

11202
2 ej 10

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION



INICIO DE LA ACTIVIDAD OPIOIDE INHIBITORIA HIPOTALAMICA
EN EL VARON. ESTUDIOS CON EL ANTAGONISTA OPIOIDE
NALOXONA A TRAVES DE LA MADURACION SEXUAL.

T E S I S
Q U E P R E S E N T A

JUAN PABLO MENDEZ B.

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F., 1987.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I.	INTRODUCCION - - - - -	1
	A. Antecedentes - - - - -	1
	B. Anatomía y Fisiología - - - - -	2
	C. Hormona liberadora de hormona luteinizante (LRH) - - - - -	2
	D. Pulsos de LRH - - - - -	4
	E. Control sobre la síntesis y secreción de LRH	6
	F. Opioides endógenos - - - - -	7
	G. Antagonistas opioides (Naloxona) - - - - -	8
	H. Pubertad - - - - -	14
II.	OBJETIVO E HIPOTESIS - - - - -	17
III.	SUJETOS Y METODO - - - - -	18
	A. Protocolos de estudio - - - - -	22
	1. Protocolo 1 - - - - -	23
	2. Protocolo 2 - - - - -	25
	B. Análisis de muestras - - - - -	25
	C. Análisis estadístico - - - - -	27
IV.	RESULTADOS - - - - -	29
	A. Administración de Naloxona - - - - -	29
	B. Administración de LRH - - - - -	31
V.	DISCUSION - - - - -	34
VI.	BIBLIOGRAFIA - - - - -	42

INTRODUCCION

ANTECEDENTES:

Han transcurrido casi 40 años desde que por vez primera se propuso que la regulación de la síntesis y secreción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) se encontraba mediada por la acción que el sistema nervioso central ejercía sobre la hipófisis anterior (1). A pesar del tiempo transcurrido y de los avances en la investigación en esta área todavía existen numerosas interrogantes sobre los mecanismos íntimos de esta regulación.

Ambas gonadotropinas son glicoproteínas, estructuralmente similares, con pesos moleculares de aproximadamente 30,000 daltons. Cada hormona está formada por dos cadenas glicopeptídicas, unidas por puentes de hidrógeno, denominadas subunidad alfa y subunidad beta. La secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa es idéntica en ambas hormonas. La beta, constituida por 115 aminoácidos, es única para cada gonadotropina y les confiere su actividad biológica particular (2). Ambas gonadotropinas ejercen su acción sobre las gónadas (testículos u ovarios), estimulando la secreción de esteroides así como la maduración de los gametos (3). En los testículos la FSH actúa sobre las células de Sertoli estimulando, la espermatogénesis. El mecanismo

de ésto aun no esta perfectamente dilucidado. La LH estimula en las células de Leydig la síntesis y secreción de andrógenos, siendo el principal de éstos la testosterona (4,5).

ANATOMIA Y FISILOGIA:

El sistema nervioso central se comunica con la hipófisis anterior a través de una vía vascular. La síntesis de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LRH) se efectua en las neuronas especializadas del hipotálamo pre óptico, localizadas en la porción ventral del diencéfalo por arriba del quiasma óptico, así como en aquellas localizadas en la porción medial y basal del mismo (6,7). Este péptido es secretado por las terminales neuronales hacia una red capilar especializada que rodea a la eminencia media. Una vez que alcanza la circulación porta-hipofisaria, es transportado hacia la hipófisis anterior (8), donde interactua con los gonadotropos hipofisarios estimulando la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH.

HORMONA LIBERADORA DE HORMONA LUTEINIZANTE:

Dentro de la complejidad de los eventos que conducen a la síntesis y secreción de gonadotropinas, ha sido demostrado desde hace varios años que la acción de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LRH) estimula la síntesis y secreción de gonadotropinas por las células de las gonadotropas hipofisarias (9,10).

radora de hormona luteinizante es un factor determinante para este fin. En 1960, Mc Cann y colaboradores observaron que la inyección de extractos hipotalámicos a ratas provocaba la secreción de la hormona luteinizante por la hipófisis anterior (9). En 1971, los trabajos tanto de Matsuo (10) como de Schally (11) indicaron que un decapeptido cuya secuencia de aminoácidos era la siguiente: Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly, era el responsable de esta acción sobre el gonadotropo, denominándosele desde entonces como LRH, u hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

La LRH es sintetizada a partir de una prohormona mayor. Esta ha sido identificada en diversas especies, observándose que es diferente en distintos tipos de vertebrados, pero igual en mamíferos (12).

La administración de LRH exógena ha confirmado que la LRH es la molécula responsable del estímulo para la síntesis y la secreción de las gonadotropinas (13,14).

En la actualidad, existe todavía controversia sobre la existencia de una hormona hipotalámica específica liberadora de FSH, pues es ampliamente conocido que el estímulo con LRH exógena produce un mayor incremento en la liberación de LH que en la de FSH. Aún cuando existen diversos estudios e hipótesis que apoyan a una u otra teoría, no existe un consenso generalizado al respecto (15,16).

PULSOS DE LRH:

La hipófisis responde solamente al estímulo de tipo pulsátil de la LRH, ya que cuando se expone a la glándula continuamente a la acción de esta hormona se observa una falta de respuesta al estímulo, presentándose el fenómeno de regulación decreciente o de desensibilización por parte de los receptores a la hormona (17). Este fenómeno fue demostrado originalmente por Roth y colaboradores para el receptor de insulina en el hígado (18). La desensibilización significa que una exposición prolongada de la célula blanco a una concentración hormonal elevada conduce a una respuesta hormonal disminuida. Este fenómeno es secundario a ciertos cambios en la concentración y/o afinidad del receptor y tiene como función fisiológica el prevenir la sobreestimulación de las células (19,20). También ha sido observado que tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de LRH modulan el tipo de respuesta hipofisiaria. Asimismo, la frecuencia en la pulsatilidad de LRH varía de acuerdo al ambiente endócrino existente: ha sido demostrado que esta frecuencia presenta variaciones a lo largo del ciclo ovulatorio (21) y que es incrementada con la castración (22). Por lo tanto, el sistema nervioso central detecta el ambiente endócrino existente alterando entonces las descargas de las neuronas productoras

ras de LRH en el hipotálamo (23),

Por otro lado se ha demostrado que la secreción de LH es episódica (24-26). Con base en estudios llevados a cabo en animales de experimentación, se ha propuesto que las fluctuaciones intermitentes detectadas en las concentraciones de LH circulante reflejan directamente la estimulación hipofisiaria por medio de pulsos de LRH (27,28).

La acción ejercida por la LRH sobre la hipófisis anterior se inicia con la unión, por parte de la hormona, a receptores específicos que se encuentran localizados en la membrana citoplasmática del gonadotropo (29). Esta unión altera la permeabilidad de la membrana a algunas iones, permitiendo así la movilización del calcio intra y extracelular con lo cual se activa la liberación de las gonadotropinas (29). Asimismo, al producirse la unión con el receptor, aumenta la concentración de monofosfato de adenosina en su forma cíclica (AMPC) al activarse el sistema adenilato ciclasa; este fenómeno, sin embargo al parecer no es indispensable para la acción hormonal. El número de receptores hipofisarios a LRH puede ser incrementado farmacológicamente mediante la exposición de la glándula a LRH o a estrógenos, lo cual permite que en determinadas condiciones, exista una mejor respuesta de la glándula a la acción de la LRH (30).

CONTROL SOBRE LA SINTESIS Y SECRECION DE LRH:

Un gran número de neurotransmisores ejercen su acción sobre el hipotálamo, éstos se encargan de modular el control de la síntesis y secreción de LRH (31,32). A su vez, estas sustancias presentan variaciones en sus concentraciones dependiendo del medio endócrino existente, ya que los esteroides gonadales modifican los niveles de varios de estos neurotransmisores así como el efecto que éstos ejercen sobre la liberación de LRH (31,33,34). Entre los neurotransmisores que desempeñan un papel más importante, se encuentran los adrenérgicos. Existe amplia evidencia neuroanatomofisiológica que señala la importancia de este tipo de neurotransmisores en la regulación de las descargas pulsátiles de LRH. Los cuerpos celulares noradrenérgicos se proyectan hacia el hipotálamo inervando a la gran mayoría de los núcleos hipotalámicos. En ratas, se ha demostrado que estos cuerpos celulares regulan de manera directa la liberación de LRH (35). Por otro lado, ha sido demostrado que el bloqueo en la neurotransmisión alfa adrenérgica inhibe la secreción pulsátil de LH (36,37), mientras que la administración de adrenalina o noradrenalina sobre el hipotálamo medio basal produce la liberación de la gonadotropina (38). Asimismo, se ha observado que otros neurotransmisores (dopamina, acetilcolina, etc.) afectan también la síntesis y secreción de LRH. Sin embargo, los reportes de las manipu

laciones neurofarmacológicas mediante el uso de estos neurotransmisores han sido por demás contradictorios (39) puesto que la respuesta depende tanto de la dosis administrada, como del medio hormonal existente en el sujeto ya que se pueden encontrar efectos opuestos en sujetos de experimentación expuestos a tratamientos idénticos, dependiendo del estado hormonal en el que se encuentren. Asimismo, la manipulación de este sistema mediante la administración exógena de un esteroide puede alterar la respuesta presentada por el sujeto. Otro factor a considerar es que un determinado neurotransmisor puede ejercer su acción al biotransformarse, o mediar la estimulación de un segundo neurotransmisor.

OPIOIDES ENDOGENOS:

Dentro de las sustancias que actúan como neurotransmisores o neuromoduladores modificando la síntesis y secreción de hormonas hipotalámicas, los opioides endógenos ocupan un lugar preponderante (Figura 1). Desde el descubrimiento de los primeros pentapéptidos endógenos (Met⁵-encefalina y Leu⁵-encefalina) en 1975 (40), se generalizó la búsqueda de este tipo de sustancias habiéndose encontrado hasta la fecha un gran número de ellas, las cuales son conocidas en la actualidad con el nombre genérico de opioides endógenos. La identificación de grandes concentraciones de opioides en

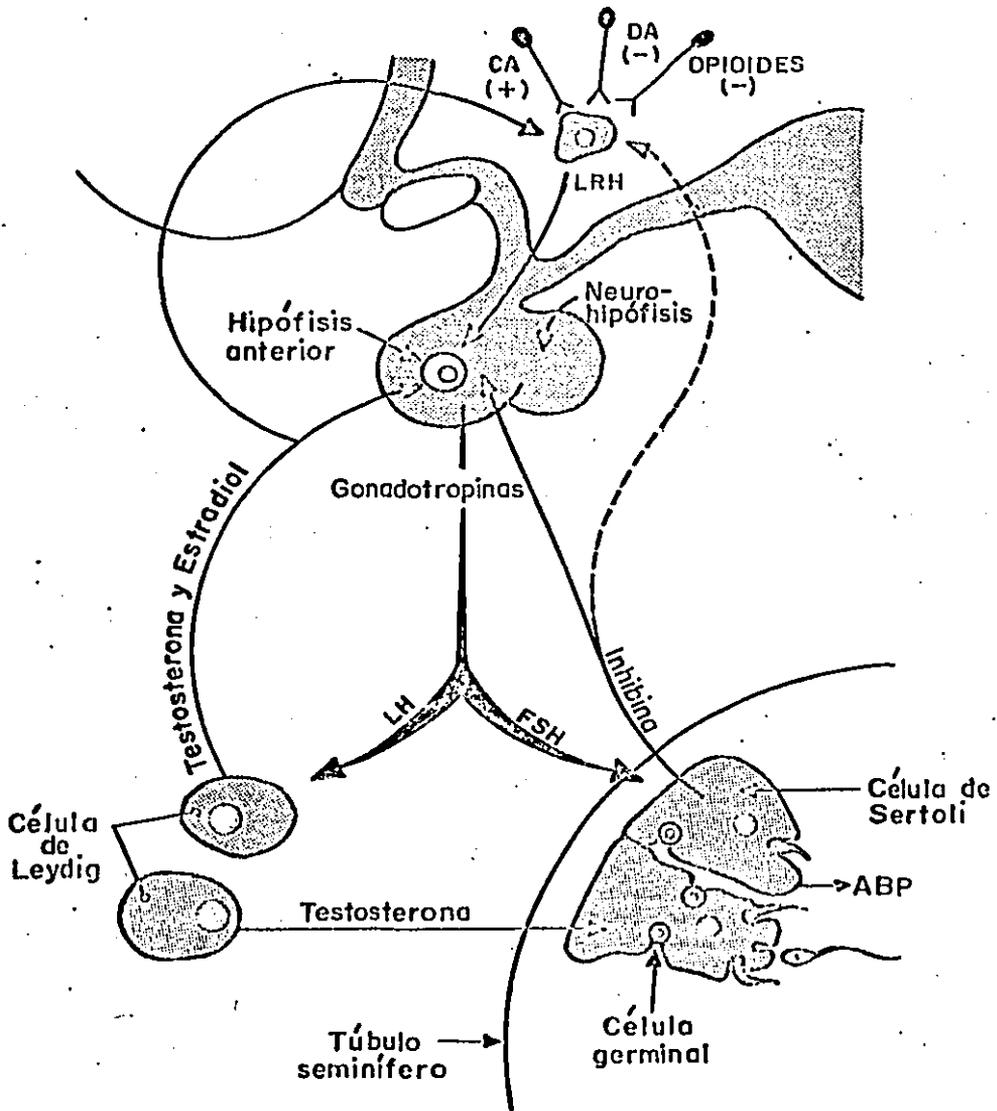


FIGURA 1.- Eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Efecto de neurotransmisores sobre la secreción de LRH.

el hipotálamo humano (41), además de la información previa existente en cuanto a las modificaciones endócrinas producidas por el uso de alcaloides del tipo de la morfina, condujo a la investigación de las interacciones que este tipo de sustancias ejercían con la neuronas hipotalámicas sobre el control de la función hipofisiaria.

Los opioides interactúan con diversos receptores en el sistema nervioso central. Entre los principales se encuentran los receptores M (morfinicos) que unen preferentemente opioides, mientras que los receptores δ (encefalínicos) unen de manera preferencial encefalinas (42). La utilización de la morfina o de sus análogos, así como de sus antagonistas, produce un gran número de modificaciones endocrinológicas tanto en los sujetos sanos como en aquellos que presentan algún tipo de patología; este aspecto será revisado más adelante.

ANTAGONISTAS OPIOIDES (NALOXONA):

El concepto de antagonismo en cuanto a los opioides se refiere es complejo debido a la existencia de varias subespecies de receptores, los cuales unen de manera preferencial a determinado tipo tanto de agonistas como de an

tagonistas.

Ciertos antagonistas como la ciclazocina y la nalorfina, revierten la mayoría de los efectos producidos por la morfina o agentes similares, mas en ausencia de un efecto opioide, producen efectos agonistas como son: analgesia, depresión respiratoria, y otros. Dentro de este grupo de fármacos se encuentra la naloxona (43) la cual se ha observado que es la más específica de los antagonistas opioides existentes hasta la fecha; se requieren dosis menores de naloxona, en comparación con los otros antagonistas existentes, para lograr el mismo efecto, y -- grandes dosis de este fármaco (hasta 24 mgrs) carecen de efectos agonistas así como de efectos adversos en sujetos sanos (44). Sin embargo, hay que señalar que se han reportado diversos efectos secundarios al revertir anestesia con el fármaco en sujetos que presentaban enfermedad cardiovascular previa, como han sido: crisis hipertensivas (45-47), ruptura de aneurismas cerebrales (46), y edema pulmonar y fibrilación ventricular (47). Asimismo, en dos casos se reportó fibrilación ventricular en dos mujeres sanas en las cuales también se utilizó el medicamento con el fin de revertir el estado anestésico, indicándose que la taquicardia se produjo por una descarga suprarrenal excesiva de adrenalina la cual fue la causante directa de

la fibrilación (47).

Los efectos de la naloxona se producen inmediatamente después de su administración intravenosa, su vida media es de una hora aproximadamente y la duración de su acción varía entre 1 y 4 horas. El fármaco es metabolizado en el hígado al conjugarse principalmente con ácido glucurónico. La naloxona se absorbe oralmente, pero es metabolizada inmediatamente en su primer paso por el hígado conservando solamente el 2% de su potencia original.

La naltrexona, otro antagonista opioide sumamente específico presenta una mayor eficacia oral debido a que alcanza por esta vía concentraciones suficientes para llegar a producir efectos sobre el sistema nervioso central (48).

Las modificaciones endocrinológicas observadas con la administración de morfina, condujeron a la postulación de teorías que implicaban la acción de las endorfinas sobre el control en la síntesis y secreción de las diversas hormonas hipotalámicas, razón por la cual el uso de antagonistas opioides (preferentemente naloxona o naltrexona) constituía un modelo experimental por demás atractivo para investigar los controles neuroendócrinos ejercidos por los opioides endógenos.

Con base en lo anterior se llevaron a cabo diversos

estudios tanto en animales de experimentación como en el hombre, los cuales han demostrado la influencia que poseen los opioides endógenos sobre la síntesis y secreción de las hormonas hipotalámicas. En las ratas, ha sido demostrado que los antagonistas opioides estimulan la secreción de LH por medio de la desinhibición de aquellos mecanismos cerebrales que suprimen la secreción de LRH, esto es, bloqueando en forma directa al sistema opioide endógeno (49-52). Este fenómeno ha sido discutido por diversos autores. Algunos de ellos, han propuesto que la acción ejercida por los opioides pudiese no estar dada en forma directa, sino ser secundaria a la interacción de los opioides con mecanismos noradrenérgicos (53-54) o serotoninérgicos (55). Asimismo, ha sido comprobado que la respuesta de LRH a los opioides endógenos depende del ambiente esteroideo existente (50,56). Por otro lado, se ha observado que en los roedores, los antagonistas opioides disminuyen la liberación de prolactina (57-59) y de hormona de crecimiento (59), además de modular también la síntesis de hormonas suprarrenales (60,61).

En el humano también se han descrito diversas acciones de los opioides endógenos y del efecto que produce la manipulación de sus antagonistas sobre la esfera neuroendocrina. Se ha observado que en sujetos sanos se produce

un efecto desinhibidor del freno opioide endógeno en la secreción de gonadotropinas (más evidente en cuanto a las concentraciones de LH que de FSH) al administrar antagonistas opioides (62-71). Al administrar naloxona o nal^utrexona aumenta el número de descargas de LH (64,65,67), así como la amplitud de éstas (65,67). El incremento en las concentraciones séricas de LH se produce a partir de los 30 minutos de haber administrado el fármaco por vía intravenosa (68,69). Si se administra el antagonista -- opioide conjuntamente con dopamina, el medicamento carece de acción sobre la secreción de gonadotropinas (63,70), lo cual de nueva cuenta demuestra la interacción que los opioides endógenos presentan con otros neurotransmisores. El efecto que ejercen los opioides endógenos sobre la secreción de prolactina no es tan claro en el humano como el observado en las ratas, pues mientras algunos estudios de muestran disminución en la secreción de prolactina al administrar los antagonistas (72,73), otros demuestran que no existe influencia alguna sobre la secreción de esta hormona (68,70,74-76). Por otro lado, no se han documentado cambios en la secreción de hormona de crecimiento al administrar antagonistas opioides a sujetos sanos (68,70,75,76), mas si se ha observado un incremento en las concentraciones de esta hormona en pacientes quienes recibían fármacos psicotr^opicos (73). Existen reportes discrepantes en

cuanto a la acción que los opioides endógenos ejercen sobre la tirotropina, pues en algunos de ellos se afirma que los niveles de esta hormona no se alteran por la acción de los antagonistas (68,70), mientras que en otros se demuestra que este tipo de fármacos disminuyen las concentraciones séricas de dicha hormona (76). Por último, se han documentado incrementos en los niveles de cortisol al administrar antagonistas opioides (70,73,77,78).

Enfocando de manera específica todas estas observaciones hacia el control que los opioides ejercen sobre el gonadotropo, podemos afirmar que ha quedado plenamente demostrado que las gonadotropinas se encuentran bajo un control inhibitorio por parte de los opioides endógenos y que la administración de antagonistas opioides puros incrementa la secreción de estas hormonas en hombres normales; para ello, los opioides endógenos alteran el patrón de liberación de LRH a través de la inhibición de las neuronas secretoras de LRH. Ahora bien, los efectos de los antagonistas opioides en cuanto al incremento de LH se refiere han sido observados exclusivamente en sujetos normales que se encuentran en la edad reproductiva (62-71), bien sean hombres, o mujeres que se encuentren en fase folicular tardía o fase lútea. Los antagonistas opioides, no son capaces de modificar en forma significa

tiva los niveles plasmáticos de LH, ni la frecuencia o amplitud de sus pulsos de secreción en aquellos sujetos con deficiencia de esteroides sexuales [mujeres postmenopáusicas u ooforectomizadas (79-81), sujetos hipogonádicos (82, 83) o prepúberes (84,85)]. Debido a que esta falta de efecto de los antagonistas opioides puede ser revertida por la administración de esteroides sexuales (79-81) y que no se ha observado respuesta a los antagonistas en la fase folicular temprana o durante el periodo menstrual pero sí en la fase folicular tardía y en la fase lútea media (65,86), se ha propuesto que los esteroides sexuales ejercen una influencia profunda sobre la actividad opioide endógena. La mayor evidencia en cuanto a este aspecto se refiere se ha obtenido mediante estudios en monos en los cuales se ha observado que las concentraciones de las endorfinas en la sangre de la circulación porta-hipofisaria son muy pequeñas durante la fase folicular temprana del ciclo menstrual así como posterior a la ooforectomía, aumentando de manera importante después del tratamiento con estrógenos y progestágenos (87,88).

PUBERTAD:

La transición de la inmadurez sexual al desarrollo sexual adulto, representa un evento dinámico, complejo, sobre el cual no han sido dilucidados los factores que

le dan inicio a la activación del eje hipotalámico-hipófisis-gónada después de que éste ha permanecido en un largo período de relativa quietud (89).

Al iniciarse la pubertad, las concentraciones de gonadotropinas se incrementan paulatinamente y la gónada en maduración inicia la producción de esteroides sexuales (5,90). La edad de aparición de la pubertad es variable, puesto que depende de factores genéticos, constitucionales y medio ambientales. En el hombre la pubertad aparece en la mayor parte de los casos antes de los 15 años de edad; cuando no ocurre así, se establece el diagnóstico de retraso puberal. Cuando a los 18 ó 19 años de edad el varón no ha iniciado la pubertad esto significa que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada presenta una alteración patológica anatomo-funcional (91).

Los diferentes estadios de desarrollo puberal fueron clasificados por Marshall y Tanner (92), clasificación ésta que ha sido aceptada universalmente (93). Esta clasificación se basa en las características siguientes: volumen de las gónadas; rugosidad, coloración y elongación del escroto; longitud y grosor del pene; así como en la cantidad, distribución y características del vello pubia

no. De acuerdo a las características presentadas por de terminado sujeto, éste podrá ser clasificado desde un estado 1 de desarrollo genital (prepúber) hasta el estado 5 (adulto normal).

Con base en lo anteriormente expresado, se puede comprender que la pubertad ofrece un modelo único y natural para el estudio de los efectos producidos por la exposición progresiva a los incrementos paulatinos en las concentraciones de los esteroides sexuales y a la influencia que éstos poseen sobre la activación de los mecanismos reguladores del hipotálamo dependientes de los opioides endógenos.

OBJETIVO

Investigar en sujetos masculinos que se encuentren en diferentes etapas de la maduración sexual el momento preciso a partir del cual es posible detectar la presencia de la actividad opioide inhibitoria hipotalámica sobre la secreción de hormona luteinizante, mediante la administración aguda de un antagonista opioide (naloxona).

HIPOTESIS

Las diferencias que se presenten en la respuesta al antagonista opioide durante los diferentes estadios de la pubertad determinarán la etapa del desarrollo puberal del varón a partir de la cual existe influencia de los opioides endógenos sobre la actividad del eje hipotálamo-gonadotropo.

SUJETOS Y METODO

Se estudiaron un total de 24 sujetos los cuales fueron divididos en tres grupos según el grado de desarrollo genital, así como un cuarto grupo en el que fueron incluidos pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico (tabla 1). El primer grupo lo constituyeron 4 niños prepúberes en estadio 1 de la clasificación de Tanner (T-G1). Las edades cronológicas de estos sujetos se encontraban entre los 10 y los 13 años y las edades óseas entre los 6 y los 12 años (tabla 1); las determinaciones en suero basales de gonadotropinas, testosterona y estradiol demostraron concentraciones de acuerdo al estado prepuberal de los sujetos (tabla 2). El segundo grupo se encontraba compuesto por tres subgrupos de púberes normales en estadios T-G2 (n=3), T-G2-3 (n=2) y T-G3 (n=4) con edades cronológicas que fluctuaban entre los 12 y los 17 años y edades óseas de los 12 a los 15 años (tabla 1); las concentraciones en suero basales de LH, FSH y testosterona se encontraron dentro de los valores de referencia para niños que presentan ese desarrollo puberal. El estradiol se encontró dentro de los límites normales para la edad y sexo de los pa

TABLA 1
CARACTERISTICAS CLINICAS

	SUJETO #	EDAD CRONOLOGICA	EDAD OSEA	ESTADIO DE TANNER	DIAGNOSTICO
A)	1	13	12	1	Talla debajo del promedio
	2	12	10	1	Obesidad moderada
	3	10	6	1	Talla debajo del promedio
	4 ^a	11	11	1	Criptorquidia unilateral
B)	5 ^a	12	12	2	Criptorquidia unilateral
	6	14	12	2	Talla debajo del promedio
	7	14	13	2	Talla debajo del promedio
	8	17	14	2-3	Historia de retardo puberal
	9	13	13	2-3	Ginecomastia puberal
	10	17	14	3	Historia de retardo puberal
	11	14	14	3	Obesidad moderada
	12	16	14	3	Historia de retardo puberal
	13	15	15	3	Obesidad moderada
	C)	14	17	17	4
15		16	16	4	Voluntario normal
16		17	Adulto	5	Voluntario normal
17		20	Adulto	5	Voluntario normal
18		33	Adulto	5	Voluntario normal
19		27	Adulto	5	Voluntario normal
D)	20	27	Adulto	5	Hipogonadismo hipotalámico
	21	26	-	3	Hipogonadismo hipotalámico
	22	21	17	2	Hipogonadismo hipotalámico
	23	20	13	1	Hipogonadismo hipotalámico
	24	22	17	2-3	Hipogonadismo hipotalámico

a = mismo sujeto.

TABLA 2

CONCENTRACIONES HORMONALES BASALES

SUJETO #	TESTOSTERONA ^b (ng/ml)	ESTRADIOL ^b (Pg/ml)	LH ^b (mUI/ml)	FSH ^b (mUI/ml)
A) 1	0.21	18	2.1	0.7
2	0.20	<13	0.1	0.9
3 ^a	0.10	<13	2.2	0.8
4 ^a	0.62	<13	2.0	1.3
B) 5 ^a	1.93	<13	2.4	2.1
6	1.98	24	2.7	0.7
7	2.79	30	2.2	5.4
8	4.61	<13	1.5	3.2
9	1.93	85	1.7	1.5
10	3.78	<13	2.5	2.6
11	3.24	16	3.0	2.5
12	4.17	24	4.3	1.3
13	4.20	-	3.2	2.4
C) 14	4.11	37	6.7	3.4
15	4.80	-	4.3	2.3
16	4.82	15	3.6	3.2
17	6.75	42	4.1	1.9
18	4.10	25	5.6	1.1
19	4.71	21	4.7	1.0
D) 20	0.23 ^c	<13	1.7	0.7
21	0.60 ^c	<13	0.8	0.1
22	1.30 ^c	-	2.0	1.9
23	0.40	<13	2.6	0.8
24	0.50	<13	4.1	1.2

a = mismo sujeto

b = media de dos muestras basales

c = Paciente tratado previamente con ciclopentilato de testosterona.

cientes ($< 30 \text{ pg/ml}$) salvo en el sujeto número 9 (tabla 2) en quien se encontró en 85 pg/ml . Hay que destacar que este paciente había sido admitido al Instituto por presentar ginecomastia puberal.

Tanto los sujetos prepúberes, como los púberes fueron seleccionados de un grupo de niños que acudían a la consulta externa de la Unidad Metabólica Pediátrica del Instituto por presentar alteraciones que no tenían relación aparente con algún tipo de alteración endocrinológica como son: talla por debajo del promedio (talla entre la percentila 10 y 25 para niños mexicanos), criptorquidia simple unilateral ($n=1$), discreto retardo en el inicio puberal, ginecomastia puberal ($n=1$) u obesidad moderada (peso entre la percentila 50 y 75 para niños mexicanos) (tabla 1). Todos los niños pertenecientes a estos dos grupos habían sido estudiados previamente desde un punto de vista endocrinológico sin que se detectase ninguna alteración a este nivel. Asimismo, se había descartado mediante la evaluación clínica y de laboratorio y gabinete cualquier otro tipo de entidad patológica. Es importante destacar que dos de los sujetos (Nos. 4 y 5; tabla 1 y 2) están representados por el mismo individuo estudiado tanto en estadio T-G1 como en estadio T-G2 (habiendo transcurrido 7 meses entre el pri

mer estudio y el segundo). Asimismo, es importante el señalar que en un inicio se estudiaron 9 sujetos en estadio 1 de Tanner y que en este trabajo solamente se presentan los resultados de aquellos 4 que posteriormente iniciaron su pubertad de manera natural sin alteraciones (entre 3 y 12 meses después de haber practicado el estudio) pasando al estadio T-G2. El resto de la muestra no fue incluida ya que realmente podría corresponder a sujetos con hipogonadismo hipogonadotrópico pues en esta etapa de desarrollo no es posible excluir este diagnóstico; las muestras de estos sujetos no han sido analizadas por el momento. En el grupo de los púberes, así como en los demás descritos a continuación se presentarán los resultados de todos los pacientes estudiados.

El tercer grupo, incluyó a dos sujetos en estadio T-G4 y a 4 adultos normales (T-G5). Las edades cronológicas de estos sujetos oscilaban entre los 16 y los 33 años (Tabla 1); los niveles hormonales basales, se encontraron dentro de los límites de los valores de referencia para sujetos con esa edad y sexo (Tabla 2). Cinco de estos sujetos fueron voluntarios sin alteraciones físicas. El otro sujeto había sido estudiado desde 6 años atrás por presentar talla baja constitucional. Conjuntamente con la normalidad en sus niveles hormonales, estos sujetos presentaban cuentas espermáticas sin alteraciones y no tenían

historia de criptorquidia. Además, en 3 de ellos existía fertilidad comprobada. El interrogatorio clínico, así como el examen físico completo practicado a estos sujetos no reveló ningún tipo de patología existente.

El último grupo se encontraba constituido por 5 pacientes quienes habían ingresado a la Unidad Metabólica Pediátrica habiéndose establecido después de su estudio, el diagnóstico de hipogonadismo hipogonadotrópico (HH). Estos individuos tenían entre 20 y 27 años de edad (Tabla 1); sus determinaciones hormonales basales mostraban niveles disminuidos tanto de LH (valores de referencia para adultos= 3-12 mUI/ml), FSH (valores de referencia para adultos=1-5 mUI/ml) y testosterona (valores de referencia para adultos=3.7-9.5 ng/ml) (Tabla 2). Como se puede apreciar, el sujeto número 24 presentaba niveles normales de gonadotropinas, mas sus niveles de testosterona eran muy bajos. Este fenómeno ha sido ampliamente reportado en la literatura en el eunucoidismo hipogonadotrópico (94). También en este grupo de pacientes se descartó mediante examen físico y de laboratorio y gabinete cualquier otro tipo de patología endócrina. Además, estos sujetos contaban con prueba de estimulación testicular con gonadotropina coriónica humana la cual había demostrado una adecuada respuesta testicular en la producción de testosterona. Por otro

lado, ninguno de los pacientes estudiados había recibido medicación hormonal por lo menos 3 meses antes de haberse practicado el estudio. Es importante señalar que los pacientes con HH fueron incluidos en el estudio como controles de los niños prepúberes y púberes tempranos, tomando en consideración que su imposibilidad de sintetizar y/o secretar LRH descartaría cualquier posibilidad de que presentasen respuesta a la administración de naloxona en términos de secreción de LH (82,83).

Para la realización de este proyecto de investigación se obtuvo la aprobación del Comité de Ética para el Estudio en Humanos del propio Instituto.

PROTOCOLOS DE ESTUDIO:

En ambos protocolos de investigación, descritos a continuación todos los pacientes fueron estudiados en la Unidad Metabólica Pediátrica del Instituto, iniciándose estos estudios a las 08:00 hrs. Los sujetos permanecieron en decúbito dorsal durante todo el estudio y llevando a cabo sus actividades cotidianas posteriormente. A lo largo del estudio, se les determinaban signos vitales cada hora, así como cada 5 minutos durante la media hora previa a la administración de la naloxona y a lo largo de los 90 minutos posteriores a la administración del fármaco.

PROTOCOLO 1:

Dentro de este protocolo fueron incluidos tanto los sujetos prepúberes como aquellos pacientes con HH. Debido a que estudios previos han demostrado que los niños prepúberes no responden al bloqueo de los receptores opioides aún después de haber sido impregnados con LRH exógena (84) y tomando en consideración que los esteroides sexuales desempeñan un papel permisivo para la expresión de la actividad opioide endógena (79-81), se decidió impregnar a ambos grupos de sujetos tanto con LRH como con estradiol exógeno durante los días previos a la administración de la naloxona (Tabla 3). De los días 1 al 4 del estudio, cada sujeto recibió a las 08:00 hrs., 200 µg de LRH (Hoechst AG, Frankfurt, Alemania Federal) por vía subcutánea. Se tomaron muestras sanguíneas (3.5 mls.) de la vena antecubital para la determinación de LH a los tiempos descritos en la tabla 3; en la primera muestra basal, se tomaron 7 mls. con el fin de cuantificar además de LH, FSH, testosterona y estradiol. A lo largo de éstos días a cada sujeto se le administraron 12.5 µg. de etinil estradiol por vía oral tanto a las 08:00 como a las 20:00 hrs.

En el quinto día también se administró el etinilestradiol, suspendiéndose la administración de LRH subcutáneo. En ese día se administró una infusión de 4 horas contien

TABLA 3

PROTOCOLO 1

DIA	TIEMPO DE INICIO	PROCESO EXPERIMENTAL	FRECUENCIA DE MUESTREO
1	08:00 h	200 μ g LRH sc + etinil estradiol 12.5 μ g c/12 h	En -15,0,120 y 135 min.
2	08:00 h	Igual al día 1	Igual al día 1
3	08:00 h	Igual al día 1	Igual al día 1
4	08:00 h	Igual al día 1	Igual al día 1
5	08:00 h	LRH IV infusión (25 μ g.h. 4h) etinil estradiol 12.5 μ g c/12 h.	Dos muestras basales en -15 y 0 min. y cada 15-30 min. durante la infusión
6	08:00 h	Muestras sanguíneas basales NAL IV infusión (20 mg en 10 min) 100 μ g LRH IV bolo	Cada 10 min. por 1.5 h Cada 10 min. por 1.5 h Cada 15-30 min. por 2.0 h

Protocolo experimental llevado a cabo en sujetos T-G1 y en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico.

do 100 μ g de LRH disueltos en 400 mls de solución salina al 0.9% mediante la utilización de una bomba de infusión continua. La respuesta fue determinada tomando muestras sanguíneas cada 15 a 30 minutos (Tabla 3).

Finalmente al sexto día, posterior a la obtención de 10 muestras sanguíneas basales (cada 10 minutos), se infundieron por vía intravenosa 20 mgrs de clorhidrato de -naloxona (Narcanti; Endo de México, S.A., México) disueltos en 50 mls de solución salina, durante 10 minutos, cuantificándose la respuesta al fármaco cada 10 minutos durante 1.5 hrs (Tabla 3). Inmediatamente después de haber obtenido la última muestra (90 minutos después de la administración de la naloxona) se administró un bolo de 100 μ g de LRH i.v., cuantificándose los niveles de LH en suero a los tiempos señalados (Tabla 3). La infusión de solución salina sola como control el día antes de la administración del antagonista (ver protocolo 2), no fue realizada debido a que el gran número de muestras a obtener en este protocolo en particular, hubiese resultado excesivo para el peso y la edad de los niños prepúberes estudiados; además, estudios previos han demostrado que la pulsatilidad de gonadotropinas en este tipo de individuos es mínima por lo que la solución salina no modificaría los niveles de gonadotropinas en estos sujetos (84).

PROTOCOLO 2:

Todos los sujetos puberales (estadio T-G2 a T-G4), así como los adultos (T-G5) fueron incluidos en este protocolo llevado a cabo en dos días consecutivos. El primer día a las 08:00 hrs., se colectaron 10 muestras sanguíneas basales para determinar las concentraciones existentes de LH, extrayéndose para ello 3.5 mls de sangre en cada muestra; en la primera de éstas, se tomaron 7 mls con el fin de determinar además los niveles basales de FSH, testosterona y estradiol. El intervalo de muestreo fue cada 10 minutos (Tabla 4). Posteriormente, se infundieron 50 mls de solución salina al 0.9% i.v. tomándose muestras sanguíneas a lo largo de 1.5 hrs cada 10 minutos. Inmediatamente después de la colección de la última muestra post solución salina, se administró un bolo de 100 µg de LRH i.v. obteniéndose muestras sanguíneas cada 15 a 30 minutos durante 2 horas (Tabla 4).

El segundo día, se llevó a cabo el mismo protocolo de estudio que durante el primer día, salvo que en la solución salina se administraron disueltos 20 mgrs de clorhidrato de naloxona (Tabla 4).

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS:

Cada muestra sanguínea permaneció a temperatura ambiente durante 30 minutos con el fin de que se coagulase. Pos

TABLA 4

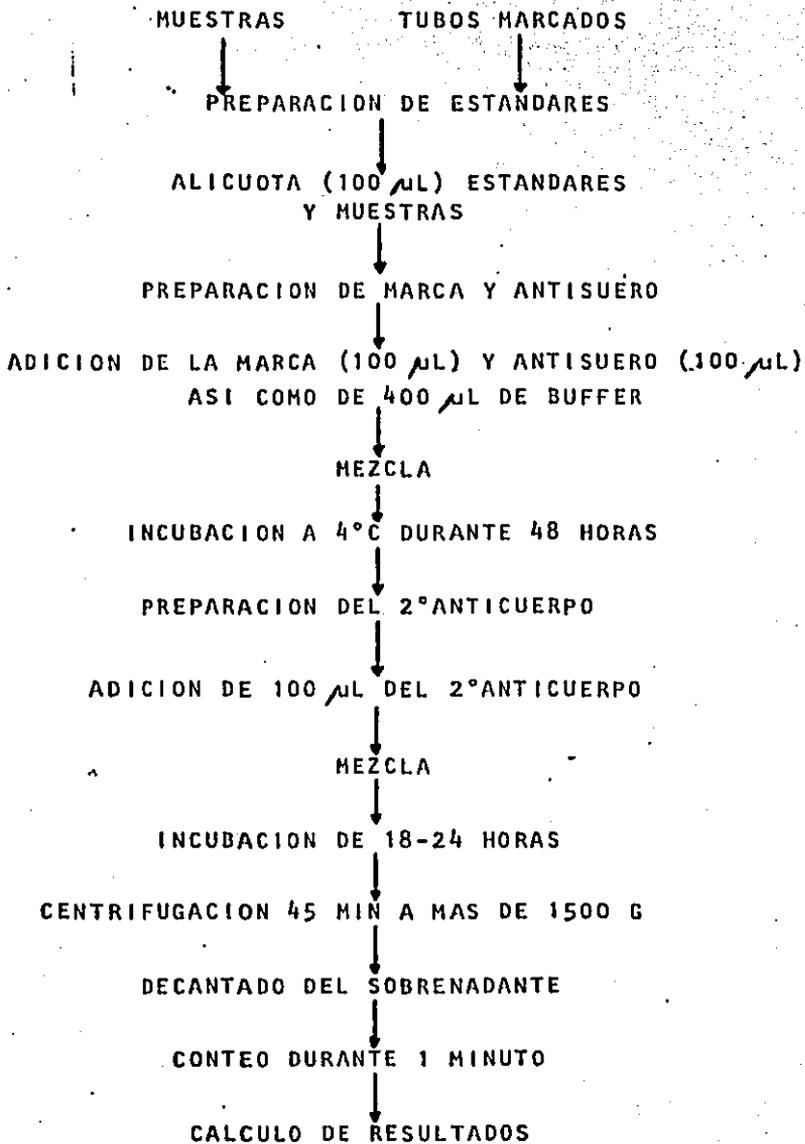
PROTOCOLO 2

DIA	TIEMPO DE INICIO	PROCESO EXPERIMENTAL	FRECUENCIA DE MUESTREO
1	08:00 h	Muestras sanguíneas basales Infusión solución salina (50 ml en 10 min). 100 µg LRH I.V. bolo	Cada 10 min por 1.5 h Cada 10 min por 1.5 h Cada 15-30 min. por 2.0 h
2	08:00 h	Muestras sanguíneas basales Infusión NAL I.V. (20 mg en 10 min). 100 µg LRH I.V. bolo	Cada 10 min. por 1.5 h Cada 10 min. por 1.5 h Cada 15-30 min. por 2.0 h

Protocolo experimental llevado a cabo en púberes (T-G2 a T-G4) y en adultos normales (T-G5).

teriormente, fueron centrifugadas a 1000 x g. El suero resultante fue congelado a -20°C hasta el día en el que fueron llevados a cabo los radioinmunoanálisis (RIA) de testosterona, estradiol, FSH y LH. La testosterona y el estradiol séricos fueron cuantificados por RIA posterior a su extracción. La hormona marcada de ambos esteroides fue adquirida de Amersham inc. (Los Angeles, CA, E.U.A.). El antisuero fue donado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través del Matched Reagent Program (Ginebra, Suiza). Hay que señalar que la reacción cruzada del anticuerpo de estradiol con estrona es de 1.7%. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 2.25% y 3.5% para testosterona y de 9.03% y 16.0% para estradiol respectivamente. La LH sérica fue cuantificada mediante RIA de doble anticuerpo siguiendo la metodología descrita por Sufi y colaboradores (95) la cual se encuentra resumida brevemente en la Figura 2. Todos los reactivos para este RIA fueron donados por el Matched Reagent Program de la OMS (Ginebra, Suiza). Los resultados se encuentran expresados en miliunidades internacionales por mililitro de acuerdo a la primera preparación de referencia internacional. Los coeficientes de variación intraensayo fueron de 4.9%, 6.8% y 7.7% para las concentraciones medias de 2, 10 y 35 miliunidades internacionales por mililitro. Con el fin de evitar que se presentasen variaciones interensayo, todas las mues

FIGURA 2



tras de un sujeto fueron analizadas en el mismo ensayo. La FSH, fue cuantificada utilizando el mismo tipo de metodología que la utilizada para el análisis de LH. Asimismo, todos los reactivos para este análisis fueron provistos por el Matched Reagent Program de la OMS (Ginebra, Suiza). Los coeficientes de variación intra e interensayo para esta hormona fueron de 7% y 10% respectivamente.

ANALISIS ESTADISTICO:

Se utilizó la prueba de T pareada de Student para comparar dentro de cada grupo de sujetos estudiados, las diferencias de las medias de las áreas bajo la curva de LH (aLH) entre los niveles basales de LH y las concentraciones post solución salina o post naloxona de LH. Asimismo, se utilizó esta misma prueba con el fin de analizar las diferencias entre las aLH obtenidas de los niveles de LH séricos después de la administración de LRH.

Las diferencias entre los grupos (respuesta de LH sérica a la inyección subcutánea de LRH y las aLH después de la administración de naloxona) fueron estudiadas por análisis de varianza de una vía, así como la prueba de comparación múltiple de Walker-Duncan cuando n fue mayor de 2 ó la T de Student no pareada cuando n fue igual a 2.

Se llevaron a cabo análisis de regresión y pruebas de T con el fin de determinar el grado de correlación exist

tente entre las concentraciones séricas de testosterona o estradiol y la magnitud de la respuesta de LH a la administración de la naloxona.

RESULTADOS

ADMINISTRACION DE NALOXONA:

La infusión de naloxona no produjo incrementos significativos en los niveles de LH sérica en los sujetos prepúberes, ni en los pacientes con hipogonadismo hipogonadotróprepúberes la media del aLH calculada de aquellas muestras obtenidas después de la administración de naloxona fue menor que la encontrada durante el muestreo basal (área bajo la curva obtenida 90 minutos antes de la naloxona), esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Contrastando con lo anterior, dos de los tres sujetos que se encontraban en el inicio de la pubertad (T-G2) (sujetos 5 y 6 tablas 1 y 2), así como todos los púberes (T-G2-3 a T-G4) y los adultos (T-G5) presentaron un incremento significativo en los niveles de LH posterior a la administración del antagonista opioide (Figuras 4 y 5). Por otro lado, no se observaron cambios significativos en los niveles de LH después de la administración de la solución salina de control. La tabla número 5 demuestra las medias de las aLH obtenidas en cada subgrupo antes y después de la administración de la naloxona o la solución salina. Pa

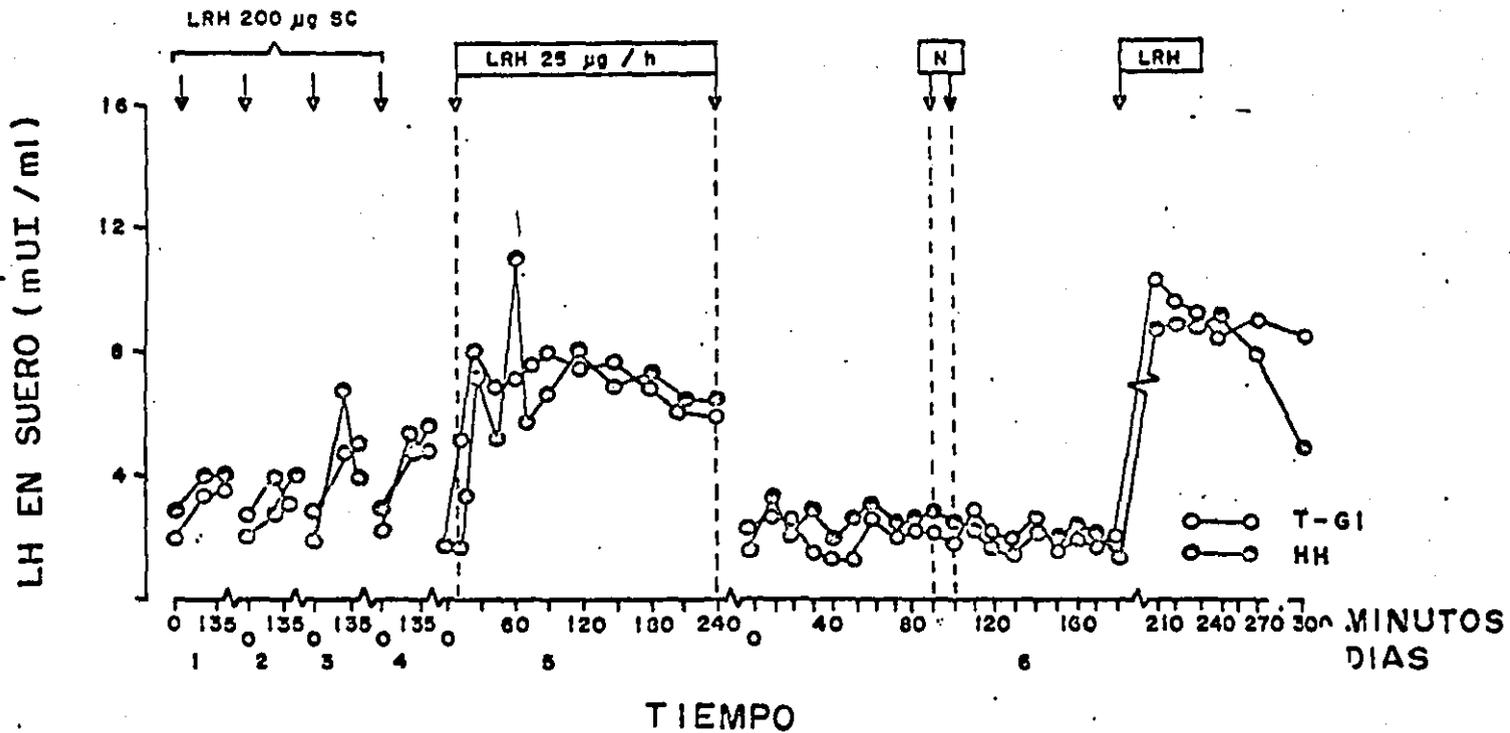


FIGURA 3.- Perfil sérico de LH en un sujeto T-G1 y en un paciente con hipogonadismo hipogonadotrópico, antes y después de la administración de naloxona (N), así como de LRH.

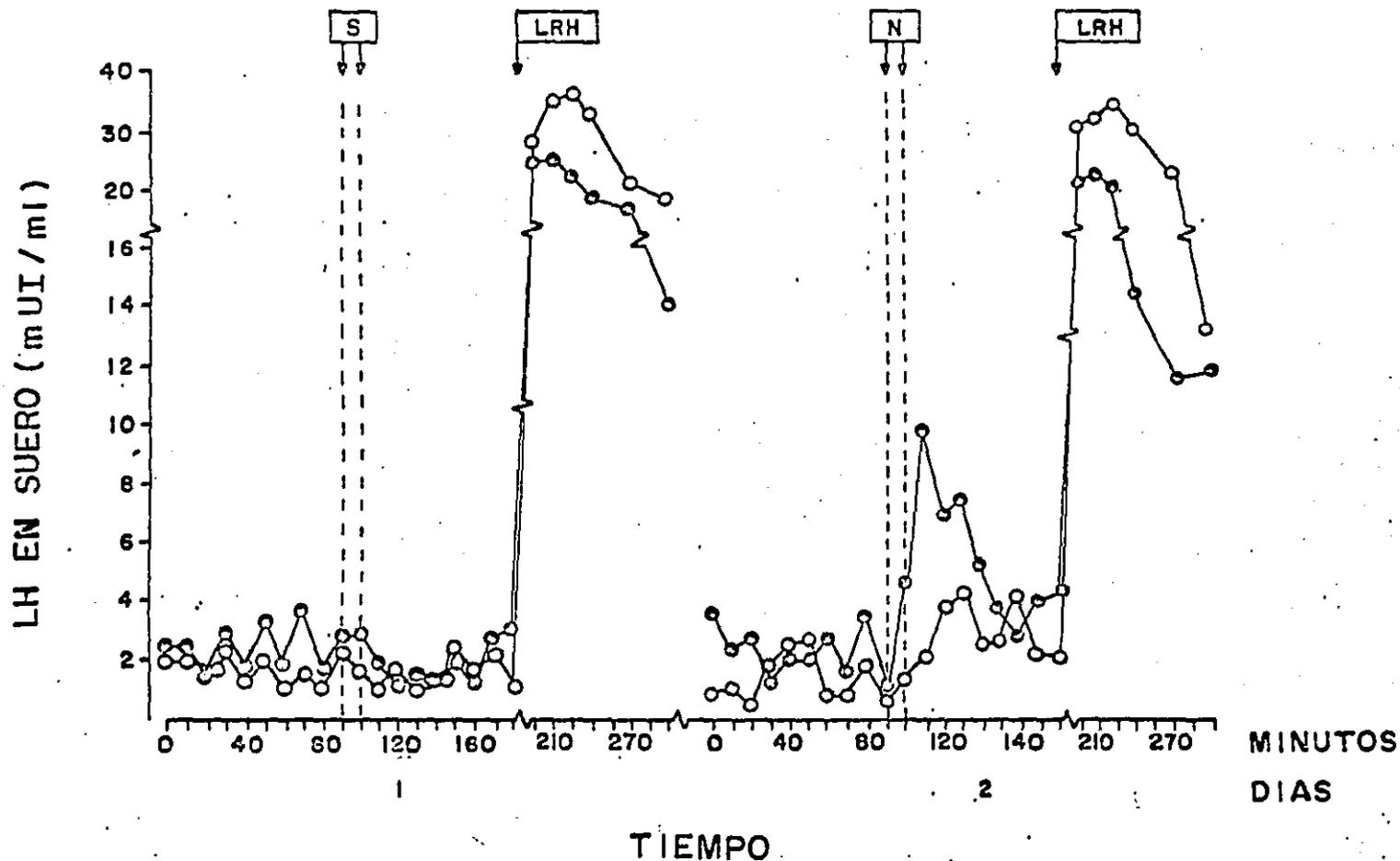


FIGURA 4.- Perfil sérico de LH en dos sujetos puberales (T-G2) que sí mostraron respuesta a naloxona (N). En la gráfica se aprecia la respuesta de LH antes y después de la administración de solución salina (S), naloxona y LRH.

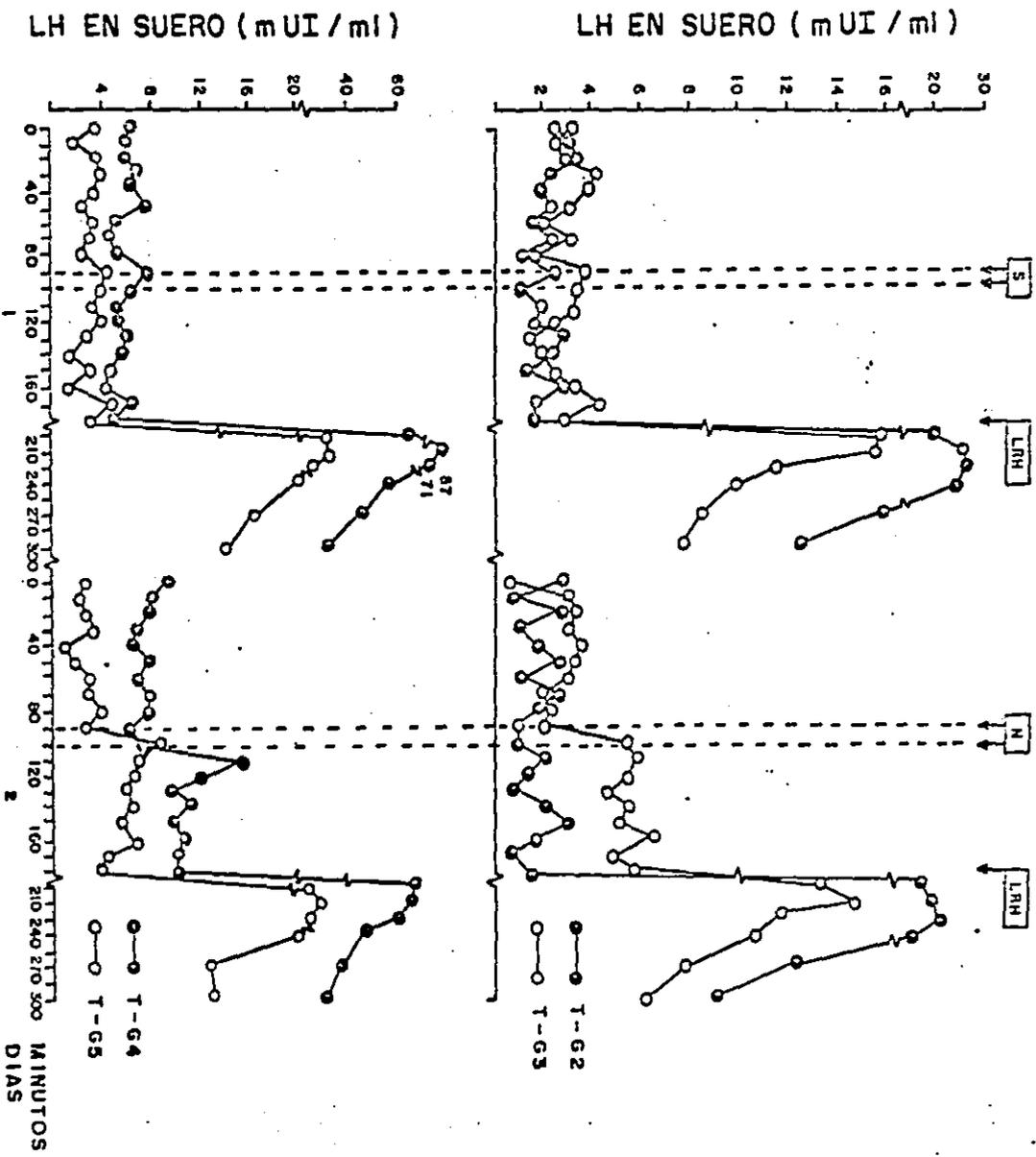


FIGURA 5.- En el panel superior se observa el perfil sérico de LH en el sujeto T62 que no respondió a naloxona y en un puber T-63, antes y después de la administración de solución salina (S), naloxona (N) y LHRH. En el panel inferior se muestra el patrón de respuesta de un puber T-64 y un adulto (T-65) ante los mismos estímulos.

TABLA 5

AREAS BAJO LA CURVA LH (.mUI.ml.min) DURANTE MUESTRAS
 BASALES, INFUSION CONTROL E INFUSION DE NALOXONA

Sujetos	Area bajo la curva					
	Basal ⁺	Salina ⁺⁺	P ^d	Basal ⁺	NAL ⁺⁺	P ^e
T-G1 (n=4)						
Media	-	-	-	124	107	NS
ESM				42	34	
T-G2 (n=3)						
(5) ^a	216	180	-	216	475	
(6)	154	157	-	123	245	
(7)	220	181	-	176	151	
T-G2-3 ^b y T-G3 (n=6)						
Media	249	190	NS	202	330	<0.05
ESM	46	24		27	41	
T-G4 ^c y T-G5 (n=6)						
Media	422	417	NS	432	687	<0.05
ESM	63	59		77	91	
H H (n=5)						
Media	-	-	-	188	151	NS
ESM				32	37	

^a Sujeto número 5

^c Valores asociados con T-G5

^e Valores basales vs NAL

^b Valores asociados con T-G3

^d Valores basales vs salina

+ aCLH calculada de las muestras obtenidas de 0 a 90 min. (Fig. 3, día 6 y Figs. 4 y 5, días 1 y 2).

++ aCLH calculada de las muestras obtenidas de 90 a 180 min. (Fig. 3, día 6 y Figs. 4 y 5, días 1 y 2).

ra propósitos comparativos los resultados obtenidos en los sujetos T-G2-3 fueron agrupados con aquellos encontrados en los sujetos T-G3; asimismo, los obtenidos en los púberes en estadio T-G4 fueron agrupados con aquellos de los adultos (T-G5). Debido a que el subgrupo de los niños que iniciaban la pubertad (T-G2) se encontraba representado solamente por 3 sujetos y dado que los resultados obtenidos no fueron homogéneos en cuanto a la respuesta a naloxona se refiere, se decidió analizar los resultados de cada sujeto en forma individual (Tabla 5).

A pesar de que todos los sujetos que respondieron a la naloxona presentaban niveles de testosterona sérica por arriba de 1 ng/ml (rango de 1.9 a 6.7 ng/ml), no se encontró ningún tipo de correlación entre las concentraciones individuales de testosterona y la magnitud de la respuesta a la naloxona (aCLH postnaloxona vs aCLH basal) ya que el coeficiente de correlación (r) fue de 0.34. Asimismo, tampoco se encontró correlación alguna entre los niveles de estradiol y la magnitud de la respuesta a la naloxona, siendo el coeficiente de correlación igual a 0.33. El nivel de significancia (p) en ambas correlaciones fue >0.1 .

Por otro lado observamos que la magnitud de la respuesta a la naloxona fue mayor en los sujetos T-G4-5 que en los niños en estadio T-G2-3 y T-G3 (T-G2-3 y T-G3=127±

27 (ESM); T-G4-5=253±28 mUI/ml/min), habiéndose encontrado un nivel de significancia <0.01.

ADMINISTRACION DE LRH:

En todos los sujetos prepuberales así como en los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico los niveles séricos de LH se incrementaron en respuesta a las inyecciones de LRH subcutáneo (Figura 3, Tabla 6). A pesar de que dos de los niños del grupo de prepúberes presentaron una disminución en la respuesta al LRH subcutáneo conforme transcurría el estudio (sujeto 2: aLH día 1=1111, día 4=332 mUI/ml; sujeto 4: aLH día 1=1758, día 4=1011 mUI/ml), las medias de las aLH obtenidas durante los días 1 a 4, no fueron estadísticamente diferentes una de la otra (Tabla 6). En ninguno de los pacientes con HH se detectó este tipo de respuesta.

La infusión de LRH durante el quinto día del estudio indujo una respuesta significativa de LH de tipo bifásico (Figura 3) aún en aquéllos dos niños que presentaron la disminución progresiva en las respuestas a la aplicación del LRH subcutáneo (sujetos 2 y 4). Este patrón bifásico de respuesta estuvo caracterizado por un pico inicial que apareció entre los 30 y 60 minutos, seguido éste por una liberación sostenida después de 90 minutos (Figura 3).

TABLA 6

RESPUESTA HIPOFISIARIA DE LH A LA ADMINISTRACION
EXOGENA DE LRH EN NIÑOS T-G1 Y PACIENTES CON HH.

Sujeto	Area bajo la curva de LH (mU).ml.min.)					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
T-G1 (n=4)						
(1) ^a	396	450	523	520	1662	1039
(2)	1111	857	608	332	1112	265
(3)	415	412	404	384	928	445
(4)	1758	1552	1191	1011	2250	1012
Media	920 ^b	818 ^b	682 ^b	562 ^b	1488	690
ESM	325	265	175	155	298	197
H H (n=4)						
(20)	390	347	653	785	2510	1656
(21)	110	267	385	385	2542	980
(22)	570	465	581	717	2250	1105
(23)	477	349	597	555	1584	937
Media	387 ^c	357 ^c	554 ^c	611 ^c	1984 ^d	1170 ^e
ESM	99	41	58	89	235	166
(24) ^f	1203	1170	1132	1154	3758	2212

^a Sujeto número 5

^d $p < 0.01$ vs sujetos T-G1

^b P NS entre grupos (F calculada=0.42, F tabulada=3.49)

^e $p < 0.05$ vs sujetos T-G1

^c P NS entre grupos (F calculada=2.69, F Tabulada=3.49)

^f No incluido para análisis estadístico (Ver texto)

Todos los sujetos en estadio T-G1 y los pacientes con HH, respondieron al bolo intravenoso de LRII administrado después de la naloxona en el sexto día del estudio (Figura 3, Tabla 6).

Es importante señalar que el paciente con hipogonadismo que presentaba niveles basales de gonadotropinas dentro de los límites de los valores de referencia, (sujeto 24, Tabla 2), presentó las mayores respuestas de LH al LRII exógeno, encontrándose un aLH dos veces mayor que aquella presentada por el resto de los pacientes con este padecimiento. Por esta razón, este paciente en particular no fue incluido en las comparaciones de grupo presentadas en la tabla número 6.

Todos los individuos puberales, así como todos los adultos mostraron respuestas significativas en términos de LH a la administración del LRII, tanto antes como después de la administración de la naloxona (Figuras 4 y 5). Sin embargo, dos de los tres púberes tempranos (T-G2), uno de los cuales sí respondió a la naloxona (sujeto número 5) así como todos los niños en estadio T-G2-3 y T-G3 exhibieron respuestas de LH discretamente atenuadas a la administración de LRII posterior a la naloxona en comparación con la respuesta obtenida después de la administración de LRII posterior a la infusión de solución salina (Tabla 7). El

TABLA 7

RESPUESTA A LRH

	Post Salina	Post Naloxona	P
Sujeto 5	2234	1822	< 0.05
Sujeto 7	2384	1845	< 0.01
$\bar{X}T-G_2-3;T-G_3$	1975 \pm 290*	1583 \pm 261*	< 0.05

Areas bajo la curva de LH: mUI/ml/min

*ESM

tercer sujeto en estadio T-G2 mostró respuestas similares de LH después de los dos retos de LRH (3200 y 2990 mUI/ml, antes y después de la administración de la naloxona respectivamente). Los sujetos que se encontraban en estadios puberales tardíos no presentaron diferencias significativas en la respuesta de LH a la administración de LRH antes o después de la infusión de naloxona (T-G4 y T-G5 \bar{X} acLH=3378 \pm 1115 (ESM) mUI/ml/min postsalina vs 3084 \pm 944 (ESM) mUI/ml/min post naloxona, P=NS).

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el desarrollo y/o la maduración del control opioide sobre la síntesis y secreción de LH se encuentra relacionado en tiempo con el advenimiento de la pubertad. Esto ya había sido sugerido previamente al analizar estudios llevados a cabo en ratas macho en las que solamente se observó respuesta de LH a la naloxona a partir del día 30 de vida, invocándose entonces como causa de la refractariedad al bloqueador opioide, la inmadurez del sistema hasta esa etapa del desarrollo (56).

En el presente trabajo se ha demostrado que la administración del antagonista opioide (naloxona) a aquellos niños que se encontraban en el inicio de la pubertad (estadios T-G2 y T-G2-G3) fue seguido de un incremento rápido y sostenido en las concentraciones de LH sérica. Este tipo de respuesta también fue observado en todos los sujetos que presentaban un mayor grado de desarrollo genital (T-G3 a T-G5). Por otro lado, en los niños prepúberes estudiados no se observó ningún cambio significativo en los niveles de LH sérica en respuesta a la administración de naloxona, sugiriendo que el sistema inhibitorio opioide hipotalámico se encuentra aún inactivo o que su influencia es muy redu

cida en esta etapa del desarrollo. Una observación de importancia fue el que un mismo sujeto sometido al estudio tanto en estadio T-G1 como en estadio T-G2 no presentó respuesta al antagonista opioide sino hasta el inicio de la pubertad, lo que demuestra que el tipo de respuesta al antagonista dependerá del grado de maduración y/o de desarrollo presente al momento del estudio. Este incremento de LM posterior a la administración de naloxona, exhibido por aquellos niños que se encontraban iniciando la pubertad, contrasta con los resultados reportados en estudios previos en los cuales los niños en los inicios del desarrollo puberal no respondieron a este tipo de fármacos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos estudios fueron llevados a cabo bien fuese con un diseño experimental diferente en relación con la administración de los antagonistas opioides (dosis, tiempo, o vía de administración) (82,84,85,96,97), número de púberes tempranos estudiados (96,97), o cantidad de muestras obtenidas antes o después de la administración del antagonista opioide (84,85).

El papel exacto que en el hombre ejercen los esteroides sexuales sobre la actividad opioide hipotalámica se encuentra todavía sin dilucidar. Lo que ha sido demostrado de manera consistente es que un medio rico en esteroi

des sexuales es indispensable para que se exprese la actividad opioide. Numerosas evidencias experimentales así lo sugieren: 1) El fracaso de los antagonistas opioides para inducir cambios significativos en la secreción de hormona luteinizante tanto en mujeres ooforectomizadas o postmeno

paúsicas puede ser revertido mediante la administración previa de estrógenos (79-81); 2) Mientras que en los monos ooforectomizados los niveles de B endorfinas en la sangre del sistema porta-hipofisiario son muy bajos o no detectables, en aquellos animales que han sido tratados previamente con estrógenos los niveles porta-hipofisarios del opioide endógeno se incrementan de manera importante, y si se administra progesterona concomitantemente con los estrógenos las concentraciones de la endorfina se incrementan todavía más (88); 3) Dependiendo de la fase del ciclo menstrual en la que se encuentren las voluntarias estudiadas, variará la respuesta a los antagonistas opioides pues se ha observado que ésta es mínima al inicio de la fase folicular y máxima en la fase lútea, correlacionándose directamente con los niveles basales de estradiol sérico (86). 4) Los niños prepúberes no presentan incrementos de LH sérica posterior a la administración de naloxona, mientras que los púberes y los adultos exhiben un incremento importante en sus niveles plasmáticos de LH en respuesta a los antagonistas opioides (67,84,96,97). Tomando en cuenta toda esta información

decidimos que en el presente trabajo se debería sensibilizar con esteroides sexuales exógenos la unidad hipotálamo hipofisiaria de los prepúberes. Para ello, se les administraron tanto LRH como etinil estradiol. Esto se llevó a cabo con el fin de investigar si la respuesta aguda a la administración de antagonistas opioides observada en aquellos niños que presentan una mayor maduración sexual (82,97), era dependiente de una exposición previa de las neuronas hipotalámicas sensibles a los opioides en un medio endócrino rico en estrógenos. Después de 4 días de sensibilización con los estrógenos exógenos, la hipófisis de estos niños prepúberes exhibió una respuesta bifásica significativa a la infusión de LRH, la cual fue similar a aquella reportada en mujeres normales durante la fase folicular del ciclo menstrual (98). En estas condiciones, la naloxona no indujo cambios significativos en los niveles séricos de LH, demostrándose entonces la falta de eficacia de los estrógenos exógenos ejercida sobre el hipotálamo para activar la función opioide inhibitoria administrados durante un periodo corto de tiempo. La posibilidad de que la administración de estradiol a los prepúberes por un periodo de tiempo mayor sea capaz de inducir una respuesta de LH a la administración de los antagonistas opioides, deberá ser motivo de investigaciones adicionales.

A pesar de que la respuesta de LH a la naloxona no presentó correlación ni con los niveles séricos de testosterona ni con los de estradiol en los sujetos estudiados, es importante señalar que todos aquellos que respondieron al fármaco tenían concentraciones de testosterona por arriba de 1 ng/ml. Estos hallazgos concuerdan con lo encontrado recientemente por Blank y colaboradores (99). Estos autores demostraron que aquellos chimpances machos que en condiciones basales presentaban niveles de testosterona menores a 1 ng/ml no mostraban incrementos significativos en los niveles séricos de LH en respuesta a la administración de naloxona. Dichos investigadores fueron también capaces de detectar incrementos importantes en los niveles de LH en los animales que ya se encontraban en la pubertad, fenómeno éste no encontrado en los prepúberes. Ahora bien, el que esta relación aparente entre los opioides endógenos y la testosterona se encuentre mediada por la testosterona per se o por uno de sus metabolitos reducidos en el anillo A (100,101), cuya acción es ejercida a través de los receptores para estrógenos o andrógenos (102), tendrá que ser aclarado.

A pesar de que en todos los púberes y en los adultos se obtuvieron respuestas evidentes en términos de LH al estímulo con LRH, ciertas diferencias entre las acl.H obtenidas pos

terior a la administración de solución salina y después de la administración de la naloxona, fueron detectadas en aquellos niños que se encontraban clasificados como púberes tempranos o intermedios. En estos grupos, la respuesta de LH al segundo bolo con LRH (post-naloxona) se encontró discretamente atenuada, al compararse con la presentada después del primer bolo de LRH (post-salina). Esta disminución en la respuesta hipofisiaria a una segunda inyección de LRH podría ser consecuencia de una capacidad limitada de la hipófisis puberal para sintetizar y/o secretar LH, como ha sido sugerido por Schneider y colaboradores (103), o bien pudiese encontrarse relacionada con un incremento en la susceptibilidad de la hipófisis en maduración, para regular decrecientemente el estímulo de LRH. Tanto el hallazgo de una respuesta disminuída de LH al bolo de LRH post-naloxona en un sujeto que no respondió al antagonista, como la ausencia de cualquier diferencia detectable entre las respuestas de LH al LRH exógeno en los sujetos en pubertad tardía y en los adultos (todos ellos habiendo presentado respuesta a la naloxona), excluye la posibilidad de un efecto de supresión directa a nivel hipofisiario por parte del antagonista opioide.

El papel que desempeñan en el humano los opioides endógenos sobre la regulación de gonadotropinas antes de la

pubertad, así como su posible relación con el inicio de ésta es aun motivo de discusión. A pesar de que hasta el momento se ha fracasado en cuanto a demostrar la presencia de cambios significativos en la secreción de LH posterior a la administración de antagonistas opioides en niños prepúberes, Mauras y colaboradores han observado recientemente (97) que en niños prepúberes sanos la pulsatilidad de LH sérica, así como los niveles medios de LH y las concentraciones de los picos absolutos de esta hormona, disminuyen en respuesta a la administración del antagonista opioide naltrexona. Basados en estos hallazgos, los autores formularon la hipótesis de que los efectos supresivos ejercidos por la naltrexona sobre la liberación de LH, pudiesen ser explicados por efectos agonistas opioides ejercidos por el antagonista, y propusieron que la pubertad en el hombre se acompaña de una sensibilidad hipotálmica disminuída hacia los efectos inhibitorios de los opioides endógenos. A pesar de que esta hipótesis es por demás interesante requerirá de confirmaciones posteriores.

Los resultados presentados en este trabajo, sugieren que los mecanismos reguladores opioides hipotalámicos permanecen inactivos en los prepúberes y no se tornan operativos, sino hasta el momento del inicio de la maduración sexual. Este fenómeno, ya ha sido observado en la rata macho por otros autores (104) quienes postulan la falta de acoplami

ento funcional entre el sistema opioide y las neuronas se-
cretoras de LRH durante la infancia.

El inicio de la actividad opioide inhibitoria durante la
pubertad temprana, pudiera estar reflejando un estadio más
avanzado de maduración hipotalámica así como el restable-
cimiento de un sistema biológico de control adicional, ac-
tivado por la acción de los esteroides gonadales. Una vez
presente, ambos sistemas (los opioides endógenos y los es-
teroides gonadales) acoplados funcionalmente, regulan la
secreción pulsátil de LRH y finalmente la intensidad de
la señal de LH hacia la gónada.

AGRADECIMIENTOS

La parte experimental de este estudio fue apoyada económicamente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México; la Fundación Rockefeller, Nueva York, E.U.A.; y el Programa Especial de Investigación, Desarrollo y Entrenamiento en Investigación de Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

El autor de la tesis ha sido becario del Programa Universitario de Investigación Clínica de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como residente en Investigación Clínica de la Secretaría de Salud.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Everett JW, Sawyer CH, Markee JE: A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. Endocrinology. 44: 234, 1949.
- 2) Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C: Biosynthesis and secretion of follicle - stimulating hormone. Endo. Rev. 4:179, 1983.
- 3) Odell WD: LH and FSH. En: De Groot L, Cahill GF, Odell WD, Martini L, Potts JT, Nelson DH, Steinberger E, Winegrad AI (Eds.), Endocrinology, Grine and Stratton, Nueva York, 1979, P. 149.
- 4) Eik-Nes KB: Biosynthesis and secretion of testicular steroids. En: Greep RO, Astwood EB (Eds.), Handbook of Physiology, American Physiology Society, Washington, 1975, P. 95.
- 5) Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Díaz-Sánchez V, Altamirano A, Pérez-Palacios G: Self-Priming effect of LH/hCG upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Plasma testosterone profile. J. Clin. Endocrinol. Metab. 61:926, 1985.

- 6) Setalo G, Vigh S, Schally A, Arimura A, Flerko B: LHRH Containing neural elements in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. 96:135,1975.
- 7) Kawano H, Daikoku S: Immunohistochemical demonstration of LHRH neurons and their pathways in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 32:179,1981.
- 8) Bergland RM, Page RB: Can the pituitary secrete directly to the brain? (Affirmative anatomical evidence). *Endocrinology*. 102:1325,1978.
- 9) Mc Cann SM, Taleisnik S, Friedman HM: LH releasing activity in hypothalamic extracts. *Soc. Exp. Biol. Med. Proc.* 104:432,1960.
- 10) Matsuo H, Baba Y, Mair RMB, Arimura A, Schally AV: Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. 1. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:1334,1971.
- 11) Schally A, Arimura A, Baba Y, Nair RMB, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L: Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:393,1971.
- 12) King JA, Millar RP: Heterogeneity of vertebrate luteinizing hormone - releasing hormone. *Science*. 206:67, 1979.

- 13) Dufau ML, Beitins IZ, Mc Arthur JW, Catt KJ: Effects of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) upon bioactive and immunoreactive serum LH levels in normal subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 43:658,1976.
- 14) Beitins IZ, Dufau ML, O'Loughlin K, Catt KJ, Mc Arthur JW: Analysis of biological and immunological activities in the two pools of LH released during constant infusion of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH.) in men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 45:605,1977.
- 15) Mc Cann SM, Mizunuma H, Samson WK: Differential hypothalamic control of FSH secretion. A Review. Psychoneuroendocrinology. 8:299,1983.
- 16) Wise PM, Rance N, Barr GD, Barraclough CA: Further evidence that luteinizing hormone-releasing hormone also is follicle-stimulating hormone-releasing hormone. Endocrinology. 104:940,1979.
- 17) Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchinson J, Plant T, Belchetz P, Knobil E: Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the Rhesus monkey. Endocrinology. 109:376,1981.
- 18) Soll AH, Kahn CR, Neville DM, Roth JJ: Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity. J. Clin.

- Invest. 56:769,1975.
- 19) Baxter JD, Funder JW: Hormone receptors. N.Eng. J. Med. 301:1149,1979.
 - 20) Catt KJ, Harwood JP, Aguilera G, Dufau ML: Hormonal regulation of peptide receptors and target cell response. Nature. 280:109,1979.
 - 21) Levine JE, Ramirez VD: Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy as estimated with push-pull cannulae. Endocrinology. 111:1439,1982.
 - 22) Sarkar D, Fink G: Luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk plasma from long-term ovariectomized rats: effects of steroids. J. Endocrinol. 86:511,1980.
 - 23) Kow LM, Pfaff D: Suprachiasmatic neurons in tissue slices from ovariectomized rats: electrophysiological and neuropharmacological characterization and the effects of estrogen treatment. Brain Res. 297:275,1984.
 - 24) Santen RJ, Bardin CW: Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis, clinical interpretation, and pathological mechanisms. J. Clin. Invest. 52:2617,1973.
 - 25) Naftolin F, Yen SSC, Perlman D, Tsai CC, Parker DC, Vargo T: Nocturnal patterns of serum gonadotropins - du

- ring the menstrual cycle, J. Clin. Endocrinol. Metab. 37:6, 1973.
- 26) Dufau ML, Veldhuis JD, Fraioli F, Johnson ML, Beitens IZ: Mode of secretion of bioactive luteinizing hormone in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 57:993, 1983.
- 27) Clarke IJ, Cummins JT: The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes Endocrinology. 111:1737, 1982.
- 28) Levine JE, Pau KYF, Ramirez VD, Jackson GL: Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. Endocrinology. 111:1449, 1982.
- 29) Conn PM, Hazum E : Luteinizing hormone release and gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor internalization: independent actions of GnRH. Endocrinology. 109:2040, 1981.
- 30) Clayton RN, Catt KJ: Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. Endocr. Rev. 2:186, 1981.
- 31) Crowley WR, O'Donohue TL, Wachlicht H, Jacobowitz DM:

Effects of estrogen and progesterone on plasma gonadotropins and on catecholamine levels and turnover in discrete brain regions of ovariectomized rats. Brain Res. 154:345,1978.

- 32) Palkovits M, Brownstein M, Saavedra JM, Axelrod J: Norepinephrine and dopamine content of hypothalamic nuclei of the rat. Brain Res. 77:137,1974.
- 33) Bottari S, Vokaer A, Kaivez E, Lescrainier J, Vauque lin G: Differential regulation of α -adrenergic receptor subclasses by gonadal steroids in human myometrium. J. Clin. Endocrinol. Metab. 57:937,1983.
- 34) Hruska RE, Silbergeld EK: Estrogen treatment enhances dopamine receptor sensitivity in the rat striatum. Eur. J. Pharm. 61:397,1980.
- 35) Kawakami M., Arita J: Involvement of the ventromedial part of the midbrain in the control of the proestrous surge of gonadotropins and prolactin in the rat. Neuroendocrinology. 30:337,1980.
- 36) Weick R: Acute effects of adrenergic receptor blocking drugs and neuroleptic agents on pulsatile discharges of luteinizing hormone in the ovariectomized rat. Neuroendocrinology. 26:108,1978.
- 37) Kinoshita F, Nakai Y, Katakami H, Kato Y, Imura H: Role of α -adrenergic mechanism in regulating tonic lutei

- nizing hormone release in conscious ovariectomized rats. *Endocrinology*. 108:1272, 1981.
- 38) Kalra SP, Gallo RV: Effects of intraventricular administration of catecholamines on luteinizing hormone release in morphine treated rats. *Endocrinology*. 113:23, 1983.
- 39) Mc Cann SM, Tex U: Control of anterior pituitary hormone release by brain peptides. *Neuroendocrinology*. 31: 355, 1980.
- 40) Hughes J, Smith TW, Koesterlitz HW, Fothergill LH, Morgan BA, Morris H: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*. 258:577, 1975.
- 41) Wilkes MM, Stewart RD, Bruni JF, Quingley ME, Yen SSC: A specific homologous radioimmunoassay from human B-endorphin: direct measurement in biological fluids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50:309, 1980.
- 42) Chang KJ, Cuatrecasas P: Multiple opiate receptors. *J. Biol. Chem.* 254:2610, 1979.
- 43) Sadove MS, Balagot RC, Shigeru H, Jobgen EA: Study of narcotic antagonist N-allyl-noroxymorphone. *J.A.M.A.* 183:666, 1963.
- 44) Naloxona, un antagonista de los opiáceos. *Drug. Ther.*

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Bull. (versión en español). 19:1,1981.

- 45) Azar I, Turndorf H: Severe hypertension and multiple atrial premature contractions following naloxone administration. Anesth. Anal. 58:524,1979.
- 46) Estilo A, Cottrell J: Naloxone, hypertension and ruptured cerebral aneurism. Anesthesiology. 54:352,1981.
- 47) Pallasch TJ, Gill CJ: Naloxone - associated morbidity and mortality. Oral Surg. 52:602,1981.
- 48) Jaffe JH, Martin WR: Opioid analgesics and antagonists. En: Goodman AG, Goodman LS, Gilman A (Eds.) The Pharmacological Basis of Therapeutics, Mac Millan Publishing Co, Nueva York, 1980, P. 522.
- 49) Cicero T, Schinker B, Meyer E: Endogenous opioids participate in the regulation of the H-H-luteinizing hormone axis and testosterone's negative feedback control of luteinizing hormone. Endocrinology. 104:1268,1979.
- 50) Sylvester P, Chen H, Meites J: Effects of morphine and naloxone on phasic release of LH and FSH. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 164:207,1980.
- 51) Cicero TJ, Wilcox CE, Bell RD, Meyer ER: Naloxone-induced increases in serum luteinizing hormone in the male: mechanisms of action. J. Pharmacol. Exp. Ther. 212:573,1980.

- 52) Wilkes H, Yen SSC: Augmentation by naloxone of efflux of LRF from superfused medial basal hypothalamus. *Life Sci.* 28:2355, 1981.
- 53) Kalra SP, Simpkins J: Evidence for noradrenergic mediation of opioid effects on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.* 109:776, 1981.
- 54) Kalra SP: Neural loci involved in naloxone, induced LH release: effects of a norepinephrine synthesis inhibitor. *Endocrinology.* 109:1805, 1981.
- 55) Ieri T, Chen HT, Meites J: Naloxone stimulation of LH release in prepubertal female rats; role of serotonergic system. *Life Sci.* 26:1269, 1980.
- 56) Ieri T, Chen HT, Meites J: Effects of morphine and naloxone on serum levels of LH and PRL in prepubertal male and female rats. *Neuroendocrinology.* 29:288, 1979.
- 57) Ieri T, Chen HT, Campbell GA, Meites J: Effects of naloxone and morphine on the proestrous surge of prolactin and gonadotropins in the rat. *Endocrinology.* 106:1568, 1980.
- 58) Ragavon V, Frantz A: Suppression of serum prolactin by naloxone but not by anti-B-endorphin antiserum in stressed and unstressed rats. *Life Sci.* 28:921, 1981.
- 59) Miki N, Sonntag WE, Forman LJ, Meites J: Suppression

- by naloxone of rise in plasma growth hormone and prolactin induced by suckling. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 168:330, 1981.
- 60) Eisenberg R: Effects of naloxone on plasma corticosterone in the opiate-naive rat. Life Sci. 26:935, 1980.
- 61) Lyman grover J: Naloxone has a direct effect on the adrenal cortex. Endocrinology. 109:1132, 1981.
- 62) Mendelson JH, Ellingboe J, Kuehnle JC, Nillo NK: Heroin and naltrexone effects on pituitary-gonadal hormones in man: interaction of steroid feedback effects, tolerance and supersensitivity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 214:503, 1980.
- 63) Delitala G, Devilla L, Di Biaso D: Dopamine inhibits the naloxone induced gonadotrophin rise in man. Clin. Endocrinol. 13:15, 1980.
- 64) Grossman A, Moulton PJA, Gaillard RC, Delitala G, Toff WD, Rees LH, Besser GM: The opioid control of LH and FSH release: effects of a met-enkephalin analogue and naloxone. Clin. Endocrinol. 14:41, 1981.
- 65) Ropert J, Quigley M, Yen SSC: Endogenous opiates modulate pulsatile luteinizing hormone release in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab. 52:583, 1981.
- 66) Moulton PJA, Grossman A, Evans JM, Rees LH, Besser GM:

- The effect of naloxone on pulsatile gonadotropin release in normal subjects. Clin. Endocrinol. 14:321, 1981.
- 67) Ellingboe J, Veldhuis JD, Mendelson JH, Kuchnle JC, Mello NK: Effect of endogenous opioid blockade on the amplitude and frequency of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 54:854,1982.
- 68) Delitala G, Devilla L, Arata L: Opiate receptors and anterior pituitary hormone secretion in man. Effect of naloxone infusion. Acta Endocrinol. 97:150,1981.
- 69) Blankstein F, Reyes FI, Winter JSD, Faiman C: Endorphins and the regulation of the human menstrual cycle. Clin. Endocrinol. 14:287,1981.
- 70) Delitala G, Devilla L, Musso R: On the role of dopamine receptors in the naloxone induced hormonal changes in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 56:181,1983.
- 71) Veldhuis JD, Rogol AD, Johnson ML: Endogenous opiates modulate the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. J. Clin. Invest. 72:2031,1983.
- 72) Rubin P, Swezey S, Blaschke T: Naloxone lowers plasma prolactin in man. Lancet. 1 (8126):1293,1979.

- 73) Huws D, Groom G; The effect of naloxone on psychotropic drug-induced prolactin, growth hormone and cortisol secretion. A preliminary report. *Pos. Med. J.* 56 (Suppl. 1):70, 1980.
- 74) Janouwsky D; Negative naloxone effects on serum prolactin. *Lancet.* 2(8090):637, 1978.
- 75) Mayer G, Wessel J, Kobberling J; Failure of naloxone to alter exercise-induced growth hormone and prolactin release in normal men. *Clin. Endocrinol.* 13:413, 1980.
- 76) Grossman A, Stubbs WA, Gaillard RC, Delitala G, Rees L H, Besser GM; Studies of the opiate control of prolactin, GH and FSH. *Clin. Endocrinol.* 14:381, 1981.
- 77) Volavka J, Cho D, Mallya A, Bauman J; Naloxone increases ACTH and cortisol level in man. *N. Eng. J. Med.* 300: 1056, 1979.
- 78) Blankstein J, Reyes FI, Winter JS, Faiman C; Effects of naloxone upon prolactin and cortisol in normal women. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 164:363, 1980.
- 79) Melis GB, Paoletti AM, Gambacciani M, Mais V, Fioretti P; Evidence that estrogens inhibit LH secretion through opioids in postmenopausal women using naloxone. *Neuroendocrinology.* 39:60, 1984.
- 80) Shoupe D, Montz F, Lobo RA; The effects of estrogen and

progesterin on endogenous opioid activity in oophorectomized women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 60: 178, 1985.

- 81) Petraglia F, Comitini G, D' Ambrogio G, Volpe A, Facchinetti F, Alessandrini G, Genazzani AR: Short term effects of ovariectomy: the opioid control of LH secretion in fertile, climacteric and postmenopausal women. J. Endocrinol. Invest. 8:325, 1985.
- 82) Veldhuis JD, Kulin HE, Warner BA, Santner SJ: Responsiveness of gonadotropin secretion to infusion of an opiate-receptor antagonist in hypogonadotropic individuals. J. Clin. Endocrinol. Metab. 55:649, 1982.
- 83) Maggi M, De Feo ML, Mannelli M, Delitala G, Forti G: Naloxone administration does not affect gonadotrophin secretion in male patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism. Acta Endocrinol. 109:153, 1985.
- 84) Fraioli F, Cappa M, Fabbri A, Gnassi L, Mortti C, Borrelli P, Isidori A: Lack of endogenous opioid inhibitory tone on LH secretion in early puberty. Clin. Endocrinol. 20:299, 1984.
- 85) Kulin HE: Opiate-mediated control of gonadotropins during puberty: the effect of naltrexone in children and adolescents. 67th Annual Meeting of The Endocrine Society, Baltimore MD, 1985 (Abstract 583).

- 86) Quigley ME, Yen SSC: The role of endogenous opiates on LH secretion during the menstrual cycle. J. Clin. Endocrinol. Metab. 51:179,1980.
- 87) Wehrenberg WB, Wardlaw SL, Franz AG, Ferin M: B-Endorphin in hypophyseal portal blood: variations throughout the menstrual cycle. Endocrinology. 111:879,1982.
- 88) Wardlaw SL, Wehrenberg WB, Ferin M, Antunes JL, Frantz AG: Effects of sex steroids on B -endorphin in hypophyseal portal blood. J. Clin. Endocrinol. Metab. 55:877, 1982.
- 89) Reiter EO, Grumbach MM: Neuroendocrine control mechanisms and the onset of puberty. Annu. Rev. Physiol. - 44:595,1982.
- 90) Grumbach MM, Roth JC, Kaplan SL, Kelch RP: Hypothalamic pituitary regulation of puberty in man: evidence and concepts derived from clinical research. En: Grumbach MM, Grave GD, Mayer FE (Eds) Control of the Onset of Puberty. John Wiley and Sons Inc, Nueva York, 1972, P. 115.
- 91) Bardin CW, Paulsen CA: The testes. En: Williams A (Ed.) Textbook of Endocrinology, W.B. Saunders and Co, Philadelphia, 1981, P.293.
- 92) Marshall WA, Tanner JM: Variations in the pattern of pubertal changes in boys. Arch. Dis. Child. 45:13,1970.

- 93) Styne D, Grumbach ML: Puberty in the male and female: its physiology and disorders. En: Yen SSC, Jaffe RB (Eds) Reproductive Endocrinology, Physiology, Pathophysiology and Clinical Management. WB Saunders, Philadelphia, 1979, P.591.
- 94) Santen RJ, Kulin HE: Hypogonadotropic hypogonadism and delayed puberty. En: Burger H, de Kretser D (Eds.) Comprehensive Endocrinology, Raven Press, Nueva York, 1981, P.329.
- 95) Sufi SB, Donaldson A, Jeffcoate SL: World Health Organization Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. Programme for the Provision of Matched Reagents for Radioimmunoassay of Hormones in Reproductive Physiology. Method Manual, Tenth Edition, WHO, Geneva, Switzerland, - 1986.
- 96) Sauder SE, Case GD, Hopwood NJ, Kelch RP, Marshall J C: The effects of opiate antagonism on gonadotropin secretion in children and in women with hypothalamic amenorrhea. Pediatric Res. 18:322,1984.
- 97) Mauras N, Veldhuis JD, Rogol AD: Role of endogenous opiates in pubertal maturation: opposing actions of naltrexone in prepubertal and late pubertal boys. J. Clin. Endocrinol. Metab. 62:1256,1986.
- 98) Wang CF, Lasley BL, Lein A, Yen SSC: The functional -

- changes of the pituitary gonadotrophs during the menstrual cycle. J. Clin. Endocrinol. Metab. 42:718, 1976.
- 99) Blank MS, Murphy JR, Strobert EA, Orkin J: Endogenous opiates and gonadotropin secretion in male chimpanzees between infancy and puberty. 68th Annual Meeting of The Endocrine Society, Anaheim CA, 1986 (Abstract 798).
- 100) Eckstein B, Ravid R: On the mechanism of the onset of puberty: identification and pattern of 5α -androstane-3 β , 17 β -diol and its 3α epimer in peripheral blood of immature female rats. Endocrinology. 94:224, 1974.
- 101) Moger H: Serum 5α -androstane- 3α , 17 β -diol, androsterone, and testosterone concentrations in the male rat. Influence of age and gonadotropin stimulation. Endocrinology. 100:1027, 1977.
- 102) Thiculant M-L, Bonie T, Jouan P: Ontogeny of 5α -androstane- 3β , 17 β -diol and 17 β -estradiol binding to cytoplasm and nuclei of the male rat pituitary. J. Endocrinol. 94:224, 1982.
- 103) Schneider J, Lee PA: Decreased LH response to the second of consecutive day luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) infusions among patients with constitutional delay of puberty: a phenomenon of pubertal maturation? Clin. Endocrinol. 12:467, 1980.

- 104) Valenca MM, Negro-Vilar A: Lack of a functional coupling between endogenous opiate systems and LHRH neurons during the infantile period in the male rat. Neuroendocrinol. Lett. 8:165, 1986.