

ACCION DE UN INHIBIDOR DE LOS OPIACEOS ENDOGENOS (NALOXONE), ADMINISTRADO DURANTE LA LACTACION, SOBRE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA EN LA RATA

ENDOGENOUS OPIOIDS INHIBITOR (NALOXONE),
ACTION GIVEN IT DURING THE LACTATION, OVER
THE RAT REPRODUCTIVE ACTIVITY

*Por L. Fernández Celadilla **
*C. Díez Monforte **
*M. Barberán Pelegrín ***
*J.A. Bascuas Asta ***
*M. Abad Gavin **

Palabras clave: Rata, Naloxone, Progesterona, Peso Corporal, Cuerpo lúteo.
Key words: Rat, Naloxone, Progesterone, Body weighth, corpus luteum.

SUMMARY

Given it following two different patterns, Naloxone action is studied over several reproduction parameters in the rat: Milk production (based on offspring body weight at the weaning moment), ovarian characteristics (number of corpus luteum and follicles) and Progesterone serum levels in the weaning. Likewis a litter ovarian structures study is made.

Significant differences in respect to milk production or to number Corpus luteum in relation to the control group were's noticed. Progesterone levels were significantly higher in those female groups treated with Naloxone. The number of follicle was higher in the control group.

Offspring ovaries showed lower activity in the group control.

RESUMEN

Se estudia la acción de Naloxone, administrado siguiendo dos pautas distintas, so-

* Unidad Docente de Reproducción y Obstetricia. Departamento de Patología Animal (Sanidad Animal). Facultad de Veterinaria de León.

** Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica. Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

bre diversos parámetros reproductivos en la rata: Producción láctea (basada en el peso corporal de las crías en el momento del destete), características ováricas (número de cuerpos lúteos y folículos) y niveles séricos de Progesterona en el destete. Asimismo se realiza un estudio de las estructuras ováricas de las crías.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción láctea o al número de Cuerpos lúteos en relación al Grupo Control. La concentración sérica de Progesterona fue significativamente superior en los grupos de hembras tratadas con Naloxone. El número de folículos fue más alto en el Grupo Control.

Los ovarios de las crías presentaron una actividad menor en el Grupo Control.

TABLA I
Peso corporal medio/camada (gr) y porcentaje de bajas en el momento del destete

GRUPO	HEMBRAS	MACHOS	BAJAS (%)
Control (n = 49)	56,94 ± 7,48	57,98 ± 7,82	0,58
Naloxone (n = 48)	54,75 ± 6,07	56,59 ± 6,43	2,67
Naloxone-5 (n = 48)	56,50 ± 7,45	58,70 ± 7,70	2,25

n: Número de camadas.

Grupo Control: Administración de solución salina a lo largo de la lactación.

Grupo Naloxone: Administración de Naloxone (0,2 mg/Kg) durante la lactación.

Grupo Naloxone-5: Administración de Naloxone (0,2 mg/Kg) los 5 últimos días de lactación.

TABLA II
Madres - Tasa de Progesterona y características ováricas en el momento del destete en los distintos lotes de ratas

GRUPO	PROGESTERONA (ng/ml)	N.º CUERPOS LUTEOS	N.º FOLICULOS DESARROLLO	N.º FOLICULOS MADUROS
Control n = 10	32,87 ± 10,34	9,00 ± 2,01	11,62 ± 1,73	4,25 ± 2,35
Naloxone n = 10	45,77 ± 7,82**	12,00 ± 2,02	6,35 ± 2,20**	2,64 ± 1,82*
Naloxone-5 n = 12	51,81 ± 10,01***	10,92 ± 2,10	5,41 ± 2,10**	3,00 ± 3,10

n: Número de muestras.

Grupo Naloxone (N): La administración del Naloxone se llevó a cabo durante toda la lactación.

Grupo Naloxone-5 (N-5): La administración del Naloxone se realizó durante los cinco últimos días de la lactación.

* P < 0,05 respecto al grupo control

** P < 0,01 respecto al grupo control

*** P < 0,001 respecto al grupo control

TABLA III

Hijas - Número de folículos en desarrollo y maduros en el momento del destete.

GRUPO	N.º FOLICULOS DESARROLLO	N.º FOLICULOS MADUROS
Control	21,50 ± 2,10	3,50 ± 0,30*
Naloxone	40,67 ± 3,50***	6,17 ± 0,90*
Naloxone-5	36,25 ± 5,60	19,00 ± 2,80**

Grupo Naloxone: Administración del Naloxone durante toda la lactación.

Grupo Naloxone-5: Administración del Naloxone durante los 5 últimos días de la lactación.

* P < 0,05 respecto al grupo control.

** P < 0,01 respecto al grupo control.

*** P < 0,001 respecto al grupo control.

†) P < 0,001 respecto al grupo Naloxone.

INTRODUCCION

La prolactina (PRL) es esencial para el mantenimiento de la lactación en la rata, constituyendo la succión el estímulo fundamental para su liberación^{10, 18}. Junto a esta hormona son liberadas Oxitocina (implicada en la eyección láctea), Hormona del crecimiento (GH), Hormona adrenocorticotropa (ACTH), etc.^{2, 34}, estando la hiperprolactinemia asociada a un efecto inhibitorio sobre la secreción de gonadotropinas, FSH y LH, con una reducción en la función gonadal en ratas y otras especies^{8, 16, 24, 28, 33}. Este patrón de respuesta hormonal es similar al producido por los péptidos opiáceos, lo que sugiere que éstos puedan participar en el comportamiento endocrino durante la succión, y por tanto, directa o indirectamente responsables de la disminución en la liberación de gonadotropinas observada durante la lactación, en todas las especies^{16, 17, 18, 21, 24, 27, 28}.

Las b-Endorfinas (uno de los opiáceos endógenos más potente), y cuya distribución en el organismo animal es muy amplia, son secretadas por el lóbulo medio hipofisario en unión de la Hormona melanotrópica y en el lóbulo anterior conjuntamente con la ACTH y b-lipotropina^{5, 14, 21}. Entre sus acciones, dentro de la esfera reproductiva, y puestas de manifiesto en gran número de trabajos, caben destacar la liberación de PRL e inhibición de la LH, vía hipotalámica^{7, 19, 21, 24, 25, 29, 31, 35}.

El Naloxone y Naltrexone, alcaloides que se unen a los receptores opiáceos para antagonizar la acción del agonista administrado o que se produce endógenamente³², pueden resultar efectivos en la supresión de la liberación de PRL (Prolactina) y estimulantes de la liberación de gonadotropinas, aunque los resultados hasta el momento son contradictorios y estrechamente relacionados con la especie y características endocrinas presentes en el momento de su administración^{15, 17, 22, 27, 32, 36, 37}.

En el presente trabajo, en el que se ha administrado Naloxone siguiendo dos pautas: A lo largo de la lactación y en los 5 últimos días de la misma, se persigue un doble objetivo:

1.º Por una parte, estudiar su acción sobre la producción láctea de la rata, basándose en el peso corporal de las crías en el momento de destete.

2.º Comprobar el efecto de este alcaloide sobre el nivel de ovulación, estudiando histológicamente el número de cuerpos lúteos y el de folículos, tamaño de los mismos, etc., así como la concentración de Progesterona de las ratas lactantes en el momento del destete. Asimismo se han estudiado las características ováricas de las crías en los distintos grupos.

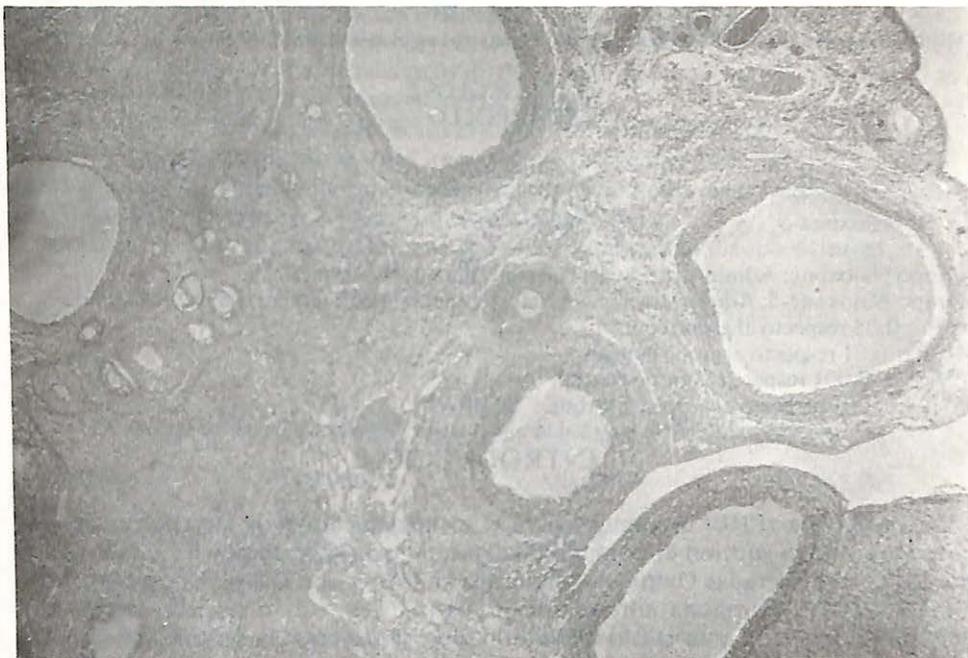


Foto 1.- Ovarios madres *Control*.

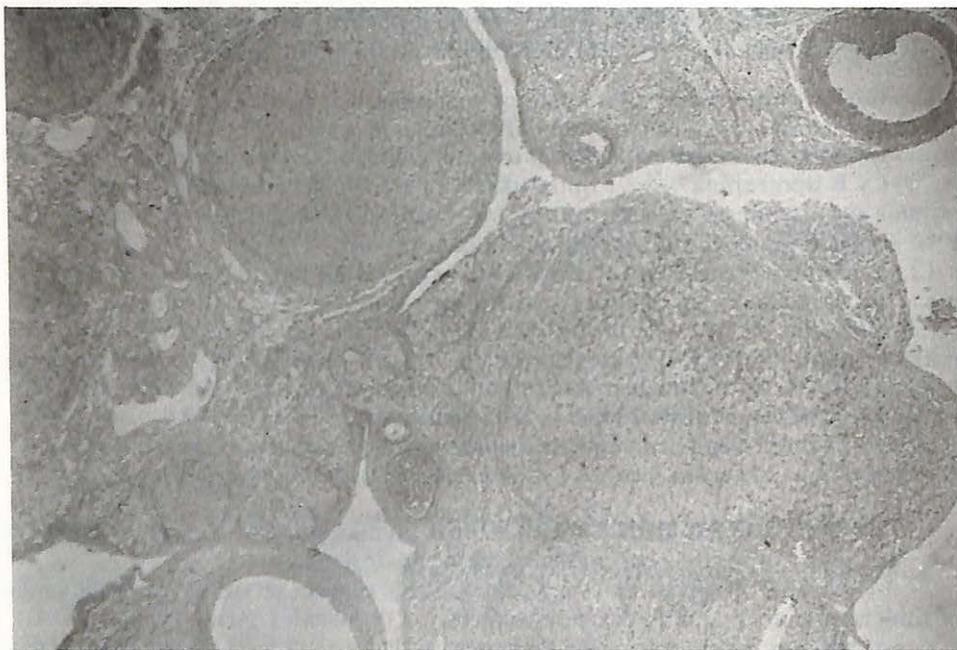


Foto 2.- Ovarios madres *Grupo N*. (Tratadas con Naloxone durante toda la lactación). Se observa un incremento significativo en el número de *foliculos en desarrollo y maduros* respecto al Grupo Control.

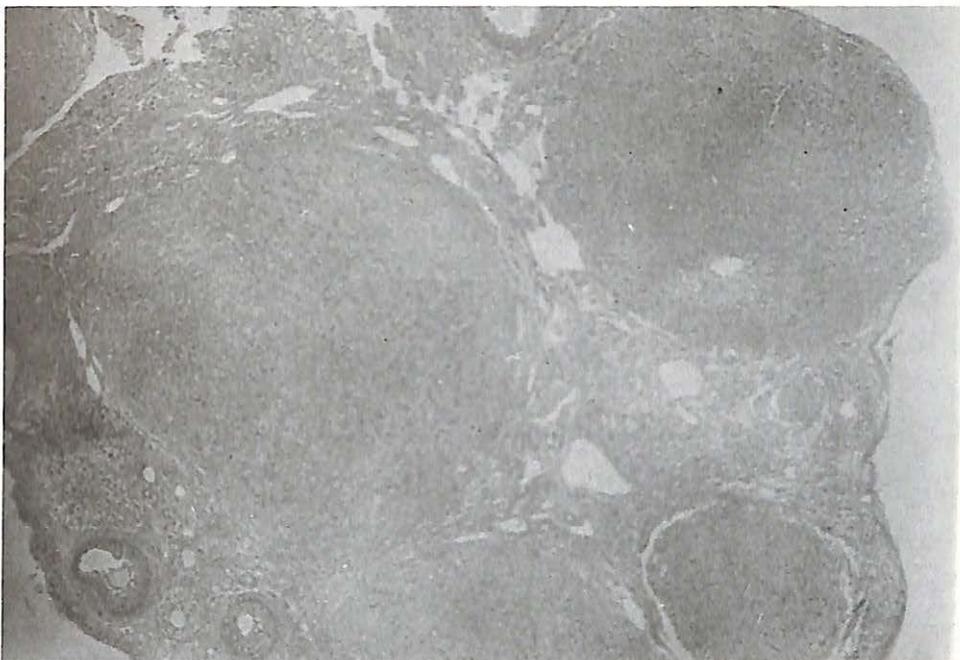


Foto 3.- Ovarios madres *Grupo N-5* (Tratadas con Naloxone durante los últimos 5 días de la lactación). Se aprecia un aumento significativo del número de *foliculos en desarrollo* respecto al Grupo Control.

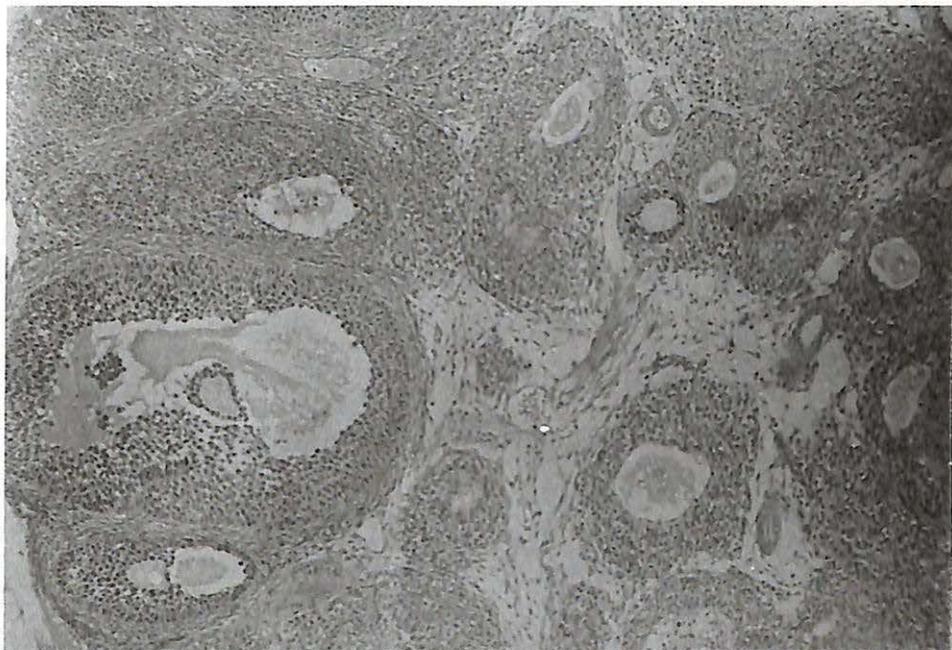


Foto 4.- Ovarios hijas *Control*.

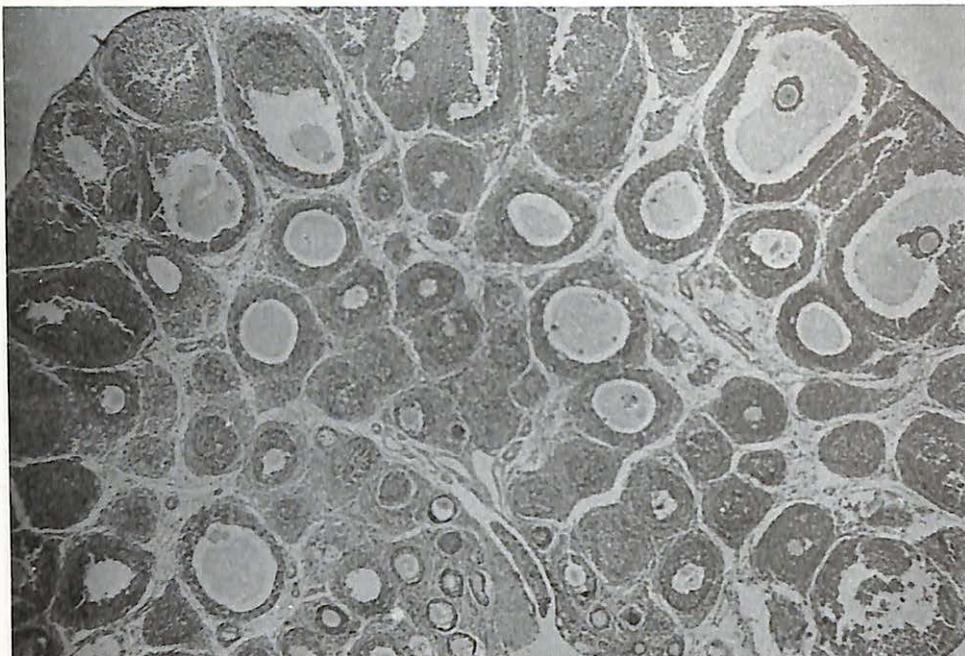


Foto 5.- Ovarios hijas Grupo N. Se observa un incremento del número de *foliculos en desarrollo y maduros*, significativo respecto al Grupo Control.

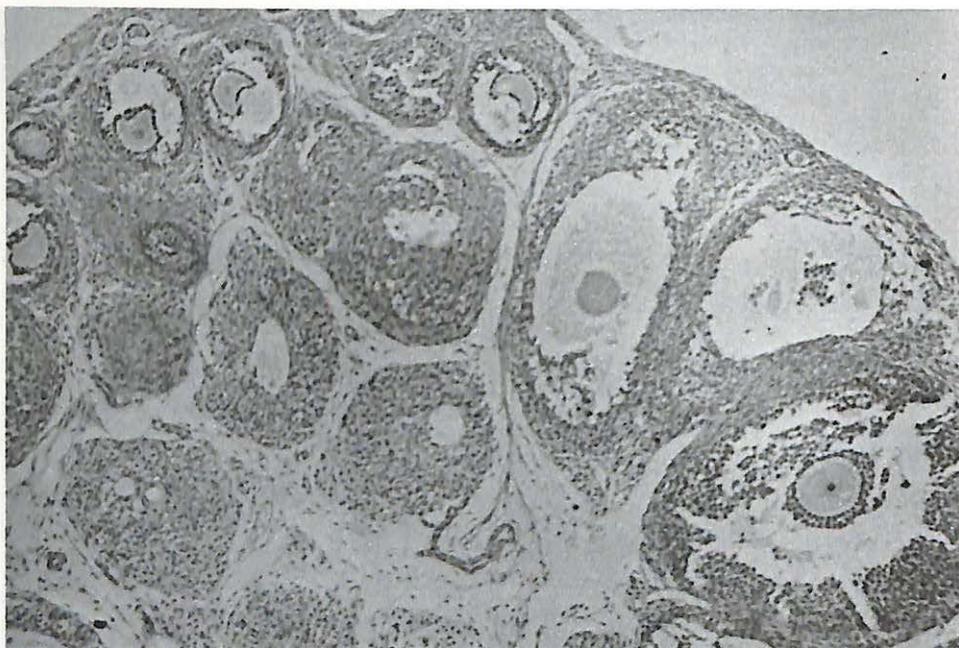


Foto 6.- Ovarios hijas Grupo N-5. Como se puede apreciar se ha producido un aumento significativo en el número de *foliculos maduros*, tanto respecto al Grupo Control como al Grupo N.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 139 ratas Wistar adultas, de 2.^a lactación, y sometidas a condiciones idénticas de alimentación, manejo, luz, humedad y temperatura.

El día del parto se formaban camadas uniformes de 7 crías/rata. El período de lactación se estableció en 21 días para todos los grupos, siendo pesadas las crías en ese momento.

Las madres e hijas que iban a ser utilizadas para el estudio histológico, eran sacrificadas el día del destete, extrayendo sangre de las madres cuyo suero era almacenado a -20°C , hasta el momento de su utilización para la determinación de Progesterona.

Se establecieron los siguientes grupos:

– Grupo Control: Formado por 49 camadas a cuyas madres se inyectó diariamente, a lo largo de la lactación, una solución salina.

– Grupo Naloxone: Constituido por 48 camadas y a cuyas madres se inyectó 0,05 mg/rata/día de Naloxone intraperitonealmente (correspondiente a una dosis de 0,2 mg/Kg)^{36, 37} a lo largo de toda la lactación.

– Grupo Naloxone-5: Formado por 48 camadas. Se administró Naloxone durante los 5 últimos días de lactación.

La Progesterona fue determinada por Radioinmunoanálisis.

Para el estudio histológico, todas las muestras (ovario izquierdo y derecho de cada uno de los animales), fueron fijadas en formol durante 24-48 horas, deshidratadas en alcohol etílico e incluidas en parafina. Los cortes (5-6 micras) fueron posteriormente teñidos con hematoxilina y eosina (H.E.) y Tricrómico de Gallego.

Sobre las secciones de los ovarios se realizó el recuento del número de folículos en desarrollo, folículos maduros, cuerpos lúteos y cuerpos albicans.

La comparación entre tratamientos, para todos los parámetros estudiados, fue llevada a cabo por medio de la T de Student.

RESULTADOS

El peso medio/camada en el momento del destete (tabla I) no experimentó diferencias significativas en los distintos grupos en estudio, incrementándose el porcentaje de bajas en los grupos experimentales con respecto al Control.

La concentración de Progesterona (tabla II) fue significativamente superior en los grupos tratados con Naloxone ($p < 0,01$ y $p < 0,001$) comparados con el Grupo Control, observándose, asimismo, un mayor número de cuerpos lúteos, pero sin presentar significación estadística.

En cuanto a las estructuras foliculares de las ratas madre (tabla II), el número de folículos en desarrollo se elevó significativamente en los Grupos Naloxone (administración a lo largo de la lactación) ($p < 0,01$) y Naloxone-5 (administración los últimos 5 días) ($p < 0,01$). En el número de folículos maduros, sólo se observó una elevación estadísticamente significativa ($p < 0,5$) en el Grupo Naloxone, con respecto al Control.

Únicamente dos ovarios pertenecientes al lote de madres control tenían un cuerpo albicans, mientras que no fue posible identificar ninguno en los dos grupos de animales tratados con Naloxone.

Las estructuras ováricas de las crías (tabla III), cuyas madres formaban los grupos de estudio, presentaban las siguientes características: El número medio de folículos en desarrollo era mucho más elevado en el Grupo Naloxone que en el Grupo Control (p

< 0,001). Las diferencias existentes entre el Grupo Naloxone-5 y Control no eran significativas.

El número medio de folículos maduros era mayor en los ovarios del Grupo Naloxone-5 ($p < 0,05$) y Naloxone ($p < 0,01$) que en Grupo Control. Asimismo se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre el Grupo Naloxone y Naloxone-5 ($p < 0,001$).

En ninguno de los 3 grupos de ovarios procedentes de hijas impúberes se observaron cuerpos lúteos, ni cuerpos albicans.

DISCUSION DE RESULTADOS

Las b-Endorfinas y demás péptidos opiáceos, parecen jugar un papel fundamental en la liberación de Prolactina (PRL) durante la lactación en las diferentes especies^{10, 11, 21, 24, 33, 34}. Igualmente y en respuesta a la succión pueden ser liberadas, como ante una gran variedad de estímulos estresantes, epinefrina, norepinefrina, ACTH, etc.^{1, 2, 3}. Es sabido, asimismo, que circunstancias estresantes pueden deprimir la función reproductora en ratas y otras especies^{19, 23, 29}, que no sería debido a los corticoides producidos, sino más bien a una acción directa de diversos opiáceos endógenos, como las b-Endorfinas que son liberadas conjuntamente con la ACTH (ambas derivadas del mismo precursor, la *Proopiomelanocortina*), vía activación del CRF, y que actuaría a nivel hipotalámico inhibiendo la liberación del GnRh (hormona liberadora de gonadotropinas), y consecuentemente de la LH^{5, 9, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 32}, a la vez que incrementarían la liberación de Prolactina y H. Somatotropa (GH)^{21, 26, 30}.

Además, estos péptidos participan en la regulación fisiológica de la oxitocina (responsable de la eyección láctea), modulando su liberación durante el parto^{4, 6, 31}, si bien su respuesta a la succión es menos clara¹².

El Naloxone, alcaloide inhibidor de los opiáceos por unión a sus receptores, ha demostrado incrementar la liberación de LH y FSH, reduciendo la secreción de PRL y GH^{13, 17, 22, 27, 32}. Por tanto, la administración de este alcaloide inhibiría la acción de las b-Endorfinas, de la PRL e incluso de la oxitocina, y como consecuencia el peso de las crías debería ser significativamente menor en los grupos tratados con Naloxone que en el Control. En el trabajo que presentamos, el peso es semejante en los distintos grupos, lo que parece indicar que el Naloxone, en las condiciones experimentales descritas, no deprime la liberación de PRL debido a cualquiera de las siguientes causas:

a) Que la inhibición sea tan rápida que no afecte significativamente a la producción láctea.

b) Que la dosis de Naloxone, utilizada en este trabajo, no sea lo suficientemente alta como para producir su acción inhibitoria específica. Así Riskind et al.,²¹ demostraron que el Naloxone, administrado a ratas lactantes en dosis de 1 mg/Kg de peso, no inhibía significativamente la liberación de b-Endorfinas durante la succión. Los mismos resultados consiguieron Gregg et al.,¹¹ con dosis de 1 mg/Kg y 0,05 mg/Kg en ovejas y vacas respectivamente, con concentraciones de PRL semejantes a los controles. Sin embargo, cuando la dosis administrada se incrementaba a 10 mg/Kg en ratas lactantes²⁴ y a 2,5 mg/Kg en cerdas¹⁷, se producía una reducción sustancial en la liberación de PRL e incremento de LHRH y LH.

c) Es un hecho conocido que las b-Endorfinas tienen una doble vía de secreción hipofisaria: Son secretadas del lóbulo medio junto con la -MSH y del anterior conjuntamente con la ACTH y b-lipotropina. Riskind et al., observaron que durante la succión en la rata, la liberación de b-Endorfinas procedentes del lóbulo anterior, podían

ser bloqueadas por Dexamatasona. Esta, sin embargo, no era capaz de inhibir la liberación de este opiáceo procedente del lóbulo medio. Si el Naloxone desarrolla idéntico papel está sin determinar, aunque no parece probable, dado que éste se fijaría a los receptores de las endorfinas e inhibiría la acción de las liberadas a ambos niveles hipofisarios.

En cuanto a la tasa de ovulación, determinada por los niveles de Progesterona y número de cuerpos lúteos, y que pueden considerarse indicativos de una ola preovulatoria previa de LH, ambos parámetros experimentaron un incremento en todas las hembras tratadas con Naloxone con respecto al Control (significativo en el caso de la Progesterona), sugiriendo una acción estimulante del Naloxone sobre la secreción de LH. Dado que el número de cuerpos lúteos no fue significativamente superior al encontrado en el Grupo Control, sería posible la formación de C.L. más activos (con una secreción de Progesterona más alta), tras el tratamiento con este alcaloide.

Por otro lado, el número de folículos (en desarrollo y maduros) en las hembras lactantes el día del destete, fue significativamente más elevado en el Grupo Control que en los restantes, en relación inversa al número de C.L., lo que podría indicar que el Naloxone incrementaba la liberación de GnRH y LH, incremento que se traduciría en una mayor tasa de ovulación y formación de cuerpos lúteos.

Sin embargo, las estructuras ováricas de las crías cuyas madres fueron sometidas al tratamiento con Naloxone, no siguen las mismas pautas: Tanto el número de folículos en desarrollo como maduros fue más elevado que en los controles, lo que hace suponer que el tratamiento con Naloxone en las madres, estimula el desarrollo folicular de las hijas, y lo que les conduciría a un adelanto de la pubertad. Es necesario señalar, en este sentido, el hecho de que el número de folículos maduros de las hijas, cuyas madres sólo fueron tratadas con Naloxone los 5 últimos días de lactación, fuera significativamente mayor que el observado en aquéllas a cuyas madres se les administró el alcaloide durante toda la lactación. Son necesarias, no obstante, más investigaciones para aclarar o confirmar alguna de las hipótesis expuestas.

BIBLIOGRAFIA

- 1) CLAPP, C.; MARTINEZ-ESCALERA, G.; MORALES, M.T.; SHYR, S.W.; GROSVENOR, C.E. y MENA, F. (1985). Release of catecholamines follows suckling or electrical stimulation of mammary nerve in lactating rats. *Endocrinology*, 117(6): 2.498-2.504.
- 2) CROWLEY, W.R.; SHYR, S.W.; KACSOH, B. y GROSVENOR, C.E. (1987). Evidence for stimulatory noradrenergic and inhibitory dopaminergic regulation of oxytocin release in the lactating rat. *Endocrinology*, 121(1), 14-20.
- 3) DANTZER, R. y NORMEDE, P. (1984). *El stress en la cría intensiva del ganado*. Ed. Acribia, Zaragoza, 116-135.
- 4) EHRENREICH, H.; ROSSE, M.; SHAMS, D.; HAMMER, I. y HERZ, A. (1985). An opioid antagonist stimulates myometrial activity in early postpartum cows. *Theriogenology*, 24 (2): 309-324.
- 5) EVANS, M.I.; BRETT, J.T. y DONALD, R.A. (1985). The effect of various corticotropin-releasing factor trains on the release of adrenocorticotropin b-endorphin and b-lipotropin from perfused ovine pituitary cells. *Endocrinology*, 117(3): 893-899.
- 6) FACCINETTI, F.; PARRINI, D.; PETRAGLIA, F.; CENTINI, C.; FACCHINI, V. y GENAZZANIA, A.R. (1981). Opioid plasma levels and uterine concentration during labour. *Acta Endocrinol* (97), Suppl. 243.
- 7) GABRIEL, S.M.; SIMPKINS, I.W. y KALRA, S.P. (1983). Modulation of endogenous opioid influence on luteinizing hormone secretion by Progesterone and estrogen. *Endocrinology*, 113 (5), 1.806-1.811.

- 8) GARCIA, A.; HERBON, L.; BARKAN, A.; PAPAVALSILIOV, S. y MARSHALLA, J.C. (1985). Hyperprolactinemia inhibits gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulation of the number of pituitary GnRH receptor *Endocrinology*, 117 (3), 954-959.
- 9) GINDONFF, P.R. y FERIN, M. (1987). Endogenous opioid peptides modulate the effect of Corticotropin-releasing factor on gonadotropin release in the primate. *Endocrinology*, 121 (3), 837-842.
- 10) GREEF, W.I.; WOOGT, J.L.; VISSER, T.J.; LAMBERTS, S.W. y VAN DER SCHOOT, P. (1987). Control of Prolactin release induced by suckling. *Endocrinology*, 121 (1), 316-322.
- 11) GREGG, D.W.; MOSS, G.E.; HUDGENS, R.E. y MALVEN, P.V. (1986). Endogenous opioid modulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in postpartum ewes and cows. *J. Anim. Sci.*, 63, 838-847.
- 12) HARTMAN, R.D.; ROSELLA-DAMPMAN, L.M. y SUMNY-LONG, I.Y. (1987). Endogenous opioid peptides inhibit oxytocin release in the lactating rat after dehydration and urethane. *Endocrinology*, 121, 2 is, 536-543.
- 13) HERVAS, F. (1985). Opiáceos Endógenos, *Neuroendocrinología. Aspectos Básicos y Clínicos*. Edit. Salvat, Madrid, 131-134.
- 14) MARGIORIS, A.V.; LIOTTA, A.S. y KRIEGER, D.T. (1983). Characterization of immunoreactive proopiomelanocortin related peptides in rat testes. *Endocrinology*, 113 (2), 663-671.
- 15) MALVEN, P.V.; BOSSUT, D.F.B. y DIEKMAN, A.F. (1984). Naloxone antagonism of an opioid mechanism inhibitory to LH release in luteal phase ewe. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. S.A.I. Urbana EE.UU.*, Vol. IV, 324-325.
- 16) MATTIOLI, M. y SEREN, E. (1985). Effects of bromocriptine treatment during lactational anoestrus in pigs. *Endocrine causes of seasonal and lactational anoestrus in farm animals*. Ed. Ellenderff and Elsaesser, Boston, 165-178.
- 17) MATTIOLI, M.; CONTE, F.; GALEATI, G. y SEREN, E. (1986). Effect of Naloxone on plasma concentrations of prolactin and LH in lactating sows. *J. Reprod. Fert.*, 76 (4), 167-173.
- 18) MURAY, I. y BEN-JONATHAN, N. (1987). Posterior pituitary lobectomy abolishes the suckling induced rise in prolactin (PRL): Evidence for a PRL-releasing factor in the posterior pituitary. *Endocrinology*, 121 (1): 205-211.
- 19) PETRAGLIA, F.; VALE, W. y RIVIER, C. (1986). Opioids act centrally stress induced decrease in luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology*, 119, (6): 2.445-2.450.
- 20) PETRAGLIA, F.; SUTTON, S.; VALE, W. y PLOTSKY, P. (1987). Corticotropin-releasing factor decreases plasma luteinizing hormone levels in female rats by inhibiting gonadotropin-releasing hormone release into hypophysial portal circulation. *Endocrinology*, 120 (3): 1.083-1.088.
- 21) RISKIND, P.N.; MILLARD, W.I. y MARTIN, I.B. (1984). Opiate modulation of the anterior-pituitary hormone response during suckling in the rat. *Endocrinology*, 114 (4): 1.232-1.237.
- 22) PIVA, F.; MAGGI, R.; ILIMONTA, P.; MOTTA, M. y MARTINI, L. (1985). Effect of naloxone on luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin secretion in the different phases of the estrous cycle. *Endocrinology*, 117 (2): 766-772.
- 23) RIVIER, C. y VALE, W. (1984). Influence of corticotropin-releasing factor on reproductive functions in the rat. *Endocrinology*, 114 (3): 914-921.
- 24) SARKAR, D.K. y YEN, S.S.C. (1985). Hyperprolactinemia decreases the luteinizing hormone-releasing hormone concentration in pituitary portal plasma: A possible role for b-Endorphin as a mediator. *Endocrinology*, 116 (5): 2.080-2.084.
- 25) SARKAR, D.K. y YEN, S.S.C. (1985). Changes in b-Endorphin like immunoreactivity in pituitary portal blood during the estrous cycle and after ovariectomy in rats. *Endocrinology*, 116 (5): 2.075-2.079.
- 26) SIRINATHSINCHII, D.I.I. y SUDLEY, A.R. (1981). Endogenous opioid peptides participate in the modulation of prolactin release in response to cervicovaginal stimulation in the female rat. *Endocrinology*, 117 (2): 549-556.
- 27) SIRINATHSINGHII, D.I.S. y MARTINI, L. (1984). Effects of bromocriptine and naloxone on plasma levels of PRL, LH y FSH during suckling in female rat: responses to gonadotrophin-releasing hormone. *J. Endocrinol.*, 100 (4): 175-182.
- 28) SMITH, M.S. (1982). Effect of pulsatile gonadotrophin-releasing hormone on the release of lu-

- teinizing hormone and follicle-stimulating hormone «in vitro» by anterior pituitaries from lactating and cycling rats. *Endocrinology*, 110 (2): 882-886.
- 29) SMITH, R.; OWENS, P.C.; LOVELOCK, M.; CHENG CHAN, E. y FALCONER, J. (1986). Acute hemorrhagic stress in conscious sheep elevates immunoreactive b-Endorphin in plasma but not in cerebrospinal fluid. *Endocrinology*, 118 (6): 2.572-2.576.
 - 30) SPIEGEL, K.; KOURIDES, I.A. y PASTERNAK, G.W. (1982). Prolactin and growth hormone release by morphine in the rat: Different receptor mechanism. *Science N.Y.*, 217 (5): 745-744.
 - 31) THOMAS, T.A.; FLETCHER, I.E. y HIU, R.G. (1982). Influence of medication, pain and progress in labour plasma b-Endorphin like immunoreactivity. *Brit.J. Anaesth.*, 54 (3): 401-408.
 - 32) VAN VUGT, D.A.; BAKST, G.; DYRENFURTH, I. y FERIN, M. (1983). Naloxone stimulation of luteinizing hormone secretion in the female monkey: Influence of endocrine and experimental conditions. *Endocrinology*, 113 (5): 1.858-1.864.
 - 33) VAN DE WIEL, A.F.M.; BOOMAN, P.; WILLEMESE, A.H. y BEVERS, M.M. (1985). Relevance of Prolactin to lactational and post-weaning anestrus in the pig. *Endocrine causes of seasonal and lactational anoestrus in farm animals*. Ed. Ellendorf and Elsaeses. Boston, 154-164.
 - 34) VOLOSCHIN, L.M. y TRAMEZZANI, J.H. (1984). Relationship of Prolactin release in lactating rats to milk ejection, sleep state, and ultrasonic vocalization by the pups. *Endocrinology*, 144 (2): 618-623.
 - 35) WARDLAW, S.L. y FRANTZ, A.G. (1983). Brain b-Endorphin during pregnancy, parturition and the postpartum period. *Endocrinology*, 113 (5): 1.664-1.668.
 - 36) WHISNAT, C.S.; KISER, T.E.; THOMPSON, F.N. y BARB, C.R. (1986). Influence of calf removal on the serum luteinizing hormone response to naloxone in the postpartum beef cow. *J. Anim. Sci.*, 63, 561-564.
 - 37) WHISNANT, C.S.; THOMPSON, F.N.; KISER, T.E. y BARB, C.R. (1986). Effect of Naloxone on serum luteinizing hormone, cortisol and Prolactin concentrations in anestrus beef cows. *J. Anim. Sci.*, 62, 1.340-1.345.