

ARTÍCULOS ORIGINALES



Efecto de la Naloxona sobre la secreción pulsátil de la hormona luteinizante en vacas de doble propósito con doble ordeño y amamantamiento.

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Jorge V Rosete-Fernández¹, MVZ, MC; Alejandro Villa-Godoy², MVZ, MSc, PhD;
Eugenio Villagómez-Amézcu-Manjarrez³, MVZ, MC, Dr.

¹Sitio Experimental Las Margaritas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, México;

²Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México; ³Centro Nacional de Investigación en Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, México.
rosetefer2000@yahoo.com.mx

(Recibido: 5 junio, 2006; aceptado: 5 febrero, 2007)

Resumen

Se examinó el efecto de cero, una y tres inyecciones de naloxona (NX; 500 mg) el día 30 posparto a intervalos de 1 h, sobre la liberación de la hormona luteinizante (LH), en vacas de doble propósito en anestro: $\frac{3}{4}$ Europeo x $\frac{1}{4}$ Cebú (n = 18). Las vacas pastorearon en zacate Estrella de África (*Cynodon plectostachyus*) y gramas nativas (*Axonopus* y *Paspalum* spp.) con un consumo de 5 kg de alimento balanceado diariamente (16 % de PC). El ordeño fue mecánico dos veces al día y se realizó amamantamiento de las crías después del ordeño (30 min). Las vacas y las crías permanecieron separadas, excepto durante el amamantamiento. Se colectó una muestra de sangre cada 2 días desde el parto hasta el día 30 posparto y se cuantificó la progesterona (P) sérica por RIA. El anestro fue indicado por $P < 1$ ng/ml. El día 30 posparto se tomaron muestras de sangre cada 15 min durante 3 horas: una hora después de cada inyección de NX o solución salina fisiológica y se cuantificó la LH sérica por RIA. Las variables de respuesta fueron: concentración media (MLH) y basal (BLH), número (NP), amplitud (AP) y duración (DP) de pulsos de LH. Se usó un ANDEVA con parcelas divididas, parcela mayor = tratamiento y subparcela = período de muestreo. No hubo efectos ($p > 0.05$) de tratamiento, período y sus interacciones en las variables de respuesta. En vacas de doble propósito con doble ordeño y amamantamiento, la naloxona no cambió la secreción de la LH en el día 30 posparto.

Palabras clave: anestro, LH, naloxona, vacas doble propósito.

Introducción

En la vaca, la secreción rítmica de GnRH y por lo tanto la frecuencia de pulsos de LH, se deprimen durante el período posparto y dicha depresión se presenta durante un período prolongado en vacas en amamantamiento en comparación con vacas en ordeño, esto implica que el amamantamiento sea responsable de la supresión de la secreción de

LH (19). Uno de los mecanismos por los cuales el amamantamiento inhibe la secreción de GnRH en la vaca, involucra a los péptidos opioides endógenos (4, 7, 14) y en distintos estudios se ha observado que el amamantamiento produce un incremento en la concentración de β -endorfinas en el hipotálamo y en el sistema porta hipotálamo-hipofisiario (8, 18, 21). Además, se ha observado que 48 horas después

del retiro de la cría, se presenta una disminución en la concentración de β -endorfina en el hipotálamo (18) y que los péptidos opioides reducen la frecuencia de secreción de GnRH (14, 15) y el ritmo de secreción de LH, característico del anestro en vacas que amamantan continuamente a su cría (24, 26). La aplicación de naloxona, un antagonista de los péptidos opioides, ha incrementado la liberación de LH en vacas productoras de carne con cría al pie (1, 9, 16), mediante un mecanismo neuroendocrino en el hipotálamo liberador del generador de pulsos de GnRH (1, 9); pero al eliminar el estímulo del amamantamiento, la aplicación de la naloxona pierde su capacidad para incrementar la concentración de LH (2, 3, 16). No obstante, en otros estudios se ha observado que en vacas donde el destete no aumenta la secreción de LH, la aplicación de la naloxona induce un incremento en la concentración sérica (6, 24). Lo anterior puede estar relacionado con el tiempo de aplicación de la naloxona, ya que durante el período posparto temprano, el número de sitios de unión detectados para la naloxona marcada con tritio en el hipotálamo es alto en vacas bajo el estímulo del amamantamiento (13, 15), observándose una disminución de los mismos entre el día 28 y el día 56 posparto (13). De tal manera, que se han requerido mayores dosis de naloxona para producir una respuesta en el día 14 en comparación con los días 28 y 42, lo que sugiere que la inhibición opioide es más potente en el período posparto temprano (17). Se han probado en vacas productoras de carne, diferentes frecuencias de aplicación de la naloxona vía endovenosa, induciendo en la mayoría de los casos un aumento en la concentración de LH (17, 26, 27). Sin embargo, en todos los estudios las inyecciones han sido a intervalos demasiado amplios (6 horas) como para poder generar pulsos de LH con una frecuencia cercana a un pulso por hora, como la que se requiere para inducir la primera ovulación (5, 20, 23). La generalidad de los estudios de la acción de la naloxona sobre el patrón de liberación de LH, han sido desarrollados en vacas sujetas exclusivamente al amamantamiento y no han sido comprobadas en vacas de doble propósito durante el anestro posparto, en las que se combinan los efectos del ordeño con el del amamantamiento.

El objetivo del presente estudio fue determinar: si una inyección de naloxona modifica la secreción de

LH durante las 3 horas siguientes a su aplicación y; si tres inyecciones de naloxona a intervalos de una hora modifican la secreción de la LH induciendo un pulso después de cada aplicación.

Materiales y métodos

Se utilizaron 18 vacas de doble propósito 3/4 *Bos taurus* x 1/4 *Bos indicus* (Suizo Americano, Holstein Friessian o Simmental Lechero x Cebú) que se distribuyeron aleatoriamente a tres tratamientos (seis vacas por tratamiento). Las vacas fueron de dos y cuatro partos y con involución uterina normal, clínicamente sanas, condición corporal entre 2.5 a 3.5 (1=emaciación, 5=obesidad) y en anestro hasta el día 30 posparto (concentración de progesterona sérica <1 ng/ml). Las vacas se mantuvieron en pastoreo rotacional, en gramas nativas (*Axonopus spp.* y *Paspalum spp.*) y zacate Estrella de África (*Cynodon plectostachyus*). Las vacas se ordeñaron mecánicamente dos veces al día (6:00 y 15:00h). Antes de cada ordeño se permitió que sus crías estimularan por amamantamiento la eyección de la leche. El ordeño se realizó en tres cuartos de la glándula mamaria en presencia de la cría. Una vez terminado el ordeño, las vacas permanecieron con sus crías por no más de 30 minutos, para permitir el amamantamiento y consumo de la leche del cuarto no ordeñado, más la leche residual de los cuartos restantes. Al terminar el amamantamiento, las vacas y crías fueron separadas, alojándose en potreros diferentes. A las vacas se les proporcionaron 2.5 kg de alimento balanceado con 16% de proteína cruda en cada ordeño y recibieron agua y sales minerales a libre disposición.

A partir del día siete u ocho y hasta el día 30 posparto, se tomaron muestras de sangre cada 48 h por punción de una vena yugular. A estas muestras se les determinó la concentración de progesterona sérica que se usó para confirmar la condición de anestro del día 7 al 30 posparto. Los tratamientos en el día 30 posparto fueron: Tratamiento 1 (1NX), aplicación de 500 mg de naloxona en 5 ml de solución salina (NX) por vía intramuscular (IM), seguida de dos inyecciones IM de 5 ml de solución salina (SS) a intervalos de una hora; Tratamiento 2 (3NX), aplicación de tres inyecciones IM de NX (500 mg cada una en 5 ml de SS) a intervalos de una hora;

Tratamiento 3 (ONX), aplicación de tres inyecciones IM de 5 ml de SS en forma y períodos idénticos a los de NX del tratamiento 2. El día 30 posparto a través de un catéter insertado en una vena yugular, se tomaron muestras sanguíneas cada 15 min, durante una hora después de cada inyección de NX o SS (tres períodos de una hora), para estudiar el efecto de la NX sobre la liberación de LH. Los períodos de muestreo se identificaron como: PNX1, durante la hora siguiente a la primera inyección de NX o SS, PNX2, durante la hora siguiente a la segunda inyección de NX o SS; y PNX3, durante la hora siguiente a la tercera inyección de NX o SS. Un mes antes de la fecha probable de parto, las vacas fueron entrenadas para mantenerlas tranquilas, alojadas y amarradas en un corral techado, sólo durante las tres horas que duró el muestreo intensivo de sangre y se les ofreció forraje verde y agua.

En el suero obtenido de las muestras se cuantificó la concentración de LH sérica, la progesterona sérica fue cuantificada en suero mediante un radioinmunoanálisis en fase líquida, validado previamente para suero bovino (12). La concentración de progesterona para los controles usados fue de 2.18 ± 0.38 ng/ml y los coeficientes de variación intra (n=2) e interensayo (n=16) fueron 9.9% y 14% respectivamente, con una sensibilidad de 0.17 ng/ml. La LH fue cuantificada usando un radioinmunoanálisis heterólogo de doble anticuerpo, desarrollado para LH bovina (2). La hormona utilizada como referencia en la curva patrón fue la USDA-bLH-B5 (AFP-5,500) y para la marcación con I^{125} se utilizó la USDA-bLH-I-1 (AFP-6000); el primer anticuerpo fue un suero de conejo anti LH ovina (CSU-204, producido por GD Niswender). Los coeficientes de variación para el control de calidad para LH (23.25 ± 1.66 ng/ml) intra (n=7) e interensayo (n=3) fueron 5.34 y 12.5 %, respectivamente. La sensibilidad por ensayo fue de 0.195 ng/ml. Para estimar los efectos de la NX sobre el patrón de liberación de LH se usaron las variables: Concentración media (ng/ml); Concentración basal (ng/ml); Frecuencia de pulsos (No./1 h); Amplitud de los pulsos (ng/ml); Duración de los pulsos (min); Concentración de pulso (ng/ml), las que se describieron de acuerdo con los siguientes criterios: 1) concentración media de LH, el promedio de las

concentraciones de todas las muestras colectadas dentro de cada tratamiento y período de muestreo, 2) concentración basal de LH, la concentración más baja (nadir) de las muestras colectadas dentro de cada tratamiento y período de muestreo, 3) pulso de LH, un incremento de la concentración de LH, igual o mayor a dos desviaciones estándar por arriba del nadir seguido por cuando menos de dos muestras descendentes dentro de tratamiento y período de muestreo, 4) frecuencia de pulsos, el número de pulsos contabilizados en 1 hora dentro de tratamiento y período de muestreo, 5) amplitud de pulso, la diferencia entre la concentración máxima (pico) de un pulso y la concentración nadir de LH dentro de tratamiento y período, 6) duración de pulso, el tiempo transcurrido en minutos entre el nadir previo y el nadir posterior a un pulso, 7) concentración de pulso, el promedio de las concentraciones de todos los picos dentro de tratamiento y el período de muestreo, 8) concentración basal de progesterona, promedio de las muestras colectadas los días 7 u 8 posparto de cada vaca, < 1.0 ng/ml y 9) anestro, definido por concentraciones de progesterona que no difirieron de la basal.

Análisis estadístico

La información fue examinada mediante análisis de varianza para diseños de parcelas divididas utilizando el Procedimiento Modelos Lineales Generales del Sistema de Análisis Estadístico (22). La parcela principal estuvo representada por el tratamiento: 1NX, 3NX y 0NX; las subparcelas por los períodos de muestreo: PNX1, PNX2 Y PNX3. Para analizar el efecto de la NX sobre el número de pulsos de LH donde no se presentó un pulso dentro del tratamiento ni del período, se consideró como cero para que el análisis estadístico hiciera las estimaciones de las medias de cuadrados mínimos por tratamientos, períodos de muestreo y su interacción. Para las variables concentración de pulso, amplitud y duración de pulso de LH sólo se consideraron los valores en los que sí se presentó un pulso de LH, pero el desbalance en el número de observaciones no permitió la estimación de las medias de

cuadrados mínimos, por lo que se estimaron las medias no ajustadas por tratamientos, períodos de muestreo y su interacción, con la finalidad de mostrar los valores de estas variables.

Resultados

Las vacas permanecieron en anestro desde el parto hasta el momento de aplicar los tratamientos de naloxona o solución salina fisiológica con concentración de progesterona sérica de 0.187 ± 0.096 ng/ml en los días 7 u 8 y se mantuvo baja hasta el día 30 posparto, con concentración de 0.174 ± 0.127 . El análisis de varianza que definió los cambios de liberación de LH para examinar el efecto de la naloxona durante los tres períodos de una hora donde

se aplicaron los tratamientos, mostraron que la NX no afectó los patrones de liberación de LH ($p > 0.05$) para número de pulsos, concentración promedio y basal de LH, por tratamiento, período de muestreo y la interacción de ambos. Además, no fue posible realizar el análisis de varianza para la concentración, la amplitud y la duración de los pulsos de LH, por existir períodos de muestreo en los que no hubo pulsos de LH.

Las medias de cuadrados mínimos para número de pulsos, concentración promedio y basal de LH se presentan en la tabla 1 y las medias aritméticas para la concentración, la amplitud y la duración de los pulsos de LH, se presentan en la tabla 2.

Tabla 1. Medias de cuadrados mínimos y errores estándar para número de pulsos, concentración promedio y basal de LH, durante el tratamiento con NX, en vacas de doble propósito.

	N	Pulsos (No./1h)	Concentración promedio (ng/ml)	Concentración basal (ng/ml)
Tratamiento¹				
1NX	18	0.33 ± 0.12	0.59 ± 0.04	0.43 ± 0.02
3NX	18	0.33 ± 0.12	0.43 ± 0.04	0.28 ± 0.02
0NX	18	0.27 ± 0.12	0.41 ± 0.04	0.28 ± 0.02
Período¹				
PNX1	18	0.33 ± 0.12	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.02
PNX2	18	0.27 ± 0.12	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.02
PNX3	18	0.33 ± 0.12	0.32 ± 0.04	0.33 ± 0.02

¹ 1NX, una inyección de naloxona (nx, 500 mg) + 2 de solución salina fisiológica (ss, 5 ml); 3NX, tres inyecciones de nx y 0NX, tres inyecciones de ss, en cada caso una inyección cada 60 min. PNX1, una hora después de la primera; PNX2, una hora después de la segunda; PNX3, una hora después de la tercera, inyección de nx o ss. No se detectaron diferencias ($p > 0.05$) en ningún efecto.

Tabla 2. Medias y desviaciones estándar para concentración, amplitud y duración de pulso de la LH, durante el tratamiento con NX, en vacas de doble propósito.

	N	Concentración de pulso (ng/ml)	Amplitud de pulso (ng/ml)	Duración de pulso (min)
Tratamiento¹				
1NX	6	1.13 ± 0.88	0.63 ± 0.48	45.0 ± 0.00
3NX	6	0.92 ± 0.79	0.65 ± 0.65	47.5 ± 11.29
0NX	5	0.83 ± 1.20	0.48 ± 0.68	45.0 ± 0.00
Período¹				
PNX1	6	0.96 ± 1.16	0.69 ± 0.77	47.0 ± 6.12
PNX2	5	0.98 ± 0.93	0.50 ± 0.51	45.0 ± 0.00
PNX3	6	0.97 ± 0.74	0.58 ± 0.47	45.0 ± 9.48

¹ 1NX, una inyección de naloxona (nx, 500 mg) + 2 de solución salina fisiológica (ss, 5 ml); 3NX, tres inyecciones de nx y 0NX, tres inyecciones de ss, en cada caso una inyección cada 60 min. PNX1, una hora después de la primera; PNX2, una hora después de la segunda; PNX3, una hora después de la tercera, inyección de nx o ss; C, concentración; PROM., promedio. No se detectaron diferencias ($p > 0.05$) para ningún efecto. N, número de observaciones que corresponden a los pulsos presentados dentro de tratamiento y período.

Discusión.

Como las vacas estuvieron en anestro el día 30 posparto, fue posible evaluar el efecto de la NX

sobre el patrón de liberación de LH. La información indicó que una o tres inyecciones de NX no tuvieron

efecto sobre las variables que describieron el patrón de secreción de LH, por lo tanto, la NX no indujo incremento en la cantidad secretada de LH. Otros autores encontraron que en vacas productoras de carne, cuyas crías permanecieron con ellas continuamente, respondieron a la NX con un incremento marcado de la secreción de LH sérica que se inició 15 minutos después de la administración del tratamiento y cuya duración fue de aproximadamente 60 minutos (24). Aunque dichos investigadores en esos y otros estudios (10, 19, 20) no analizaron el patrón pulsátil de LH, la interpretación de esos resultados es que la NX indujo en todas o la mayoría de las vacas, según el trabajo, un pulso de LH cuyo pico alcanzó una concentración entre 2.2 y 4.7 ng/ml en suero. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio, no se ajustan a las expectativas que se tenían en cuanto al tipo de respuesta de LH a la NX. En contra de lo observado en vacas con cría al pie, la NX no fue capaz de inducir aumentos de la concentración de LH sérica cuando se aplicó a vacas Angus cuya cría había sido destetada 48 horas antes (24). Los resultados del presente trabajo, indican que las vacas sometidas al control del amamantamiento se comportan de manera semejante a las destetadas con relación a su capacidad de respuesta a la naloxona, por lo menos en términos del comportamiento de LH sérica, en el que posiblemente el destete por sí mismo ocasiona que aumente la secreción de LH y entonces la naloxona no puede aumentar aún más dicha secreción. Esta interpretación es apoyada en lo observado por Arreguín *et al* (2), quienes al inyectar por vía intravenosa la NX a vacas productoras de carne sometidas a un control del amamantamiento similar al usado en el presente estudio, sólo fueron capaces de inducir un moderado incremento de la concentración promedio de LH sérica, el cual resultó diferente ($p < 0.01$) a los valores registrados en las vacas testigo.

La aplicación de la NX en este estudio no ocasionó cambios en el patrón pulsátil de liberación de LH, ni indujo incrementos semejantes a un pulso después de cada inyección. Los antecedentes existentes indican que inyecciones repetidas a intervalos de 12 horas en vacas productoras de carne sometidas al control del amamantamiento,

tampoco inducen la aparición de pulsos LH (2). Por el contrario, en vacas productoras de carne con cría al pie, dos inyecciones de NX aplicadas con dos horas de separación, fueron capaces de promover pulsos que alcanzaron picos de 3.6 ng/ml entre los 15 y 30 min después de su aplicación (17). También en vacas con cría al pie (27) se comprobó que la infusión intravenosa de NX en dosis de 50 mg/hora, durante 8 horas, causó un incremento del número de pulsos de LH (5 pulsos/8 horas) en comparación con vacas que recibieron solución salina (3 pulsos/8 horas). Considerando lo anterior, se puede sugerir que la falta de efecto a las inyecciones repetidas de NX observados en el presente estudio, se debió al control del amamantamiento al que se sometieron las vacas, como lo demostraron los trabajos donde se destetó 48 horas antes de la inyección de NX (24) y se restringió el amamantamiento a dos periodos al día (2) en los que la NX no fue capaz de causar incremento de la secreción de LH semejante a un pulso.

Por otro lado, en uno de los estudios se determinó que el incremento de la actividad pulsátil resultante de aplicaciones repetidas de NX, se produjo sólo cuando el tratamiento fue dado a los 28 y 42 días con dosis de 200, 400 y 800 mg, pero no si se administraba el día 14 posparto con el mismo esquema de dosis (17). Puesto que en el presente estudio los tratamientos se aplicaron el día 30 posparto, se fortalece la explicación a la ausencia de efectos sobre la pulsatilidad de LH, por el control del amamantamiento al que fueron sometidas las vacas. En el presente estudio como en el de Arreguín *et al* (2) al restringir el amamantamiento o bien eliminando totalmente dicho efecto como se ha realizado en otros estudios (14, 24), es posible que factores no considerados en estos estudios impidan que la NX ocasione cambios significativos en la liberación de LH durante el período posparto temprano. La falta de respuesta a la NX en las vacas sometidas a la restricción del amamantamiento, pudiera deberse a que el número de receptores para los péptidos opioides, a los cuales se une la NX en el hipotálamo se encuentre disminuido, ya que en vacas y borregas se ha observado en diferentes regiones del hipotálamo, que el número de receptores para la NX

marcada con trítio, es mayor bajo el estímulo crónico del amamantamiento, comparado con aquellas que se encuentran ciclando (13, 15, 25). Independientemente de los mecanismos que intervengan en la mediación de los efectos de la NX.

La información generada en el presente estudio y la de Arreguín *et al* (2), documenta que la NX no altera los patrones de liberación pulsátil de LH, en vacas de doble propósito y carne respectivamente, bajo condiciones de amamantamiento restringido en el período posparto temprano. Además, indican que los opioides endógenos quizás no son el

único mecanismo (10, 11) que gobierna el anestro posparto en vacas bajo el citado esquema de amamantamiento. Con relación a lo observado en vacas de doble propósito que recibieron solución salina fisiológica, cuando se aplicó NX una o tres veces en el día 30 posparto, no se indujeron aumentos en las concentraciones basal y promedio de LH sérica, ni hubo cambios en la frecuencia magnitud y duración de sus pulsos de liberación espontáneos. Por lo anterior se concluye que en vacas de doble propósito sometidas a control del amamantamiento, la NX no induce cambios en la secreción de LH sérica en el día 30 posparto.

Summary

Effect of Naloxone over the secretion of the Luteinizing Hormone on double purpose cows with double milking and suckling.

This study determined the effect of zero, one and three intramuscular injection of naloxone (NX, 500 mg) on 30 postpartum day for 1 hour intervals over the release of the luteinizing hormone in dual purpose cows in anestrus (3/4 Europe x 1/4 Zebu) cows (n =18). The cows grazed on African Star grass (Cynodon plectostachyus) and native grass (Axonopus and Paspalum spp) and ate daily 5 kg of balanced food (16% crude protein). The cows were mechanically milked twice a day and after that their calves were allowed to suck for 30 minutes. A blood sample was collected every two days, from the delivery until 30 days postpartum for the quantification of progesterone (P) by RIA. In this blood anestrus was indicated by P < 1 ng/ml. On day 30 postpartum blood samples were drawn every 15 min during 3 hours: one hour after each naloxone injection or saline solution and Luteinising Hormone (LH) was measured by RIA. The response variables were mean (MLH) and basal concentration (BLH), number (PN), amplitude (PA) and pulse duration (PD) of LH. The statistic analysis was divided plot; principal plot was the treatment and secondary plot was the samples period. There were not effects (p>0.05) of treatment, samples period and its interactions on response variables. In double purpose cows with double milking and suckling naloxona did not affect the LH secretion at 30 day postpartum.

Key Words: *anestrus, double purpose cows, LH, naloxone.*

Referencias

1. Armstrong JD, Britt JH, Cox NM. Seasonal differences in function of the hypothalamic-hypophyseal-ovarian axis in weaned primiparous sows. *J Reprod Fertil* 1986; 78:11-20.
2. Arreguín AA, Villa-Godoy A, Montaña-Bermúdez M, Villagómez-Amezcuca ME, Román-Ponce H, *et al*. Interacción de la naloxona con la progesterona y el estradiol durante el anestro posparto en las vacas cebú. *Téc Pecu Méx* 1995; 33:53-65.
3. Barb CR, Kraeling RR, Rampacek GB. Opioid modulation of gonadotropin and prolactin secretion in domestic farm animals. *Dom Anim Endocrinol* 1991; 91:15-27.
4. Britt JH, Armstrong JD, Cox NM, Esbenshade K. Involvement of opioids in regulation of LH secretion during lactational- or nutritional-induced anestrus in pig and cattle. In: N Parvizi editor. *Opioids in farm animals*. USA. 1993. p. 34-54.
5. Carruthers TD, Hafs H.D. Suckling at four-times daily milking: Influence on ovulation, estrus and serum luteinizing hormone, glucocorticoids and prolactin in postpartum Holsteins. *J Anim Sci* 1980; 50:919-925.
6. Cross JC, Rutter LM, Manns JC. Effect of progesterone and weaning on LH and FSH responses to naloxone in post-partum beef cows. *Dom Anim Endocrinol* 1987; 4:111-112.

7. Drouva SV, Epelbaum J, Tapia-Arancibia L, Lapante E, **Kordon C. Met-enkephalin inhibition of K-induced LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamic slices.** Eur J Pharm 1980; 61: 411-418.
8. Gordon K, Renfree MB, Short RV, Clarke IJ. Hypothalamo-pituitary portal blood concentrations of β -endorphin during suckling in the ewe. J Reprod Fertil 1987; 79: 397-408.
9. Gregg DW, Moss GE, Hudgens RE, Malven PV. Endogenous opioid modulation of luteinizing hormone secretion in the postpartum lactating sow. J Anim Sci 1986; 63: 838-847.
10. Guillemin R. Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. Starling Review. J Endocrinol 2005; 184:11-28.
11. Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon Gonadotropin Releasing Hormone Neurons. Review. Endocr Rev 1998; 19:302-330.
12. Jiménez KF, Galina SC, Ramírez B, Navarro-Fierro R. Comparative study of the concentration of peripheral progesterone before and after the PGF₂-alpha injection between Bos Taurus (Brown Swiss) and Bos indicus (Indobrasil) in the tropic. Anim Reprod Sci 1985; 9:333-340.
13. Malven PV, Hundgens RE. Naloxone-reversible inhibition of luteinizing hormone in postpartum ewes: Effects of suckling and season. J Anim Sci 1987; 65:196-202.
14. Malven PV, Parfet JR, Greg DW, Allrich RD, Moss GE. Relationships among concentrations of four opioid neuropeptides and luteinizing hormone releasing hormone in neural tissue of beef cows following early weaning. J Anim Sci 1986; 62:723-733.
15. Malven PV. **Inhibition of pituitary LH release resulting from endogenous opioid peptides.** Dom Anim Endocrinol 1986; 3:135-144.
16. Mattioli M, Conte F, Galeati N, Seren E. Effect of naloxone on plasma concentration of prolactin and LH in lactating sows. J Reprod Fertil 1986; 76:167-173.
17. Myers TR, Myers DA, Gregg DW, Moss G.E. Endogenous opioid suppression on release of luteinizing hormone during the suckling and postpartum anestrus beef cows. Dom Anim Endocrinol 1989; 6:183-190.
18. Okrasa S, Kalamarz H. Involvement of opioid system in the control of LH secretion in sows. Reprod Dom Anim 1996; 31:575-583.
19. Peters AR, Lamming GE, Fisher MW. A comparison of plasma LH concentration in milking and suckling postpartum cows. J Reprod Fertil 1981; 62:567-573.
20. Peters AR. Hormonal control of the bovine oestrus cycle. I. The neural cycle. British Vet J 1985; 141:564-575.
21. Riskind PN, Millard WJ, Martin JD. Opiated modulation of the anterior pituitary hormone response during suckling in the rat. Endocrinol 1984; 114:1232-1237.
22. SAS. SAS/SAT User's Guide (Release 6.03). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc.1988.
23. Short RE, Bellows RA, Staigmiller RE, Berardinelli JG, Custer EE. Physiological mechanisms controlling anestrus and fertility in postpartum beef cattle. J Anim Sci 1990; 68:799-816.
24. Whisnant CS, Kiser TE, Thompson FN, Barb CR. Influence of calf removal on the serum luteinizing hormone response to naloxone in the postpartum beef cows. J Anim Sci 1986a; 63 (Suppl 1):561.
25. Whisnant CS, Kiser TE, Thompson FN, Barb CR. Naloxone infusion increases pulsatile luteinizing hormone release in postpartum beef cows. Dom Anim Endocrinol 1986b; 3:49-54.
26. Whisnant CS, Kiser TE, Thompson FN, Barb CR. Opioid inhibition on luteinizing hormone secretion during the postpartum period in suckled beef cows. J Anim Sci 1986b; 63:1445-1448.
27. Whisnant CS, Thompson FN, Kiser TE, Barb CR. Effect of the naloxone on serum luteinizing hormone, cortisol and prolactin concentration in anestrus beef cows. J Anim Sci 1986d; 62:1340-1345.