos de leche en las vacas inducidas. Esto no concuerda con lo publicado por Collier y col (1977) en donde confirmaban que la administración de reserpina aumenta la producción láctea, pero en este ensayo hubo diferencia en la vía y momento en el cual se administró la reserpina. Sin embargo los niveles de prolactina medidos luego del tratamiento fueron elevados, sin aumentar los niveles de producción. Todas la vacas que recibieron estradiol, progesterona y reserpina, iniciaron exitosamente la lactancia; siendo menor el número de vacas que iniciaban la lactancia cuando no recibían reserpina. La bromocriptina (sustancia que suprime la secreción de la prolactina); cuando se agrega al tratamiento de inducción, reduce los niveles plasmáticos de prolactina, se retarda la fase de inducción a la lactogénesis, pero no parece afectar los rendimientos posteriores de producción lechera. Cuando la bromocriptina suprime por completo los niveles plasmáticos de prolactina, la lactogénesis no ocurre, por lo tanto la prolactina es necesaria para el inicio de la lactogénesis pero basta con bajos niveles de ésta. La dexametasona siempre desencadena la lactancia en vacas a las cuales se les administró previamente estrógeno y progesterona para desarrollar sus glándulas mamarias. Ninguna de las vacas tratadas solo con reserpina para desarrollar las glándulas mamarias y dexametasona como desencadenante, iniciaron la lactancia; lo cual indica que los esteroides ováricos son esenciales para la inducción de la lactancia. En cuanto a la performance reproductiva posterior, de las 39 vacas inducidas debido a fallas reproductivas anteriores, 35 concibieron y parieron luego del tratamiento; lo cual indica que las vacas pueden ser inducidas artificialmente a la lactancia durante un año, y concebir, parir y tener una lactancia natural al año siguiente (Peel y col, 1978).

Posteriormente Peel y col (1979) continuaron el estudio de inducción a la lactancia. Cuando se estudió el efecto de la longitud del período seco para el tratamiento de inducción, se concluyó que es crítico para su éxito. Las vacas fallan al tratamiento de inducción cuando el período seco es menor a dos meses, por el contrario, las vacas con período seco más extenso se han inducido exitosamente a la lactancia. Concluyen entonces que existe un período seco mínimo requerido para el inicio del tratamiento de inducción. También descubrieron que el tratamiento tiene mayor éxito si se administran los esteroides ováricos en 2 dosis diarias, que si se administra toda la dosis 1 vez al día. Cuando se prolonga el tratamiento de inducción con estrógenos y progesterona, sólo causa un retardo en el inicio de la lactancia; lo cual puede ser explicado debido a que altas dosis de progesterona inhiben la lactogénesis. Sin embargo la lactogénesis ocurre cuando se prolonga el tratamiento, y se administra al mismo tiempo reserpina (Peel y col, 1979).

Utilizando vacas ovariectomizadas, Head y col (1982) realizaron un estudio en el cual compararon los tratamientos de 7 o 21 días con estrógenos y progesterona para la inducción de la lactancia, y el efecto en los niveles de prolactina cuando se administra TRH, dexametasona u ACTH. Obtuvieron que las vacas que fueron

inducidas a la lactancia por 21 días con estrógenos y progesterona lograron mayores rendimientos de producción láctea, que las que fueron tratadas por 7 días. Cuando se prolonga el tratamiento la glándula mamaria recibe mayores concentraciones de esteroides, debido a que la concentración de estrógenos y progesterona en plasma es dos a tres veces mayor el día 21 de tratamiento comparado con la concentración encontrada el día 7 del tratamiento. Las vacas inyectadas con TRH tuvieron mayor rendimiento lechero, debido a que provoca aumentos cortos de prolactina. La concentración de prolactina en plasma aumenta en respuesta a la TRH, sólo si esta última es administrada luego de finalizado el tratamiento con los esteroides ováricos. Las inyecciones con dexametasona o ACTH coinciden con un aumento de la prolactina, y disminución de los esteroides ováricos. Estas inyecciones se administraron para imitar el aumento de los glucocorticoides en torno al parto. Concluyeron entonces que con el tratamiento por 21 días en vacas ovariectomizadas se logra maximizar la mamogénesis y mejorar la producción de leche (Head y col, 1982).

Sawyer y col (1982) realizaron un experimento en el cual administraron 11 dosis de estradiol y progesterona cada 3 días; donde compararon dos dosis distintas de estradiol. Se observó que el grupo al cual le administraron 10 mg de estradiol produce más leche que el grupo al cual se le administró 5 mg de estradiol. Esto demuestra que si se administran bajas dosis de estradiol en el tratamiento de inducción para el desarrollo de la glándula mamaria, es necesario administrar luego otras hormonas (Ej.: dexametasona) para el inicio de la lactogénesis.

Davis y col (1983) diseñaron un protocolo que consistía en la introducción de una esponja intravaginal impregnada con estrógenos y progesterona durante 10 días, combinado con dexametasona. Luego de este diseño concluyeron que la dexametasona aumenta la probabilidad de que la vaca inicie su lactancia. En este estudio también se determinaron las ventajas del uso de la esponja intravaginal observando que: la concentración residual en leche es menor, la lactogénesis ocurre más pronto, y se necesita menor mano de obra; comparado con el régimen de inyecciones (Davis y col, 1983).

Adams y col (1983) realizaron un ensayo en el cual administraron el protocolo de estradiol y progesterona por 7 días, y luego reserpina y/o dexametasona. Los mejores resultados en cuanto a producción lechera fueron cuando se administraban todas las hormonas mencionadas. El nivel de producción fue más bajo que el esperado para vacas posparto, pero lo suficientemente alto como para compensar los gastos. Una desventaja de la administración de reserpina fue que las vacas en este estudio mostraron distintos grados de sedación, congestión nasal y dificultad para respirar. Luego de suspender el tratamiento, las vacas recuperan su estado de salud normal.

Jewell (2002) realizó un ensayo en el cual demostró que la sincronización del estro con $\text{PGF2}\alpha$ previo al tratamiento de inducción con estrógenos y progesterona aumenta la tasa de éxito. La progesterona compite con los glucocorticoides por los sitios de unión en el tejido mamario durante la lactogénesis, por lo tanto si eliminamos la fuente de progesterona (cuerpo lúteo) mediante la administración de $\text{PGF2}\alpha$ las vacas inducidas son más sensibles al tratamiento con dexametasona. La administración de $\text{PGF2}\alpha$ permite elegir en que etapa del ciclo estral se inicia el

tratamiento de inducción, y así disminuir la progesterona circulante al momento de la administración de glucocorticoides. Sin embargo, los resultados sugieren que no se obtienen mayores producciones lácteas al sincronizar el estro previo al tratamiento de inducción.

Mellado y col (2006) utilizaron un tratamiento en el cual administraron estradiol durante 14 días, progesterona durante los primeros 7 días, flumetasona y PGF2 α . También administraron BST en la inducción y durante la lactancia (en Uruguay su administración está prohibida). Todas las vacas tratadas iniciaron su lactancia y produjeron el 78% de la producción de vacas posparto. Las vacas inducidas a la lactancia demoran más tiempo en alcanzar el pico de producción láctea, pero una vez que alcanzaron la máxima producción ésta se mantiene paralela a la producción de vacas posparto. Según los autores la alta producción obtenida se explica debido a la prolongación del tratamiento con estradiol y a la administración de BST (Mellado y col, 2006).

Ribeiro (2009) comparó dos protocolos de inducción a la lactancia, utilizando en uno de ellos cipionato de estradiol a dosis baja, y en el otro benzoato de estradiol a dosis alta. Además a ambos grupos se les administraba de igual manera progesterona, isoflupredona y BST. Si bien los dos protocolos utilizados fueron eficientes en la inducción de la lactancia, el grupo al que se le administró dosis superiores de estradiol presentó mejores resultados en cuanto al número de animales inducidos y la producción de leche. En ambos protocolos el pico de producción ocurrió entre los días 104 y 145 de lactancia. Adicionalmente, un alto porcentaje de vacas (que estaban destinadas al sacrificio por problemas reproductivos) quedaron preñadas luego del tratamiento, dando viabilidad al uso de estos protocolos.

A nivel internacional no existen reportes sobre tratamientos prolongados con progesterona y estrógenos que incluyan un período de descanso.

Concentraciones de estradiol y progesterona en leche de vacas inducidas

La leche es una fuente de nutrientes valiosa para los seres humanos, y por lo tanto se ha investigado sobre su seguridad debido a la presencia de hormonas esteroideas. Las concentraciones de estas hormonas en leche están correlacionadas positivamente con sus concentraciones en plasma. Durante la preñez, las concentraciones de estrógenos y progesterona son elevadas en plasma, y por lo tanto es de esperar que lo mismo ocurra en leche. Como las hormonas esteroideas tienen afinidad por la grasa, es de esperar que sus concentraciones sean más elevadas en leche entera que en descremada (Pape-Zambito y col, 2010).

Debido a la administración de altos niveles de estradiol y progesterona durante el tratamiento de inducción a la lactancia, muchos investigadores se han dedicado a estudiar su concentración tanto en plasma como en leche, para determinar si la leche proveniente de esos animales es apta para el consumo humano.

En 1976 Erb y col realizaron un ensayo en el cual evaluaron los cambios hormonales ocurridos durante la inducción a la lactancia, en la cual administraron 20 mg de 17 β estradiol y 50 mg de progesterona diariamente por 7 días, vía subcutánea. En cuanto a la progesterona en leche, determinaron que hasta el 4^{to} día su concentración es de 18 ng/mL y luego una brusca disminución en su concentración

ocurre al 14^{to} día de lactancia (5 ng/mL), pero nunca llega a superar los valores encontrados fisiológicamente en vacas ciclando (5-35 ng/mL, Meikle, 2001; Erb y col, 1976). De todas maneras esta concentración es mayor a la encontrada por otros autores.

Sawyer y col (1982) también estudiaron la concentración de progesterona en leche luego del tratamiento de inducción, administrando 10 mg de benzoato de estradiol y 200 mg de progesterona, 11 dosis cada 3 días, vía subcutánea. La concentración de progesterona fue baja (entre 1,0 y 3,0 ng/mL), y menor que la encontrada en leche de vacas durante su fase luteal. Estos valores coinciden con los reportados durante la primer semana de lactancia, por Jewell en 2002 (menos de 1,5 ng/mL), y Mohan y col en 2010 (menos de 3 ng/mL).

En cuanto a la concentración de estradiol en leche, los resultados son más variables. Erb y col (1976) determinaron que la concentración de estradiol en leche al 2^{do} día de lactancia es de 310 pg/mL y luego desciende rápidamente al 4^{to} día de iniciada la lactancia a 144 pg/mL, llegando a valores similares a los encontrados en vacas con 200 días de preñez.

Sawyer y col (1982) determinaron que el estradiol en leche alcanza concentraciones de hasta 400 pg/mL en la primera semana de lactancia, pero luego cae a valores menores a 65 pg/mL.

Todos los autores que han valorado la presencia de hormonas esteroideas en leche de vacas inducidas a la lactancia artificialmente, coinciden en que no existen grandes diferencias con la leche comercial, y que por lo tanto el consumo de leche de vacas inducidas a la lactancia no supone ningún peligro para la salud humana.

En leche comercial se han realizado valoraciones de estradiol, debido a que en humanos, las altas concentraciones de estrógenos en suero están asociadas con un aumento del riesgo de padecer cáncer de mama, uterino u ovárico (Pape-Zambito y col, 2010). La concentración de estradiol en leche cruda según Wolford y Argoudelis (1979) es de 12,3 pg/mL, mientras que en la manteca, la concentración de estradiol se eleva a 82,3 pg/g. La concentración de estradiol en todos los productos lácteos analizados en el ensayo realizado por Pape-Zambito y col (2010), fue extremadamente baja en comparación con la producción endógena de estradiol en humanos. Además, cuando el estradiol es ingerido, es extensamente metabolizado en la mucosa intestinal e hígado, y por lo tanto tiene baja biodisponibilidad (Pape-Zambito y col, 2010).

Teniendo en cuenta los ensayos vistos anteriormente, el presente estudio fue diseñado para inducir la lactancia en vacas y vaquillonas Holando de descarte reproductivo (fallas a la concepción) mediante dos protocolos distintos. En uno de ellos el tratamiento fue de 7 días con estradiol y progesterona, y luego dexametasona por 4 días. En el otro tratamiento se administra también estradiol y progesterona por 7 días y luego se esperan 7 días para volver a administrar por 5 días más estradiol y progesterona, seguido también por dexametasona durante 4 días.

La mayoría de los ensayos en los cuales se han determinado las concentraciones de estrógenos y progesterona en leche y sangre, han sido con animales en sistemas de

estabulación. Teniendo en cuenta que el clearance de las hormonas está sujeto a la alimentación, no conocemos como es la dinámica de estas hormonas en leche cuando los animales son alimentados bajo sistemas pastoriles. Es por esto que se midieron y compararon las concentraciones de estrógenos y progesterona excretadas en leche de vacas inducidas y de vacas posparto en nuestros sistemas pastoriles, diferenciando también según paridad.

HIPÓTESIS



- 1- Al aumentar el período de tratamiento con estradiol y progesterona para inducir la lactancia en vacas se lograría una mayor producción de leche.
- 2- Las concentraciones hormonales de estradiol y progesterona en leche de vacas inducidas con un tratamiento prolongado serían más altas que las encontradas cuando el tratamiento es de 7 días.
- 3- Considerando el desarrollo mamario diferencial en vacas que ya han cursado con una lactancia vs vacas primíparas, hipotetizamos que la respuesta al tratamiento de inducción a la lactancia depende de la categoría animal.

OBJETIVOS

- 1- Estudiar la producción de leche de vacas inducidas a la lactancia mediante dos protocolos distintos, comparar dicha producción con la de vacas control gestadas y evaluar si existen diferencias según paridad (primíparas vs multíparas).
- 2- Determinar la concentración de 17β estradiol y progesterona en leche de los tres grupos y comparar según paridad.
- 3- Evaluar si la leche obtenida de vacas inducidas a la lactancia presenta mayores concentraciones hormonales que la leche obtenida de vacas posparto.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Animales:

Se utilizaron 36 vacas Holando (de un rodeo general de 946 vacas) provenientes de un establecimiento comercial ubicado en el departamento de Paysandú.

Las vacas se dividieron en 3 lotes iguales:

- Lote control: compuesto de 6 vacas y 6 vaquillonas con fecha de parto similar al inicio de la lactancia en grupos inducidos.
- T1:E₂P₄: compuesto de 6 vacas y 6 vaquillonas (animales no preñados al momento de comenzar el experimento).
- T2:E₂P₄+E₂P₄: compuesto de 6 vacas y 6 vaquillonas (animales no preñados al momento de comenzar el experimento).

Todos los animales múltiparos del T1:E₂P₄ y T2:E₂P₄+E₂P₄ tuvieron un período seco mayor a 60 días, y recibieron por lo menos 5 servicios sin quedar preñadas.

Tratamientos:

A los animales del T1:E₂P₄ y T2:E₂P₄+E₂P₄ se los indujo artificialmente a la lactancia (cuadro 1). A éstos se les administró una inyección de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, 100µg, Gonasyn, Laboratorio Syntex S.A.) 6 días antes de comenzar el tratamiento de inducción de lactancia, con el fin de sincronizar el ciclo estral.

El día 1 de tratamiento de inducción se colocaron 2 dispositivos intra-vaginales de 1 g de progesterona (CIDR-B, Universal Lab, Montevideo) por animal y se les inyectó por vía sub cutánea 0.1mg/kg de benzoato de estradiol (Benzoato de Estradiol, Laboratorio Syntex S.A) dividida en dos dosis; siendo el peso promedio de los animales del T1:E₂P₄ de 592,5 Kg (mínimo 406 Kg – máximo 716 Kg), y del T2:E₂P₄+E₂P₄ de 624,7 Kg (mínimo 506 Kg – máximo 748 Kg). Se continuó por 7 días con la administración de benzoato de estradiol cada 12 hrs aproximadamente; finalmente en el día 7 de esta etapa se retiraron los dispositivos a todas las vacas, y se les administró prostaglandina (PGF₂α, 0.150mg, Glandinex, Universal Lab).

La segunda etapa del trabajo comenzó luego de un descanso de 7 días, en esta se diferenciaron los protocolos de ambos lotes. Al T1:E₂P₄ se le administró prostaglandina (PGF₂α 0.150mg) el día 14, y del día 15 al 18 10 mg de dexametasona (Fatrocortin, Laboratorio Fatro) cada 12 horas, por vía subcutánea.

Al T2:E₂P₄+E₂P₄, el día 14 se le colocó nuevamente 2 dispositivos intravaginales de progesterona y se continuó con el benzoato de estradiol (0.1 mg/Kg s/c) por 5 días

más, además se le administró diariamente dexametasona (10 mg cada 12 horas, subcutánea) a partir del día 15 del tratamiento, durante 4 días. El día 18 se retiraron

Cuadro 1: TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA INDUCCION DE LACTANCIA

DIA	Lote 1(E ₂ P ₄)	Lote 2(E ₂ P ₄ +E ₂ P ₄)
-7		
-6	GnRH	GnRH
-5		
-4		
-3		
-2		
-1		
1	2Cidr on + 1/2 Estradiol	2Cidr on + 1/2 Estradiol
pm	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
2	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
pm	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
3	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
pm	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
4	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
pm	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
5	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
pm	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
6	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
pm	1/2 Estradiol	1/2 Estradiol
7	Cidr off + 1/2 Estradiol	Cidr off + 1/2 Estradiol
pm	1/2 Estradiol + PGF2a	1/2 Estradiol + PGF2a
8		
pm		
9		
10		
11		
12		
13		
pm		
14	PGF2a	2Cidr on + 1/2 Estradiol
pm		1/2 Estradiol
15	Dexametasona	1/2 Estradiol + Dexameta.
pm	Dexametasona	1/2 Estradiol + Dexameta.
16	Dexametasona	1/2 Estradiol + Dexameta.
pm	Dexametasona	1/2 Estradiol + Dexameta.
17	Dexametasona	1/2 Estradiol + Dexameta.
pm	Dexametasona	1/2 Estradiol + Dexameta.
18	Dexametasona	1/2 Estradiol + Dexameta.
pm	Dexametasona	Cidr off + 1/2 Estradiol + Dexameta. + PGF2a
19		
pm		
20	INICIO ORDEÑE	INICIO ORDEÑE

los dispositivos de todos los animales y se les administró prostaglandina (PGF_{2α} 0.150mg).

Ambos lotes comenzaron a ser ordeñados el día 20.

Determinaciones Hormonales:

Se tomaron muestras de leche de todos los animales T1:E₂P₄, T2 E₂P₄+E₂P₄ y control; al 5°, 12°, 19°, 26° días de iniciada la lactancia. Las muestras fueron almacenadas a 4° C con la adición de azida de sodio como conservante.

En las muestras de leche se determinó la concentración de estradiol y progesterona en leche entera mediante RIA, en el laboratorio de Técnicas nucleares de la Facultad de Veterinaria. Se analizaron todas las muestras de los grupos tratados, pero solo 7 muestras en el grupo control debido a falta de reactivo.

Para la medición de 17β estradiol se utilizó un kit comercial (Coat-A-Count; Siemens, Los Angeles, CA), que es un radioinmunoensayo con ¹²⁵I, sin extracción y en fase sólida, diseñado para la determinación cuantitativa *in vitro* de estradiol en suero. En el laboratorio se realizaron estándares con similares concentraciones de estrógenos,

pero disueltas en leche. Estas últimas soluciones se cuantificaron mediante RIA, utilizando el kit comercial antes descrito.

El rango de la curva estándar se encuentra entre los 14 a 3600 pg/mL. La sensibilidad inicial del ensayo fue de 57 pg/mL. Dicha sensibilidad fue mejorada a 5 pg/ml eliminando las primeras concentraciones dentro de las cuales el gamma contador no lograba discriminar. Se calculó el CV intra-ensayo (CV para el control bajo [62 pg/mL] = 13% y CV para el control alto [115 pg/mL] = 13,9%).

Para la medición de progesterona en leche, se aplicó la técnica descrita previamente por Meikle (2001). Se utilizó el kit comercial (Coat-A-Count, Siemens, Los Angeles, CA) que es un método de ¹²⁵I radioinmunoensayo en fase sólida y sin extracción, designado para medir progesterona. Se calculó el CV intra-ensayo (CV para el control medio [2 ng/mL] =10%). La sensibilidad del ensayo fue de 1,6 ng/mL.

Análisis estadístico

-Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico SAS.

-Las variables hormonales (estradiol y progesterona) y productivas (producción láctea) se analizaron en un diseño completo al azar mediante un modelo mixto usando un análisis de medidas repetidas en el tiempo (PROC.MIXED).

Modelo Estadísticos utilizado:

$y_{ijkl} = \mu + \text{Tratamiento}_i + \text{días posparto}_j + \text{tratamiento} * \text{días posparto}_{ixj} + \text{categoría}_k + \text{vacal} + \text{tratamiento} * \text{categoría}_{aixk} + \text{error}_{ijkl}$

Efectos fijos: Tratamiento, días postparto y categoría.

-Se utilizó la estructura de covarianza autoregresiva de primer orden (Ar 1) y se ajustaron los grados de libertad por método de Kenward-Rogers.

-Para analizar diferencias entre medias se utilizó Test de Tukey-Kramer se asumió una (P<0,05) como significativo y una (P<0,15) como tendencia.

RESULTADOS

Producción de Leche

Todas las vacas sometidas a la inducción de lactancia independientemente del tratamiento mediante la administración de estradiol, progesterona y dexametasona iniciaron la lactancia, obteniéndose producciones en el primer mes de lactancia de $14,1 \pm 0,8$ y $15,8 \pm 0,8$ L/día para el T1:E₂P₄ y T2:E₂P₄+E₂P₄ respectivamente.

Existió efecto del tratamiento sobre la producción de leche ($P < 0.0001$) siendo la producción (L/día) de las vacas inducidas (Figura 1) menor que la de vacas control, las cuales produjeron $22,3 \pm 0,9$ L/día en promedio, durante el primer mes de lactancia, no difiriendo la producción entre T1:E₂P₄ y T2:E₂P₄+E₂P₄. Se observa que la producción de leche en todos los grupos aumenta con los días de lactancia ($P < 0.001$), llegando a producir $19 \pm 1,0$, $20 \pm 1,0$ y $26 \pm 1,1$ L/día para los grupos T1:E₂P₄, T2:E₂P₄+E₂P₄ y control respectivamente el día 26 de lactancia.

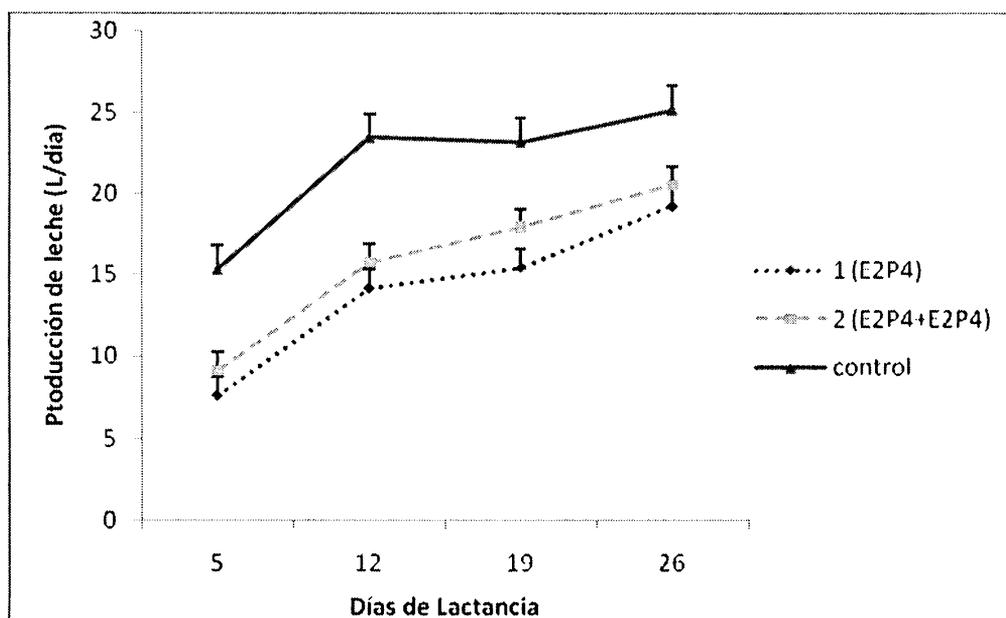


Figura 1: PRODUCCIÓN DE LECHE DIARIA DE VACAS INDUCIDAS A LA LACTANCIA Y VACAS CONTROL

Hubo efecto de los días de lactancia sobre la producción de leche ($P < 0.0001$) como se observa en la figura 1. En el grupo control se observó un aumento en la producción de leche al día 12, manteniéndose los niveles al día 19 y registrando un nuevo aumento al día 26. El T1:E₂P₄ se comporta de manera similar al grupo control. El T2:E₂P₄+E₂P₄ presentó una producción en constante crecimiento.

Hubo efecto de la categoría animal (primíparas vs multíparas) sobre la producción ($P = 0.016$) ya que las vacas primíparas produjeron $16,1 \pm 0,6$ L/día y las multíparas $18,7 \pm 0,7$ L/día en el primer mes de lactancia. También hubo efecto de la interacción entre categoría y tratamiento sobre la producción ($P = 0.047$) (Figura 2).

Mientras que las vacas primíparas produjeron menos o tendieron a producir menos que las multíparas en el grupo control ($19,5 \pm 1,1$ vs $25,1 \pm 1,4$ $P < 0.05$) y en T1:E₂P₄ ($12,8 \pm 1,2$ vs $15,4 \pm 1,2$ $P = 0.12$) respectivamente, en el grupo T2:E₂P₄+E₂P₄ no se encontraron diferencias acorde a las categorías ($16,1 \pm 1,2$ vs $15,4 \pm 1,2$ $P = 0.67$).

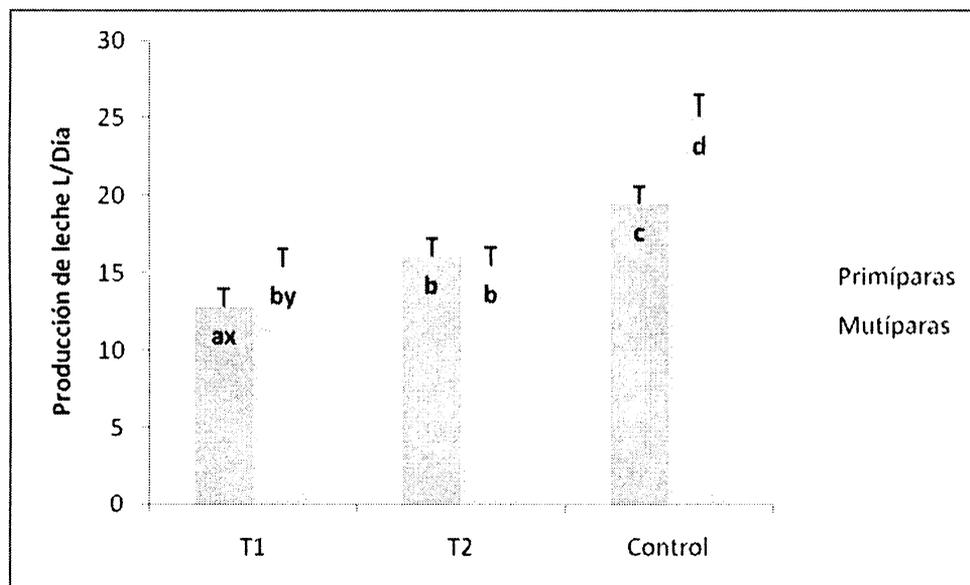


Figura 2: PRODUCCIÓN DE LECHE DIARIA EN EL PRIMER MES DE LACTANCIA SEGÚN TRATAMIENTO (T1: E₂P₄, T2: E₂P₄+E₂P₄ y CONTROL) Y PARIDAD (MULTIPARAS VS PRIMIPARAS)

Concentración de 17β estradiol

El tratamiento afectó la concentración de estradiol en leche ($P < 0.0001$), al igual que lo hicieron los días de lactancia ($P < 0.0001$) (Figura 3). Las concentraciones de estradiol promedio durante el primer mes de lactancia fueron $25,7 \pm 5,3$, $110 \pm 5,7$ y $12,1 \pm 6,9$ pg/mL para los T1:E₂P₄, T2:E₂P₄+E₂P₄ y control respectivamente; presentando el T2:E₂P₄+E₂P₄ mayores concentraciones que el T1:E₂P₄ y control ($P < 0.001$), quienes no difirieron entre sí.

Se encontró también interacción entre el tratamiento y los días de lactancia sobre la concentración de estradiol ($P < 0.0001$). El T2:E₂P₄+E₂P₄ presenta su máxima concentración de estradiol al 5^{to} día de lactancia, siendo de $305 \pm 13,2$ pg/mL, luego disminuye a $84 \pm 11,2$ pg/mL al día 12 y continúa descendiendo hasta el día 19 a una concentración de $32 \pm 10,7$ pg/mL, donde se equipara con las concentraciones de T1:E₂P₄ y control. El grupo control presentó una concentración que osciló entre 5 y 19 pg/mL sin presentar diferencias entre los días de lactancia. El T1:E₂P₄ tampoco presentó diferencias significativas entre los días de lactancia y sus concentraciones oscilan entre 15 y 35 pg/mL.

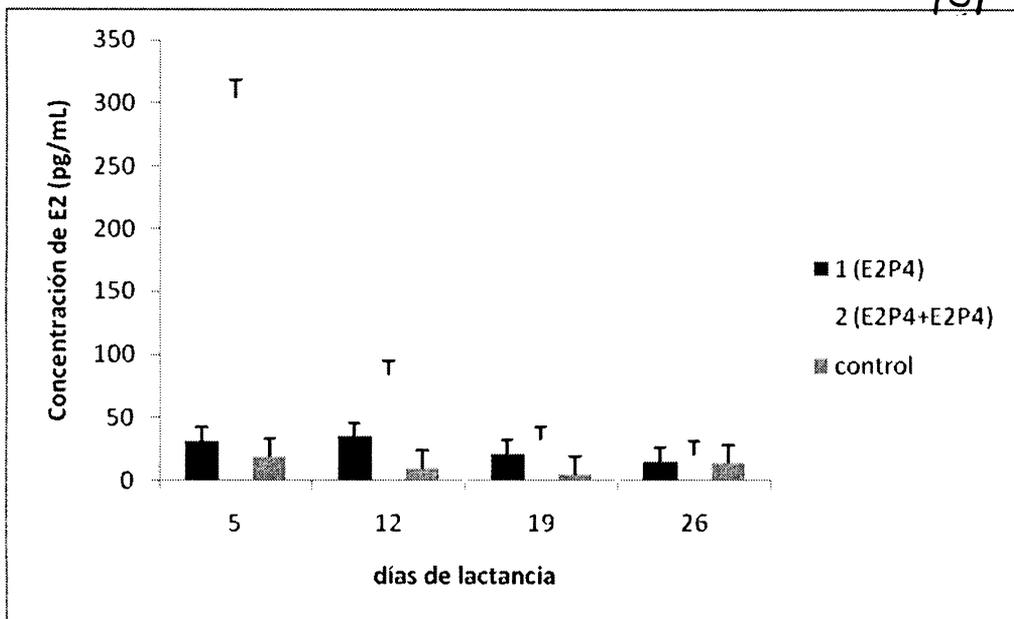


Figura 3: CONCENTRACIÓN DE 17β ESTRADIOL EN LECHE DE VACAS INDUCIDAS A LA LACTANCIA Y VACAS CONTROL

Hubo un efecto en la categoría animal sobre la concentración de estradiol ($P < 0.05$) (Figura 4), ya que en los animales primíparas encontramos mayor concentración de estradiol que en multíparas (56 vs 42 pg/mL). El T2: E₂P₄+E₂P₄ presenta diferencias en la concentración de estradiol de las dos categorías, siendo las primíparas las de mayor concentración de estradiol. Mientras que T1: E₂P₄ y control no presentaron diferencias entre tratamientos ni entre categorías.

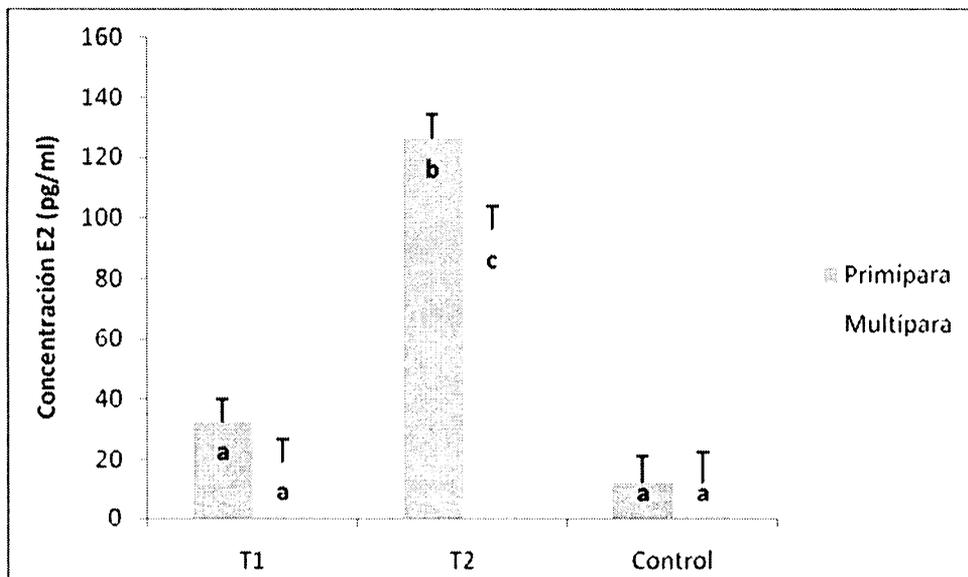


Figura 4: CONCENTRACIÓN DE 17β ESTRADIOL EN EL PRIMER MES DE LACTANCIA SEGÚN TRATAMIENTO (T1: E₂P₄, T2: E₂P₄+E₂P₄ y CONTROL) Y PARIDAD (PRIMÍPARAS VS MULTÍPARAS)

Concentración de Progesterona

En ninguna de las muestras analizadas se encontraron valores detectables.

DISCUSIÓN

Producción de leche

La administración de estradiol y progesterona para lograr el desarrollo mamario y de dexametasona como factor desencadenante para la lactogénesis demostró ser efectiva para la inducción a la lactancia ya que todos los animales tratados iniciaron su lactancia. Esto indica que con la administración de estradiol, progesterona y dexametasona se puede imitar la acción de las hormonas esteroideas durante la gestación.

Fulkerson y McDowell (1975), y Chakriyarat y col (1978) demostraron que la administración de dexametasona luego de un tratamiento con estradiol y progesterona aumenta la producción láctea, debido a que los glucocorticoides aumentan el porcentaje de superficie de células epiteliales y alvéolos de la glándula mamaria. Estos autores obtuvieron producciones menores a las alcanzadas en nuestro estudio, de 5 Kg/día el día 30 de lactancia (Fulkerson y McDowell, 1975) y de 13,9 Kg/día al pico de lactancia (el cual ocurrió entre las 8 y 12 semanas) (Chakriyarat y col, 1978). Esto puede ser debido a que utilizaron animales de distintas razas (Jersey – Guernsey), que fisiológicamente producen menos litros/día que la raza Holando, y esta última fue la raza utilizada en nuestro experimento.

La producción obtenida de las vacas tratadas fue menor a la de las control coincidiendo con Mellado (2006) quien observó que las vacas tratadas en su estudio produjeron el 78% de la producción de vacas posparto. Según Chakriyarat y col (1978) las vacas inducidas obtienen producciones del 70% de lo producido por ellas en lactancias fisiológicas previas. En nuestro estudio el T1:E₂P₄ produce el 65% de lo que produce el grupo control, mientras que el T2:E₂P₄+E₂P₄ produce el 73% referido a la producción del grupo control. Por lo tanto con la inducción a la lactancia no se logra el máximo potencial lechero del animal. El número de células secretoras de leche del alveolo determinan el potencial de producción lechera, estas células crecen y se desarrollan durante la gestación (Chakriyarat y col, 1978). Las producciones menores en las vacas inducidas indicarían que con la administración exógena de estradiol y progesterona no se logran totalmente los cambios morfológicos y funcionales ocurridos en la glándula mamaria durante la preñez.

La producción de leche obtenida luego de aplicados los tratamientos fue diferente entre categorías. Las vacas primíparas del T2:E₂P₄+E₂P₄ presentan mayor producción láctea que las del T1:E₂P₄. No hemos encontrado estudios que reporten respuestas diferenciales a un tratamiento hormonal de inducción de lactancia acorde a la categoría. Teniendo en cuenta que las vacas primíparas no presentan desarrollo mamario previo se puede sugerir que un tratamiento hormonal más prolongado es necesario en esta categoría.

En vacas múltiparas no hubieron diferencias de producción láctea entre T1:E₂P₄ y T2:E₂P₄+E₂P₄ y por lo tanto en esta categoría solo sería necesaria la administración de 7 días de estradiol y progesterona para lograr un buen desarrollo mamario y la posterior lactogénesis. Esto confirma lo reportado por Smith y Schanbacher (1973) quienes demostraron que inyecciones de 17 β estradiol y progesterona por 7 días pueden causar la formación de calostro en vacas y vaquillonas no lactantes ni

preñadas. Además Peel y col (1979) obtienen la misma producción (7,9 L/día entre la 5^{ta} y 15^{ta} semana de lactancia) con el tratamiento de 7 días de estradiol y progesterona que con el tratamiento de 13 días. En base a estos resultados afirman que extender el protocolo de inducción a la lactancia sólo retarda el inicio de la misma, y no mejora los rendimientos lecheros. Teniendo en cuenta nuestros resultados la anterior afirmación solo es válida para las multíparas, debido a que en primíparas se obtuvo mayor producción al extender el protocolo.

Fisiológicamente, la vaca lechera en pastoreo alcanza su pico de producción láctea entre la 5^{ta} y 7^{ma} semana de lactancia (Glauber, 2007), por lo tanto es de esperar que la producción de las vacas inducidas y control en este ensayo continúe aumentando hasta llegar a su pico. Mellado y col (2006) concluye que las vacas inducidas a la lactancia demoran más tiempo en alcanzar el pico de producción láctea, pero una vez que alcanzaron la máxima producción ésta se mantiene paralela a la producción de vacas posparto. En nuestro estudio solo contamos con los datos del primer mes de lactancia y por lo tanto no podemos determinar en qué momento ocurre el pico de lactancia, pero al observar la curva de producción láctea (figura 1) notamos que en todos los grupos la producción va en ascenso.

Concentración de 17β estradiol

La concentración de estradiol encontrada en el T2:E₂P₄+E₂P₄ fue mayor a las del T1:E₂P₄ y grupo control, no difiriendo estos últimos entre sí. Este resultado era esperable ya que en el T2:E₂P₄+E₂P₄ se administró estradiol durante 12 días, siendo su última administración 2 días previos al inicio de lactancia; mientras que el T1:E₂P₄ recibe estradiol por 7 días y la última administración es 13 días antes de iniciar la lactancia. Al administrar benzoato de estradiol intramuscular la concentración de estradiol en plasma alcanza un pico y disminuye lentamente regresando a niveles basales a las 96 horas (Bó y col, 2006). En nuestro ensayo el benzoato de estradiol fue administrado vía subcutánea, por lo cual la hormona tardaría más tiempo en absorberse que por vía intramuscular. Esto podría explicar por qué se encuentran concentraciones mayores en el T2:E₂P₄+E₂P₄ aún en el día 12 de lactancia (14 días pos inyección).

Todos los ensayos coinciden en que la concentración de estradiol en leche es mayor en vacas inducidas artificialmente a la lactancia que en leche de vacas posparto (Erb y col, 1976; Sawyer y col, 1982). Estos investigadores reportan concentraciones variables de estradiol en leche. Erb y col (1976) luego de inducir la lactancia mediante un protocolo de 7 días de 17β estradiol y progesterona administradas vía subcutánea, determinaron que la concentración de estrógenos en leche al 2^{do} día de lactancia es de 310 pg/mL y luego desciende rápidamente al 4^{to} día de iniciada la lactancia a 144 pg/mL. Estos valores encontrados por Erb y col (1976) fueron superiores a los encontrados en nuestro estudio en el T1:E₂P₄ pero inferiores a los observados en el T2:E₂P₄+E₂P₄. Sin embargo no es posible comparar estos ensayos debido a que la fecha del inicio de lactancia en el estudio de Erb y col (1976) presentó una variabilidad de 4 a 14 días desde la última inyección de estradiol. Sawyer y col (1982) realizaron un tratamiento de 30 días con estradiol y progesterona, y determinaron que el estradiol en leche alcanza concentraciones de hasta 400 pg/mL en la primera semana de lactancia, pero luego cae a valores menores de 65 pg/mL el día 36 de lactancia.

En ninguno de los ensayos citados se comparan valores de estradiol en leche de vacas inducidas con los de vacas posparto. Jewell (2002) comparó los valores de estradiol en suero de vacas inducidas (con un protocolo similar al utilizado por nosotros en el T1:E₂P₄) con vacas posparto; obteniendo al 5^{to} día de lactancia en inducidas 18 pg/mL y en vacas posparto 3 pg/mL de estradiol en suero. Estos valores son menores a los encontrados por nosotros en leche al 5^{to} día de lactancia.

La concentración de 17β estradiol encontrada en el T1:E₂P₄ no fue diferente a la de vacas control; por lo tanto esta leche se encontraría apta para el consumo humano. En Uruguay no existen registros sobre concentración de residuos hormonales en leche, tales como el estradiol; pero a nivel mundial se han determinado las concentraciones de estradiol en leche y otros productos lácteos, debido a que en humanos, las altas concentraciones de estrógenos en suero están asociadas con un aumento del riesgo de padecer cáncer de mama, uterino u ovárico (Pape-Zambito y col, 2010). Wolford y Argoudelis (1979) reportaron que la leche cruda de vacas estadounidenses contiene 12,3 pg/mL de estradiol, siendo este valor muy similar al encontrado en las vacas control de nuestro estudio (12,1 pg/mL) durante el primer mes de lactancia.

Las concentraciones de 17β estradiol del T2:E₂P₄+E₂P₄ se mantienen diferentes a los otros grupos hasta el día 19. Teniendo en cuenta que la última administración de estradiol en el T2:E₂P₄+E₂P₄ fue dos días antes de iniciar el ordeño, podríamos concluir que el benzoato de estradiol administrado subcutáneo demora por lo menos 14 días en eliminarse del animal, y luego de estos días solo encontramos niveles fisiológicos de 17β estradiol. Esto indica que cuando se aplica el T2:E₂P₄+E₂P₄ se debería esperar a remitir la leche por lo menos 12 días para que ésta se considere apta para el consumo, debido a que se consideran impropias para el consumo humano las leches que contengan calostro, residuos medicamentosos u hormonales (Fehlhaber y Janetschke, 1992).

Las vacas primíparas presentaron mayor concentración de 17β estradiol en leche que las múltiparas y esto puede ser debido a que las múltiparas que tienen una mayor producción láctea presentan mayor flujo hepático, lo cual se relaciona directamente con una mayor capacidad hepática para metabolizar las hormonas esteroideas permitiendo así eliminar más rápido las concentraciones de estradiol (Hernández y Morales, 2001).

En animales primíparas el protocolo de 12 días resulta más efectivo, ya que logra una mayor producción que con el tratamiento de 7 días. Pero si tomamos en cuenta la concentración de estradiol en leche, ésta resulta ser más alta con el protocolo de 12 días, hasta el día 19 días de lactancia. Al contar sólo con los datos del primer mes de lactancia no podemos determinar si la diferencia en la producción entre T1:E₂P₄ y T2:E₂P₄+E₂P₄ perdura durante toda la lactancia en animales primíparas. Si esto sucediera seguramente sería más eficiente aplicar el T2:E₂P₄+E₂P₄ en primíparas, aunque se descarte la producción de por lo menos los primeros 12 días de lactancia debido a que esta leche presenta altas concentraciones de estradiol.

Concentración de progesterona

Ninguna de las muestras analizadas en este estudio presentaron valores detectables de progesterona. Distintos autores (Sawyer, 1982; Jewell, 2002; Mohan, 2010), han encontrado concentraciones en leche de vacas inducidas a la lactancia menores a 3 ng/mL, siendo la progesterona administrada vía subcutánea. Debemos tener en cuenta que la progesterona en este estudio se administró mediante CIDR; este dispositivo provoca concentraciones de progesterona en sangre de 4 ng/mL a las 24 horas de aplicado, pero luego su concentración va descendiendo progresivamente hasta 2,6 ng/ml al 4^{to} día de colocado el CIDR (Nation y col, (2000). Es esperable por lo tanto que no se detecten concentraciones de progesterona debido a que el CIDR libera bajas dosis de dicha hormona; y luego de retirado la concentración de progesterona en sangre desciende a las 6 hs.

Además es esperable que la concentración de progesterona endógena también sea baja, ya que al administrar PGF2 α al final del tratamiento se produce la lisis del cuerpo lúteo, y así el animal entra en fase folicular.

Al comparar las alternativas de administración de progesterona pensamos que la mejor opción es el CIDR, debido a que logra concentraciones estables en sangre similares a las fisiológicas, y a las pocas horas de retirado el dispositivo las concentraciones disminuyen. Teniendo en cuenta que para la inducción a la lactancia la progesterona y el estradiol suelen ser administrados en forma inyectable cada 12 horas por 7 días, consideramos que sería de utilidad lograr la administración de estas hormonas mediante un dispositivo intravaginal, debido a que se necesitaría menor mano de obra para su administración e implicaría menor estrés al animal que la presentación inyectable. Por esto Davis y col (1983) utilizaron una esponja intravaginal impregnada con 17 β estradiol y progesterona durante 10 días para la inducción a la lactancia, observando que la concentración residual en leche y la mano de obra es menor, comparándolo con el régimen de inyecciones.

CONCLUSIONES

Ambos tratamientos (T1:E₂P₄ y T2:E₂P₄+E₂P₄) fueron exitosos para la inducción a la lactancia.

La respuesta al tratamiento de inducción dependió de la paridad, debido que aumentar el periodo de tratamiento con estradiol y progesterona a 12 días para inducir la lactancia logró una mayor producción de leche en vacas primíparas.

La leche de vacas inducidas artificialmente a la lactancia mediante el protocolo de 12 días no se considera apta para el consumo humano durante al menos los primeros 12 días de lactancia, debido a que presenta residuos de estradiol superiores a los de vacas control.

El tratamiento de 7 días (E₂P₄) es el más indicado para la inducción hormonal a la lactancia en vacas multíparas debido a que logra niveles de producción similares a los obtenidos con tratamientos más extensos y no se encuentran residuos hormonales superiores a los de vacas control.

No existen concentraciones residuales de progesterona en ninguna de las muestras analizadas, lo cual indica que luego de retirado el dispositivo de liberación controlada de progesterona (CIDR) la concentración de esta hormona en sangre no perdura lo suficiente para encontrarse en leche.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams GD, Smith R, Wettemann P, Bush LJ (1983). Induced Lactation of Infertile Dairy Cows. Oklahoma Agricultural Experiment Station, Animal Science Research Report, 112:34-35. Disponible en: www.agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1983/US/US83058.xml;US8251479 Fecha de consulta: Abril de 2012.
2. Akers RM (2002). Overview of mammary development. En: Akers RM. Lactation and the Mammary Gland. Iowa State, Blackwell Pub, pp 3-44.
3. Bó GA, Baruselli, PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. Theriogenology; 57:53-72.
4. Bó GA, Colazo MG, Martínez MF, Kastelic JP, Mapletoft RJ (2006). Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestagenos y diferentes ésteres de estradiol. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, Londrina. Anais. Londrina, pp 71-84.
5. Booth NH, McDonald LE (1988). Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6a ed, Iowa State Pr, 1227pp.
6. Butler WR (2000). Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. Anim Reprod Sci; 60-6: 449-457.
7. Caravaca FP, Castel JM, Guzmán JL, Delgado M, Mena Y, Alcalde MJ, González P (2003) Lactación. En: Caravaca FP. Bases de la Producción Animal. Sevilla, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. Pp 115-126.
8. Cavestany D, Fernández D, Salazar E, Sánchez A, Leyton L, Crespi D (2008). Determinación de niveles de progesterona en sangre luego de la administración parenteral de progesterona en vacas Holando ovariectomizadas o ciclando. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, p. 218-219
9. Cavestany D, Martinez Barbitta M (2010). Perfiles hormonales en protocolos de sincronización de celos con diferentes fuentes de progesterona y estradiol en vacas Holando en pastoreo. INIA. Serie de Actividades de Difusión N° 610, p. 27
10. Chakriyarat S, Head HH, Thatcher WW, Neal FC, Wilcox CJ (1978) Induction of lactation: Lactational, Physiological, and Hormonal Responses in the Bovine. J Dairy Sci, 61:1715-1724.

11. Chilliard Y (1999). Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal. En: Martinet J, Houdebine LM, Head HH. Biology of Lactation. París, Collection Mieux Comprendre. Editado por INRA, pp. 503-552.
12. Chung SP, Jacobson NL (1999). Glándula Mamaria y Lactación. En: Swenson MJ. Fisiología de los Animales Domésticos de Dukes. 5a ed, México DF, Ed Limusa, pp. 711-727.
13. Collier RJ, Bauman DE, Hays RL (1977). Effect of reserpine on milk production and serum prolactin of cows hormonally induced into lactation. J Dairy Sci, 60(6):896-901.
14. Corbellini CN (2000) Influencia de la nutrición en las enfermedades de la producción de las vacas lecheras en transición. Proyecto Lechero E.E.A. Pergamino Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. Disponible en: http://www.veterinarios.or.cr/esp/?page_id=1761 Fecha de consulta: Mayo 2012.
15. Correa HJ (2001) La vaca en Transición: Metabolismo y manejo nutricional. Disponible en: www.agro.unalmed.edu.co/departamentos/panimal/docs/manejo.pdf Fecha de consulta: Mayo 2012.
16. Cowie AT (1971) Influence of hormones on mammary growth and milk secretion. En: Cowie AT, Forsyth IA, Hart IC. "Lactation" Monographs on Endocrinology 1980 Vol. 15 No. Hormonal control of lactation pp.146-229.
17. Davezies M (2008) Cadenas Agroindustriales PENCTI. Informe final de la consultoría sobre cadenas agroindustriales en el marco del Plan Estratégico Nacional en Ciencia, Tecnología e Innovación. Disponible en: www.anii.org.uy/imagenes/libro_cadenas_agroindustriales.pdf Fecha de consulta: Abril 2012.
18. Davis S, Welch R, Pearce M, Peterson A (1983). Induction of Lactation in Nonpregnant Cows by Estradiol-17 β and Progesterone from an Intravaginal Sponge. J Dairy Sci, 66:450-457.
19. Dobson H, Smith RF, Royal MD, Knight CH, Sheldon IM (2007). The high producing dairy cow and its reproductive performance. Repr Dom Anim, 42(2):17-23
20. Erb R, Monk E, Mollett T, Malven P, Callahan C (1976). Estrogen, Progesterone, Prolactin and Other Changes Associated with Bovine Lactation Induced with Estradiol-17 b and Progesterone, J Anim Sci, 42:644-654.

21. Fehllhaber K, Janetschke P (1992). Leche y productos lácteos. En: Fehllhaber K, Janetschke P. Higiene Veterinaria de los Alimentos. Zaragoza, Ed Acribia, pp 585-626.
22. Fernández G (2009) El período de Transición en la vaca lechera. Disponible en: www.veterinaria.unmsm.edu.pe/files/gilberto_transicion.pdf Fecha de consulta: Abril 2012.
23. Fulkerson W, McDowell G (1975). Artificial Induction of Lactation in Cattle by Use of Dexamethasone Trimethylacetate, Aust. J. Biol. Sci, 28: 183-187.
24. Glauber CE (2007). Fisiología de la lactación en la vaca lechera. Veterinaria Argentina, 24(234):274-281. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/produccion_bovina_leche/131-fisiologia.pdf Fecha de consulta: Abril 2012.
25. Grummer RR (1995) Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. J Anim Sci, 73(9): 2820-2833.
26. Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A (2004) Dry matter intake and energy balance in the transition period. Vet Clin North Amer Food Anim Pract. 20(3):447-470.
27. Head HH, Chakriyarat S, Thatcher WW, Wilcox CJ, Becker HN (1982). Induction of lactation: Comparison of injection of Estradiol-17 β and Progesterone for 7 or 21 days on Prolactin Response to Thyrotropin Releasing Hormone and milk yield in Dairy Cattle. J Dairy Sci; 65:927-936.
28. Hernández J, Morales JS (2001). Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. Vet Mex; 32(4):279-287
29. Jewell T (2002). Artificial induction of lactation in nonbreeder dairy cows. Disponible en: www.scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-06242003-071849/unrestricted/final1.pdf Fecha de consulta: Abril 2012.
30. Knight CH, Peaker M, Wilde CJ (1998). Local control of mammary development and function. Rev Reprod; 3:104-112
31. Lacasa A (2003). Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera. Barcelona, Ed. Reverté, 873 p.
32. Meikle A (2001). Reproductive Endocrinology of Prepubertal and Anestrous Ewes. Tesis Doctoral, Uppsala, 103 p.
33. Mellado N, Nazarre E, Olivares L, Pastor F, Estrada A (2006). Milk production and reproductive performance of cows induced into lactation and treated with bovine somatotropin. J Animal Sci; 82:555-559.

34. Mohan K, Shridhar NB, Jayakumar K, Manafi M (2010) Comparison of milk Estrogen and Progesterone Concentration in Induced Heifers and Normally calved lactating cows. *Asian J Anim Vet Adv*; 5(4):260-265.
35. Nation DP, Burke CR, Parton G, Stevenson R and Macmillan KL. (2000). Hormonal and ovarian responses to a 5-day progesterone treatment in anoestrous dairy cows in the third week postpartum. *Anim Reprod Sci*. 63:13–25.
36. Neville MC, McFadden TB, Forsyth I (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 7:49-66.
37. Neville, M. C. (2006) Lactation and its hormonal control. En: Jimmy D. Neill. *Physiology of Reproduction*. 3a ed. Amsterdam, Elsevier, pp. 2993-3054.
38. Pape-Zambito DA, Roberts RF, Kensinger RS (2010). Estrone and 17 β -estradiol concentrations in pasteurized-homogenized milk and commercial dairy products. *J Dairy Sci*; 93(6):2533-2540.
39. Peel CJ, Taylor JW, Robinson IB, McGowan AA, Hooley RD, Findlay JK (1978). The importance of Prolactin and the milking stimulus in the artificial induction of lactation in cows. *Aust J Biol Sci*; 31:187-185.
40. Peel CJ, Taylor JW, Robinson IB, Hooley RD (1979). The use of Oestrogen, Progesterone and Reserpine in the artificial induction of Lactation in Cattle. *Aust J Biol Sci*; 32:251-259
41. Ribeiro P (2009). Indução artificial de lactação em bovinos. Tesis de Maestría. UFMG- Escola de Veterinaria. Belo Horizonte, Brasil, 38p.
42. Sawyer GJ, Fulkerson WJ, Martin GB, Gow C (1982). Artificial induction of lactation in cattle: Initiation of lactation and estrogen and progesterone concentrations in milk. *J Dairy Sci*, 69:1536-1544.
43. Smith KL, Schanbacher FL, (1973). Hormone induced lactation in the bovine. I. Lactational performance following injections of 17 β -estradiol and progesterone. *J Dairy Sci*, 56(6):738-743.
44. Smith KL, Schanbacher FL, (1974). Hormone induced lactation in the bovine. II. Response of nulligravida heifers to modified estrogen-progesterone treatment. *J Dairy Sci*, 57(3):296-303.
45. Squires EJ (2010) Capítulo 4.1 Mammary gland development and milk production. En: Squires EJ. *Applied animal endocrinology*. Cambridge UK, 2a ed, Cambridge University Press, pp.159-172.

46. Tucker HA (1985) Endocrine and neural control of the mammary gland. En: Larson LB, Lactation. The Iowa State University press, P 39-79.
47. Tucker HA (2000) Symposium: Hormonal Regulation of milk Synthesis. Hormones, Mammary Growth, and Lactation: a 41-year perspective. J Dairy Sci, 83:874-884.
48. Turner CW, Gardner WU (1931). The relation of the anterior pituitary hormones to the development and secretion of the mammary gland. University of Missouri, Agricultural Experiment Station. Research Bulletin 158:1-57.
49. Valdez MG, Posadas EP, Quiroz MM, Martínez BE, Ochoa P (2003). Efecto de la inducción de la lactación por método hormonal sobre la producción láctea en vacas holstein-friesian infértiles. XXVII Congreso Nacional de Buiatría México. Disponible en: www.ammveb.net/XXVII%20CNB/memorias/Reproduccion/Oral/htm/Trabajo_139_Efecto_de_la_induccion_de_la_lactacion_por_metod.htm Fecha de consulta: Febrero 2012-
50. Wolford ST, Argoudelis CJ (1979). Measurement of estrogens in cow's milk, human milk, and dairy products. J Dairy Sci, 62:1458-1463.