

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Asociación entre
Estenosis Hipertrofica del Píloro en el Lactante
y Niveles Séricos Elevados de
Andrógenos, Estrógenos, Gonadotropinas y Prolactina

Tesis para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD
que presenta:

Alejandro Vidal Gómez Alcalá

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de Alejandro Vidal Gómez Alcalá, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Director Académico
Dra Olga Rosa Brito Zurita

Secretario
Dr Norberto Sotelo Cruz

Vocal
Dr Ramón Alberto Rascón Pacheco

Suplente
Dr. Ramiro García Álvarez

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Investigar es como explorar las aguas profundas. El instinto mueve el cuerpo del buzo y dirige su mente, pero el visor le distorsiona la realidad: los pequeños hipocampos parecen caballos del mar y las minúsculas madréporas, estrellas; en cambio los pulpos, los camaleones y las tortugas, por su poder mimético, pasan desapercibidos. Sin una luz de guía, una brigada de soporte y muchos artifices de la técnica, el investigador obtiene como sentencia la desorientación y el error.

Por eso reconozco esta tesis como resultado del trabajo de un pequeño ejército de grandes personajes. La doctora y maestra en ciencias Olga Brito Zurita lo condujo con la pericia de quien conoce cuál es la meta, la tenacidad de quien sabe superar los obstáculos y la paciencia de quien percibe que el terreno llano es también una trampa. ¡Gracias Olga!

Al doctor y maestro en ciencias Alberto Rascón Pacheco, que además de ser una inspiración metodológica, ofreció siempre techo y apoyo absoluto a quien esto escribe mientras cursó las materias de la maestría en ciencias fuera de la ciudad en que vive; aportó, además, la base de datos, el análisis estadístico y gráfico y el consejo oportuno que permitió llegar a las conclusiones que aquí se presentarán. ¡Gracias, Alberto, Carmen y Beto!

A la química María del Carmen Cota Franquez, que realizó en una maratónica sesión de muchas horas de trabajo el proceso de MEIA para más de 200 muestras de suero, con la desventaja adicional de que muchas de ellas contenían volúmenes muy escasos. Ella supo sacar información preciosa de unas cuantas gotas de suero. ¡Gracias, Mari Carmen!

Al maestro y doctor Norberto Sotelo Cruz, siempre un ejemplo de la deontología, la academia y la calidez en la pediatría, quien apoyó este proyecto en el Hospital Infantil del Estado de Sonora, en Hermosillo; por él, se reunió en

semanas importante material clínico que a otros nos hubiera tomado meses o años coleccionar.

Al personal directivo de la UMAE Hospital de Especialidades 2 del IMSS en Ciudad Obregón y su laboratorio clínico, que apoyaron con sus recursos este proyecto en un momento en que parecía sucumbir de inanición.

Al equipo de pediatras del Hospital General Regional 1 del IMSS en Ciudad Obregón, siempre atentos al ingreso de algún “pilorín”, como se le denomina en la jerga diaria a quien padece la enfermedad que aquí se estudió.

Al grupo de maestros y compañeros de la maestría en ciencias de la salud de la Universidad de Sonora, valeroso y magnífico ensayo de cómo se puede, en nuestro País y nuestro Estado, reforzar la incipiente investigación en salud en beneficio de la gente que tanto espera de todos nosotros. Ellos contribuyeron con importantes sugerencias para hacer de este proyecto algo más potente y significativo. Estoy seguro que ese programa de maestría ofrecerá, tarde o temprano, frutos notables que nos llenarán de orgullo.

A los niños de Sonora, en particular a aquellos que en medio de su dolor nos permitieron estudiar su sangre y su padecer con la esperanza de que lo que aquí se conozca, contribuya a disminuir -o evitar- el dolor de otros.

Y finalmente, pero de manera primordial, con este esfuerzo terminé de cosechar el aliento de mis padres Rodolfo y María Antonieta por hacer de mí un hombre de bien, para entregarlo a mis hijos Gabriela y Bjorn, Adriana y José Alejandro, que inician apenas a trazar su sendero; anhelo que éste reciba siempre la guía de la justicia, del conocimiento y del amor por los demás.

Desde luego, este relevo de generaciones no sería posible sin Linda, la mujer que ilumina mi vida y ha hecho del hogar el sitio al que siempre quiero -cuanto antes- llegar y del que nunca, nunca, querría salir.

ÍNDICE

CONTENIDO	Número de página
Forma de aprobación	i
Agradecimientos y dedicatorias	ii
Índice	iv
Lista de Tablas	v
Lista de Figuras	vi
Objetivos	vii
Resumen	viii
Introducción	1
Antecedentes Bibliográficos	4
Materiales y Métodos	9
Resultados y Discusión	12
Conclusiones	25
Bibliografía	26

LISTA DE TABLAS

NUMERO	TÍTULO	PÁGINA
I	Pareamiento de casos y controles	13
II	Diagnósticos en los controles	14
III	Concentración de hormonas en suero	15

LISTA DE FIGURAS

NUMERO	TÍTULO	PÁGINA
1	Imagen transoperatoria de la “oliva” pilórica	2
2	Distribución de los valores de concentración de testosterona en casos y controles, separados por género	16
3	Distribución de los valores de concentración de hormona luteinizante en casos y controles, separados por género	17
4	Distribución de los valores de concentración de hormona folículo-estimulante en casos y controles, separados por género	19
5	Distribución de los valores de concentración de estradiol en casos y controles, separados por género	20
6	Distribución de los valores de concentración de prolactina en casos y controles, separados por género	21

OBJETIVOS

El objetivo de este proyecto de investigación fue comparar las concentraciones de hormonas sexuales (Testosterona, Estradiol, Hormona Luteinizante, Hormona Folículo-estimulante) y Prolactina en el suero de pacientes con Estenosis Hipertrofica del Píloro con las de niños y niñas de edades y pesos similares, libres de esa enfermedad.

Todo ello con la idea de aceptar la hipótesis de que los niños con el padecimiento descrito tienen niveles elevados de hormonas sexuales en su sangre, y que esa concentración aumentada puede ser un factor causal de la hipertrofia muscular que caracteriza este trastorno.

RESUMEN

La Estenosis Hipertrófica del Píloro (EHP) es una enfermedad propia de las primeras semanas de vida, en la que ocurre una obstrucción del vaciamiento gástrico que origina vómitos incoercibles, desnutrición y muerte. Ante el desconocimiento de qué la causa, diversos factores genéticos y ambientales se han propuesto como origen del trastorno; el posible rol de las hormonas sexuales, cuyo patrón de secreción perinatal guarda simetría con las características de presentación de la EHP, no ha sido investigado previamente; este proyecto intentó abordar ese nicho inexplorado.

Con un diseño transversal analítico con base en dos hospitales que atienden niños enfermos, se seleccionó a pacientes con EHP (casos) y a lactantes hospitalizados de género, edad y peso similar, sin dicho padecimiento y libres también de signos de obstrucción gástrica o de padecimiento gonadal o suprarrenal (controles). En una muestra de suero se cuantificó la concentración de Testosterona (T), Hormona Luteinizante (LH), Hormona Folículo-estimulante (FSH), Estradiol (E₂) y Prolactina (PRL) mediante el inmunoensayo MEIA. Las concentraciones se describieron por género (mujer/hombre) y condición (caso/control) con mediana (M) y rango entre los cuartiles 25 y 75 (RIC); las diferencias entre casos y controles fueron analizadas mediante la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Se estudió a 17 casos de EHP -12 varones (71%) y 5 mujeres (29%)- y 36 controles -25 varones (69%) y 11 mujeres (31%)- con edades entre 14 y 103 días y peso al nacer entre 1.4 y 4.3 Kg. Se identificó en los casos varones una concentración sérica superior de T que en los controles del mismo género (M 1.00 ng/ml, RIC 0.90;1.35 vs M 0.52 ng/ml, RIC 0.22;1.30 respectivamente, $p=0.008$); de igual manera, la concentración de E₂ en casos mujeres fue superior que en las controles (M 59.5 pg/ml, RIC 33.5;85 vs M 23 pg/ml, RIC

22;24 respectivamente, $p=0.03$). Las concentraciones de LH resultaron también elevadas en los casos hombres (M 2.4 mUI/ml, RIC 0.9;4.8 vs M 1.6 mUI/ml, RIC 0.4;3.2, $p=0.12$) y las de FSH entre casos mujeres (M 5.4 mUI/ml, RIC 1.3;9.9 vs M 3.1 mUI/ml, RIC 1.4;4.5, $p=0.5$), aunque sin alcanzar significado estadístico. La concentración de PRL no mostró diferencias significativas entre casos y controles.

Se concluye que la concentración sérica elevada de T en los niños varones con EHP, así como la de E_2 en niñas con el padecimiento, pueden ser factores que intervienen en la hipertrofia del músculo pilórico. La elevación de estas hormonas parece responder a un estímulo gonadotrópico hipofisario aumentado. Esto abre la posibilidad de que una disregulación del eje hipofisario-gonadal participe en el origen de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La estenosis hipertrófica del píloro (EHP) es una enfermedad que se presenta en las primeras semanas de vida, en la que ocurre una obstrucción de la vía de salida del estómago que provoca vómito, deshidratación y desnutrición (Spicer, 1982).

De una manera general, la incidencia de este padecimiento oscila entre 1 y 3 casos por cada 1,000 recién nacidos vivos (Hedback y cols, 2001; Nielsen y cols, 2000; Schechter y cols, 1997; Rasmussen y cols, 1989); se ha documentado una frecuencia mucho mayor en primogénitos del género masculino (MacMahon, 2006; To y cols, 2005; Jedd y cols, 1988; Reyna y cols, 1987) y entre los recién nacidos con mayor masa corporal (Applegate y Druschel, 1995; Lammer y Edmonds, 1987; Fernández Toral y cols, 1980).

Las características anatómicas de la EHP son la hipertrofia de la capa muscular circular del píloro (Kobayashi y cols, 1995), hiperplasia de las fibras musculares (Oue y Puri, 1999), aumento en la cantidad de fibroblastos (Pueyo y cols, 2001) y crecimiento de la capa muscular longitudinal (Abel y cols, 1998). El engrosamiento del píloro toma la forma y consistencia de una “oliva” o aceituna (Figura 1).

El principal efecto de este trastorno sobre el paciente es el impedimento nutricional que, de no resolverse, le puede conducir a la muerte; aún a finales del siglo XX, un buen número de los neonatos afectados morían en algunos países del África sub-Sahariana (Carneiro, 1991).

El crecimiento anormal del músculo pilórico sigue un patrón tipo “campana”: comienza durante las últimas semanas de vida intrauterina, cuando el píloro aumenta su volumen y reduce paulatinamente su luz; alcanza su máxima expresión durante las primeras semanas después del nacimiento y termina –si el paciente sobrevive- durante el cuarto mes de vida, en que la

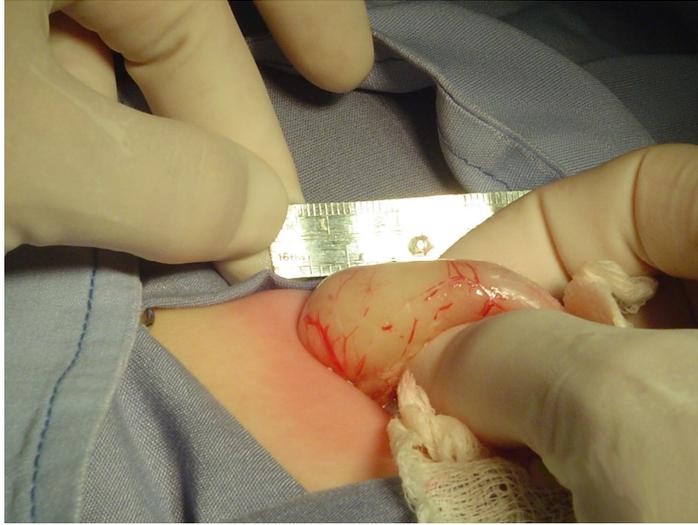


Figura 1.- Imagen transoperatoria de la “oliva” pilórica

masa muscular y la obstrucción desaparecen también de manera gradual (Spicer, 1985). Este patrón de crecimiento y decrecimiento del músculo del píloro es una característica singular de esta enfermedad; por ello, afecta sólo a lactantes pequeños, niños de entre una semana y tres meses de vida (Schechter y cols, 1997, Haahr y Nielsen, 2000) y no se presenta a mayor edad. El tratamiento universalmente aceptado, que consiste en incidir la “oliva” en sentido longitudinal para aumentar la luz del canal pilórico, tiene sólo un efecto transitorio, en tanto ocurre la remisión espontánea de la hipertrofia.

Hasta el momento se desconoce la causa de la EHP; se acepta que resulta de la conjugación de diversas influencias genéticas y ambientales (Mitchell y Risch, 1993); la pauta familiar que sigue el padecimiento y la amplia primacía de los varones sustentan las primeras, a pesar de no haberse identificado una pauta hereditaria ligada al sexo (Chakraborty, 1986); las segundas se apoyan en la mayor frecuencia del trastorno en familias de zonas rurales (To y cols, 2005) y entre gemelos no idénticos (Velaoras y cols, 2005). Algunas otras características epidemiológicas, como la tasa de incidencia diferenciada entre distintas etnias en un mismo estado (Wang y cols, 2008) o distintas regiones de una masa continental (Pedersen, 2008) o entre el mundo oriental y el occidental (MacMahon, 2006) podrían explicarse por la interacción de ambos efectos.

El patrón temporal perinatal en “campana” de la EHP, al que arriba se hizo referencia, invita a pensar en que algún factor con un comportamiento similar interviene en el origen del trastorno; la hipótesis que se sostiene en esta tesis es que pudiera tratarse de las hormonas sexuales, cuya secreción muestra un importante pico en las últimas semanas de gestación y las primeras de la vida extrauterina, para reducir después su presencia en el organismo.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Se han identificado algunas anomalías en el tejido muscular pilórico que podrían explicar su hipertrofia: células o fibras nerviosas inapropiadas o inmaduras, falla en los mecanismos de relajación muscular, producción local aumentada de factores de crecimiento, hormonas gastrointestinales o sustancia intercelular y efecto local de agentes infecciosos, antimicrobianos o alimentos. A continuación se describe el estado actual del conocimiento sobre esos hallazgos anormales.

I.- Efecto Local de Alimentos, Antibióticos o Bacterias

Los programas de “retorno” al seno materno han reducido en algún país la frecuencia de EHP (Osifo y Evbuomwan, 2008), lo que sugiere una probable relación entre la alimentación artificial y la enfermedad (Habbick y cols, 1989); Existe una disputada asociación de la eritromicina -administrada a la madre o al neonato- con el padecimiento (Sorensen y cols, 2003; Hauben y Amsden, 2002; Louik, 2002; Mahon y cols, 2001). Se ha teorizado sobre *Helicobacter pylori* como causa de la EHP (Paulozzi, 2000), pero no se han identificado sus antígenos en estos pacientes (Sherwood y cols, 2007).

II.- Efecto de Hormonas Gastrointestinales

Diversos autores tienen posiciones discordantes sobre el rol de la gastrina en el origen de la EHP (Rogers, 2006; Martínez Urrutia y cols, 1995; Iwai y cols, 1984; Dick y cols, 2001; Hernanz-Schulman y cols, 2001). La somatostatina, que induce piloroespasmo al bloquear los receptores de neurotransmisores Inhibitorios, está en altas concentraciones en pacientes con EHP (Dick y cols, 2001).

III.- Aumento en la Producción de Sustancia Intercelular

Los pacientes con EHP muestran numerosos fibroblastos en el músculo pilórico (Pueyo Gil y cols, 2001) y una mayor cantidad de proteínas intercelulares (Miyazaki y cols, 1998; Oue y Puri, 1999; Gentile y cols, 1998). Esto puede ser responsable de la consistencia firme del píloro, la "oliva".

IV.- Aumento en la Producción de Factores de Crecimiento

Los factores de crecimiento son hormonas con producción y efecto local; se ha documentado en el píloro hipertrófico una mayor producción de Factor de Crecimiento Transformante-alfa, Epidérmico, Insulinoide, Derivado de Plaquetas y péptidos relacionados (Jablonski y cols, 2006; Shima y cols, 2000; Shima y Puri, 1999; Ohshiro y Puri, 1998).

IV.- Insuficiencia en los Mecanismos de Relajación Muscular del Píloro

Una deficiencia en los mecanismos mediadores de la relajación muscular pilórica -con la consecuente hipertrofia por esfuerzo- puede inducir la enfermedad. Las fibras musculares, neuronas y fibras nerviosas pilóricas producen escasa enzima sintasa de óxido nítrico (ESON) (Sy y cols, 2004; Gentile y cols, 1998; Abel y cols, 1998; Kusafuka y Puri, 1997); el uso de un inhibidor de esa enzima produce hipertrofia pilórica en ratas (Barbosa y cols, 2001). Estos resultados han sido cuestionados (Subramaniam y cols, 2001).

V.- Inervación Deficiente

La denervación y la hipertonía muscular consecuente puede conducir a la EHP. Se ha documentado escasez de células nerviosas del plexo mientérico (Paredes-Esteban y cols, 2003; Abel y cols, 1998; Langer y cols, 1995), así como de terminaciones nerviosas y neurofilamentos (Guarino y cols, 2001; Abel

y cols, 1998; Gentile y cols, 1998; Yamataka y cols, 1996; Kobayashi y cols, 1995; Langer y cols, 1995); esta escasez impide integrar una red circunferencial de relajación en el píloro (Guarino y cols, 2001; Kobayashi y cols, 2001).

También se ha documentado reducción en el número e inmadurez de las células del “marcapaso intestinal” (Piotrowska y cols, 2003; Yamataka y cols, 1996; Vanderwinden y cols, 1996; Langer y cols, 1995) y de las células gliales dentro del tubo digestivo (Kobayashi y cols, 1994), con su consecuente efecto sobre el desarrollo del tejido nervioso enteral (Guarino y cols, 2000).

A pesar de la importancia de estos hallazgos sobre el origen de la EHP, ninguno de ellos constituye la causa de la enfermedad; son tan sólo aproximaciones a su patogenia, mecanismos propuestos para desencadenar la hipertrofia muscular. Se puede argumentar que alteraciones tan diversas como las descritas parecen ser más bien la resultante de alguna desviación precursora en el desarrollo del tubo digestivo.

El agente causal, que aún escapa a nuestro conocimiento, debe localizarse en el cuerpo mismo del feto –dado que el trastorno inicia desde antes del nacimiento- y debe mostrar un efecto en “campana” sobre el tejido muscular del píloro; debe también estar presente en mayor cuantía en las edades perinatal y neonatal y expresar una amplia predilección por los primogénitos varones con mayor tamaño al nacer. Como se ha sugerido, las hormonas sexuales, que circulan en el feto y en el neonato en altas concentraciones y tienen efectos sobre el tejido muscular, pueden configurar ese elusivo agente (James, 2004; Arena y Smith, 1978).

Las hormonas sexuales son esteroides producidos primordialmente en las gónadas: estradiol (E_2) por los folículos ováricos, testosterona (T) por las células intersticiales del testículo; pero también la corteza suprarrenal aporta cantidades importantes de dehidroepiandrosterona, androstenediona, androstenediol, androsterona, estrona y estriol.

Durante la vida intrauterina, la producción fetal de hormonas sexuales sigue una pauta hiperactiva (Krone y cols, 2007), con un efecto anabólico de la mayor importancia: en el músculo esquelético, los andrógenos inducen un aumento en el tamaño y número de las fibras musculares, mionúcleos y células satélite (Bhasin y cols, 2003) y reducen la incorporación de lípidos a las células adiposas y la proporción de grasa corporal (Mayes y Watson, 2004). Como efecto de los andrógenos fetales, el cuerpo crece más y de manera armónica; hay correlación entre el peso al nacer y el nivel sérico fetal de andrógenos (González-Montelongo y cols, 2006).

Pero además, la suprarrenal fetal debe producir los andrógenos que la placenta demanda para cumplir con los requerimientos maternos de estrógenos y progestinas durante toda la gestación (White, 2006; Pasqualini, 2005, Rainey y cols, 2004). Por si esto fuera poco, el feto masculino requiere una producción adicional de andrógenos para verificar su proceso de diferenciación sexual (Sinisi y cols, 2003; Main y cols, 2000).

Al nacer, niños y niñas tienen niveles muy elevados de hormonas sexuales en su sangre (Quigley, 2002; Wang y cols, 1998; Simmons y cols, 1994; Shinkawa y cols, 1983), una verdadera “feria” de andrógenos y estrógenos; durante las primeras semanas de vida extrauterina, dichos niveles se mantienen por la secreción aumentada de las gonadotropinas hipofisarias luteinizante (LH) y estimulante del folículo (FSH) (Chada y cols, 2003). Esta abundancia hormonal propicia en los varones el descenso testicular (Emmen y cols, 2000) y en las mujeres la programación del eje neuroendocrino reproductivo (Robinson, 2006). Después de los primeros meses de vida, los niveles séricos de T y E₂ disminuirán paulatinamente hasta alcanzar cifras indetectables hacia el segundo semestre de vida extrauterina (Chada y cols, 2003; Elmlinger y cols, 2002; Gassler y cols, 2000).

La abundancia de andrógenos arriba descrita y la hipertrofia pilórica comparten algunas características llamativas, como la de presentarse en mayor medida en los niños varones, afectar primordialmente al tejido muscular, apuntar al perinatal como período de máxima expresión y desaparecer al rebasar el primer trimestre de vida.

Se conoce que el efecto de los andrógenos es mayor en los varones porque están presentes en mayor cantidad que en las mujeres (Tomlinson, 2004) y por ellos tienen mayor peso y talla corporal y menos grasa subcutánea (Rodríguez y cols, 2004). Coincidentemente, son precisamente los infantes varones con peso mayor al nacer los que suman la mayoría de los casos de EHP (Gómez-Alcalá, 1999; Bianca y cols, 2003; Fernández-Toral y cols, 1980).

Aunque la hipertrofia del músculo esquelético es el efecto anabólico reconocido de las hormonas sexuales, también se han documentado efectos sobre el tejido muscular liso (González-Montelongo, 2006), como la inducción de hiperplasia miometrial por el E₂ placentario (Ono y cols, 2007). El músculo pilórico podría también mostrar una sensibilidad similar a los andrógenos y estrógenos.

Finalmente, el inicio “in-utero” de la hipertrofia pilórica (Tashjian y Konefal, 2002; Singh y cols, 2001) concuerda con el acmé de la “feria” androgénica –el periodo perinatal-, en tanto que su declive se corresponde con la involución del crecimiento muscular; recordemos que la enfermedad no se presentará más en ulteriores etapas de la vida.

El proyecto que dio origen a la presente tesis se justificó no sólo con la intención de iniciar una línea novedosa de investigación sobre el crecimiento del músculo pilórico en fetos y recién nacidos, sino sobre todo el de sustentar con datos empíricos un estudio de mayores alcances sobre la probable asociación causal entre el alza de las hormonas sexuales y EHP, cuyos resultados sí podrían alcanzar una aplicación clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Previa aprobación por el Comité de Investigación y Ética del Hospital General Regional No 1 del IMSS en Ciudad Obregón (Número de registro 2601-2006-07) y del Hospital Infantil del Estado de Sonora, en Hermosillo, se realizó un estudio transversal analítico basado en hospital. Se incluyeron casos incidentes de EHP que tuviesen signos claros de la enfermedad y en quienes la “oliva” pilórica fuese identificada durante la intervención quirúrgica.

Como controles, se incluyó a neonatos y lactantes internados, menores de 4 meses y sin síntomas de obstrucción del tubo digestivo o problemas endocrinos comunes de esta edad, como la hiperplasia suprarrenal o el estado intersexual. Uno de los padres autorizó el uso de la sangre de su hijo en el presente estudio, mediante la firma de una carta de consentimiento informado.

Desde el punto de vista metodológico, los controles idóneos hubieran sido neonatos y lactantes sanos; pero puncionarles una vena sólo para obtener sangre para este proyecto sería indebido desde el punto de vista ético. Se optó mejor por utilizar controles hospitalizados por diversos padecimientos en los que un nivel anormal de las hormonas estudiadas fuese improbable.

La colección de alícuotas de suero inició en abril de 2006. En todos los casos y controles, la sangre se obtuvo mediante una venopunción, invariablemente solicitada por el médico tratante para completar el protocolo diagnóstico del padecimiento respectivo; en ningún paciente se extrajo sangre por el solo motivo del presente proyecto de investigación.

El tamaño muestral calculado para este proyecto fue originalmente de 32 casos y 32 controles, pero la presentación infrecuente de los casos y el retraso que esto originó en el avance del proyecto hizo plantear, como alternativa de solución, un primer análisis o “corte” al completarse la mitad de la muestra; para

mantener el poder estadístico del análisis ($\beta < 0.1$), se duplicó el número de controles por caso.

La sangre fue centrifugada a 3,500 RPM durante 10 minutos y el suero separado y utilizado para las pruebas clínicas que fueron menester; el restante fue etiquetado y guardado en un congelador a -40°C hasta que se colectaron todas las alícuotas necesarias y los kits inmunoquímicos requeridos para la determinación de niveles hormonales estuvieron disponibles. La calidad de la congelación fue asegurada mediante una fuente de energía eléctrica alterna.

La colección de alícuotas concluyó en abril de 2008; para entonces se había constituido un banco grande con más de 150 muestras de suero de controles potenciales, para asegurar un apareamiento óptimo. En un análisis previo al ensayo inmunoquímico, para cada caso de la enfermedad se eligieron dos controles de género igual y de edad y peso al nacer similares. Una vez hecho este apareamiento, los tubos fueron sacados de congelación y enviados a laboratorio, en tanto que los restantes fueron desechados de acuerdo con la normatividad para productos biológicos potencialmente infecciosos.

La determinación de las concentraciones hormonales se hizo en marzo de 2009 mediante el inmunoensayo enzimático microparticulado MEIA, en un sistema AxSYM (Abbott®), mediante el siguiente proceso: la muestra de suero se mezcla con micropartículas, un buffer de citrato ácido (pH 2.4) y 2-metoxiestradiol, que desnaturalizan a la globulina acarreadora de hormonas sexuales (SHBG) y otras proteínas, no sin antes liberar a la hormona en cuestión; después de incubar, las micropartículas son cubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-hormona específico que captará la hormona libre. Se agrega un conjugado de la hormona y fosfatasa alcalina, que bloqueará todos los sitios no ocupados de la capa monoclonal. Esta mezcla se transfiere a una celda matriz AxSYM, donde las micropartículas adherirán a las fibras de vidrio de la superficie de la celda; después de un lavado para remover todo lo

que no son micropartículas, se agrega un sustrato de 4-metil umbeliferil-fosfato, que será hidrolizado por la fosfatasa alcalina presente para producir 4-metil umbeliferona, el compuesto fluorescente que será medido.

Se ha estimado que la sensibilidad analítica promedio de este método es sumamente alta, menor a 0.05 ng/mL; su coeficiente de variación intraensayo oscila entre 3.9 y 8.3%; la especificidad para T es superior al 99% y el coeficiente de correlación entre este método y el de referencia (dilución de isótopos/cromatografía de gas espectrometría de masas) para T y E₂ es superior al 0.97; la posibilidad de interferencia con sustancias como la bilirrubina, la hemoglobina o los eritrocitos fetales, SHBG o proteínas es ínfima (Wu y cols, 2002; Novotny y Wilson, 2005). Todas las alícuotas se procesaron con un solo kit para cada hormona.

Una vez obtenidos los valores se generó una base de datos mediante el software Stata 10; se realizó una descripción estadística exploratoria para niños y niñas y una correlación de Spearman entre los valores hormonales y la edad o el peso al nacer, para evaluar la necesidad de crear estratos de edad o peso al nacer que permitiesen hacer comparaciones más precisas de los niveles hormonales entre casos y controles.

A continuación se calcularon las medianas (M) y rangos percentilares 25 y 75 (RIC) de los valores de cada hormona en forma independiente para niños y niñas, casos y controles y se graficaron con un diseño tipo box-plot. La comparabilidad de casos y controles se evaluó mediante la prueba T de Student de manera separada para niñas y niños. La significación estadística de las diferencias observadas entre mujeres y hombres, así como entre casos y controles se estimó mediante la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Se consideró con significación estadística el valor de p inferior a 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron 17 casos de EHP, 12 varones (70.1%) y 5 mujeres (29.9%), con edades entre 17 y 87 días y peso al nacer entre 1,4 y 3,9 Kg. Se seleccionaron del banco de alícuotas a 36 controles, 25 varones (69.4%) y 11 mujeres (30.5%), con edades entre 14 y 103 días y peso al nacer entre 1,4 y 4,3 Kg. La bondad del pareamiento por género, peso al nacer y edad se detalla en la Tabla I; al no existir diferencias significativas en esos parámetros entre casos y controles, se consideró procedente la comparación de los niveles hormonales. Los diagnósticos establecidos al momento de incluir a los controles en el estudio se muestran en la Tabla II. La descripción y análisis de los valores hormonales aparece en la Tabla III.

El ensayo del nivel sérico de T fue practicado en 17 casos y 36 controles. Como era de esperarse, se encontró una mayor concentración en hombres (M 0.84 ng/ml, RIC 0.29;1.31) que en mujeres (M 0.15 ng/ml, RIC 0.07;0.30) ($p = 0.0001$). No se observó correlación entre este valor y la edad ($r = -0.08$) o el peso al nacer ($r = -0.26$), pero sí se identificó una diferencia significativa entre los casos y controles del género masculino, mas no entre las mujeres (Figura 2).

El nivel sérico de LH fue determinado en 16 casos y 22 controles; se encontró una significativa mayor concentración en hombres (M 2.08 mUI/ml, RIC 0.79;3.71) que en mujeres (M 0.24 mUI/ml, RIC 0.07;1.19)($p = 0.026$). Se identificó también diferencia entre los casos y controles varones, pero sin alcanzar significado estadístico (Figura 3).

Por el contrario, el nivel sérico de FSH, que se midió en 15 casos y 17 controles, mostró una significativa mayor concentración en mujeres (M 3.44 mUI/ml, RIC 1.45;6.7) que en hombres (M 1.17 mUI/ml, RIC 0.72;1.86)

Tabla I.- Pareamiento de casos y controles

		PESO AL NACER	EDAD
		Kg	Días de vida
		Mediana (RIC)	Mediana (RIC)
		<i>p</i>	<i>p</i>
♂	Casos EHP (n=12)	3,5 (3,2; 3,6)	30,5 (24,5;34,5)
	Controles (n=25)	3,3 (2,7; 3,6)	31 (20; 35)
		0.154	0.639
♀	Casos EHP (n=5)	3,1 (2,5; 3,8)	50 (29; 51)
	Controles (n=11)	3,1 (2,7; 3,5)	50 (23; 72)
		0.544	0.855

EHP: Estenosis hipertrófica del píloro

RIC: Rango intercuartílico (percentil 25; 75)

Tabla II.- Diagnósticos en los controles

DIAGNÓSTICO	NÚMERO
Cardiopatía congénita	6
Enteritis-Enterocolitis	6
Recién Nacido Pretérmino	5
Enfermedad neurológica	4
Gastrosquisis	3
Obstrucción intestinal	3

Tabla III.- Concentración de hormonas en suero

HORMONA	MUJERES		P	HOMBRES		p
	CASO Mediana (RIC)	CONTROL Mediana (RIC)		CASO Mediana (RIC)	CONTROL Mediana (RIC)	
TESTOSTERONA ng/ml	n = 5 0.09 (0.09; 0.20)	n = 11 0.15 (0.05; 0.31)	0.608	n = 12 1.00 (0.90; 1.35)	n = 25 0.54 (0.22; 1.06)	0.008*
HORMONA LUTEINIZANTE mUI/ml	n = 5 0.27 (0.13; 0.64)	n = 7 0.21 (0.0; 1.26)	0.807	n = 11 2.42 (0.86; 4.8)	n = 15 1.81 (0.39; 2.38)	0.115
HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE mUI/ml	n = 4 5.43 (1.32; 9.9)	n = 6 3.09 (1.45; 4.52)	0.522	n = 11 1.09 (0.6; 1.3)	n = 11 1.20 (0.84; 2.81)	0.355
ESTRADIOL pg/ml	n = 4 59.5 (33.5; 85)	n = 3 23 (22; 24)	0.034*	n = 11 32 (30; 36)	n = 11 34 (26.5; 42)	0.535
PROLACTINA µg/L	n = 4 35.85 (22; 53)	n = 5 25 (23.5; 25.66)	0.806	n = 10 67.7 (38.5; 111)	n = 14 89.3 (29; 140.35)	0.651

RIC: Rango intercuartílico (percentil 25; 75) * Con significación estadística

Prueba de suma de rangos de Wilcoxon

Variación intraensayo: <0.083

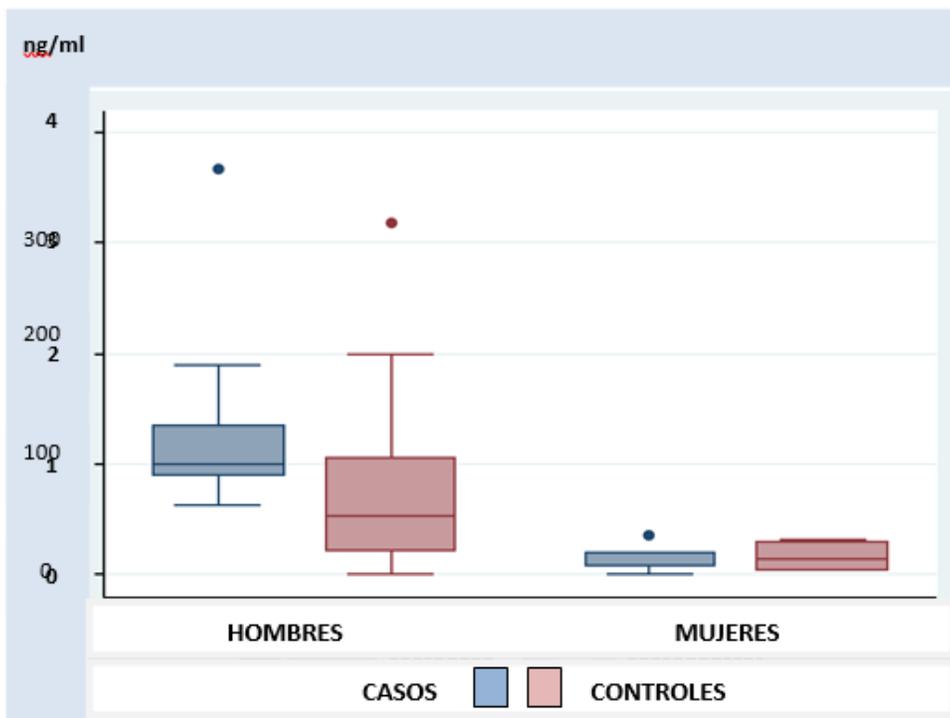


Figura 2.- Distribución de los valores de concentración de testosterona en casos y controles, separados por género

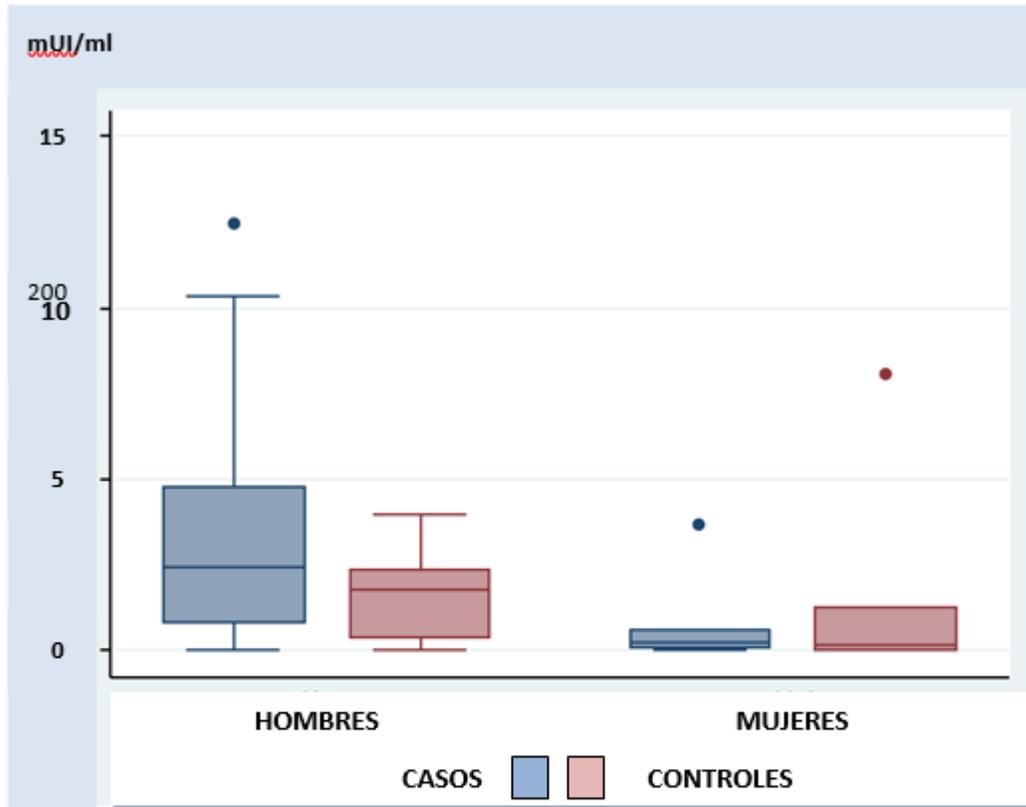


Figura 3.- Distribución de los valores de concentración de hormona luteinizante en casos y controles, separados por género

($p = 0.032$). Se identificó también diferencia entre los casos y controles mujeres, pero sin alcanzar significado estadístico (Figura 4).

Los resultados del ensayo del nivel sérico de E_2 , practicado en 15 casos y 14 controles, no mostraron una diferencia significativa entre hombres (M 32 pg/ml, RIC 30;36) y mujeres (M 26 pg/ml, RIC 23;78)($p = 0.99$). Se identificó una diferencia significativa entre los casos y controles femeninos (Figura 5).

A su vez, el nivel sérico de PRL, determinado en 14 casos y 19 controles, mostró una mayor concentración en hombres (M 81.47 $\mu\text{g/L}$, RIC 28.05;113.39) que en mujeres (M 25 $\mu\text{g/L}$, RIC 23.5;48.12), pero no significativa ($p = 0.07$). No se identificó una diferencia entre los casos y controles (Figura 6).

Discusión

Los resultados que aquí se presentan confirman que existe asociación entre la EHP y las concentraciones elevadas de hormonas sexuales masculinas y femeninas.

Esta asociación tiene un sustento fisiológico que ya fue antes analizado; el patrón de secreción de las hormonas sexuales, con su elevada concentración perinatal, su importante efecto sobre tejido muscular y su mayor presencia en varones, evoca fielmente las características más distintivas de la hipertrofia pilórica. Es necesario reconocer, sin embargo, que la metodología empleada en este estudio no permite asegurar que el alza hormonal precedió a la enfermedad, requisito indispensable para sostener causalidad.

Desde el punto de vista de la plausibilidad biológica, las hormonas sexuales muestran la capacidad de provocar la hipertrofia pilórica, tanto por su efecto primario sobre el tejido muscular, como operando mediante los cambios tisulares que ya se han descrito en fibroblastos, células y fibras nerviosas o factores de crecimiento (Singh y cols, 2009).

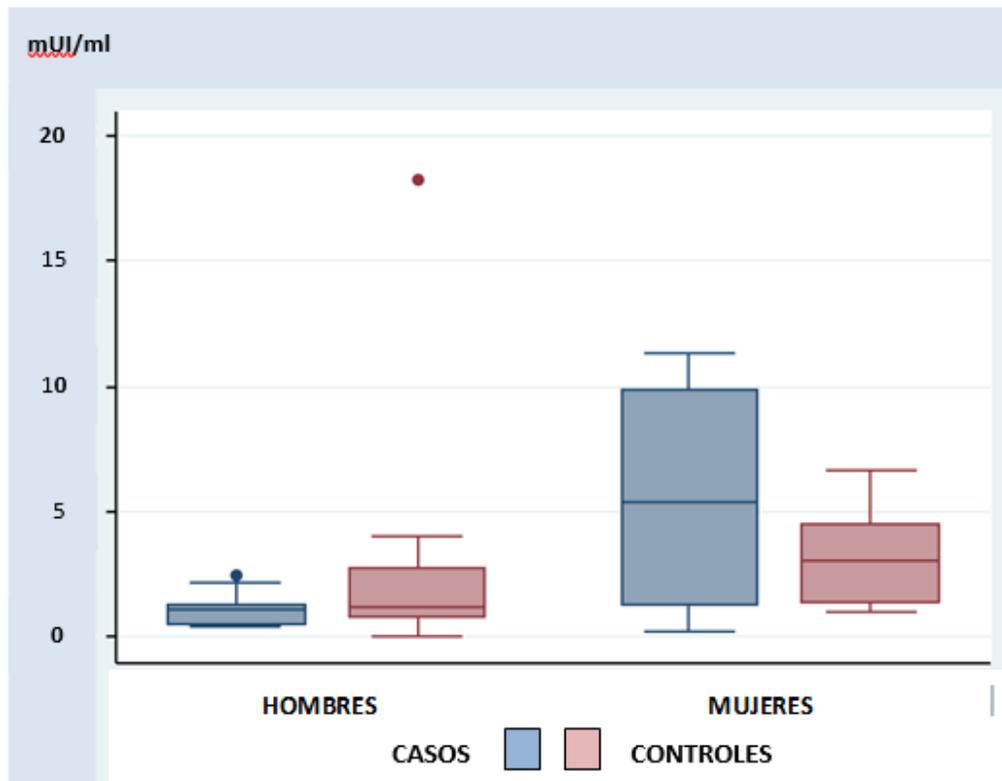


Figura 4.- Distribución de los valores de concentración de hormona folículo-estimulante en casos y controles, separados por género

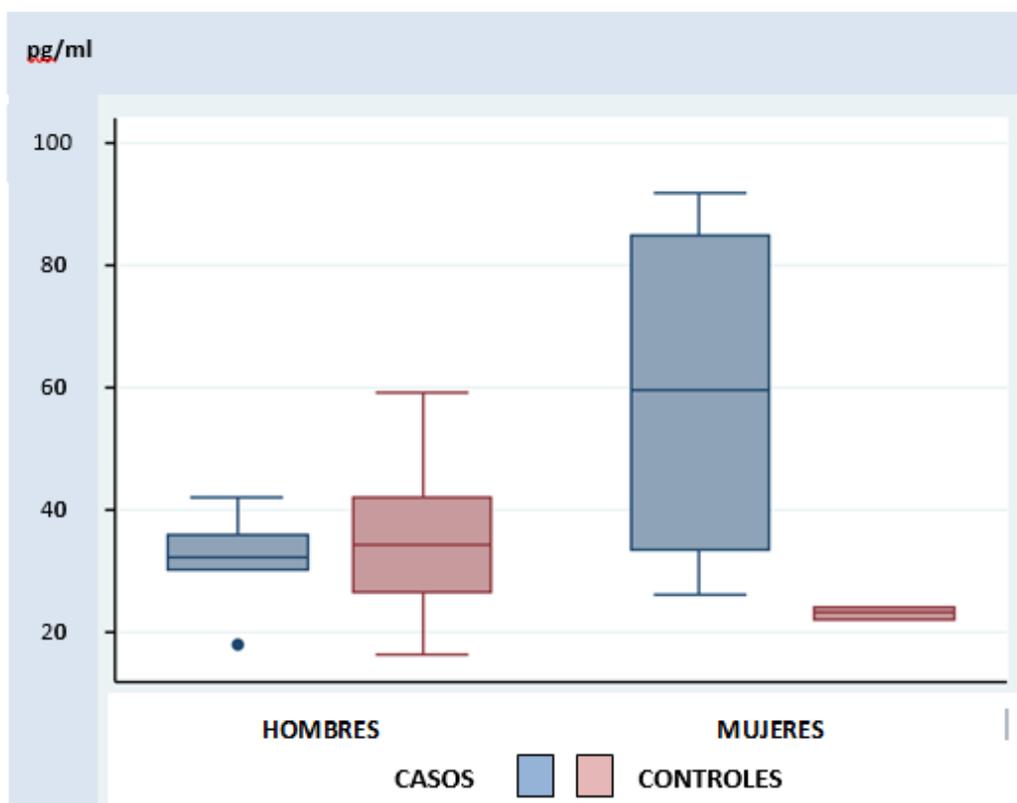


Figura 5.- Distribución de los valores de concentración de estradiol en casos y controles, separados por género

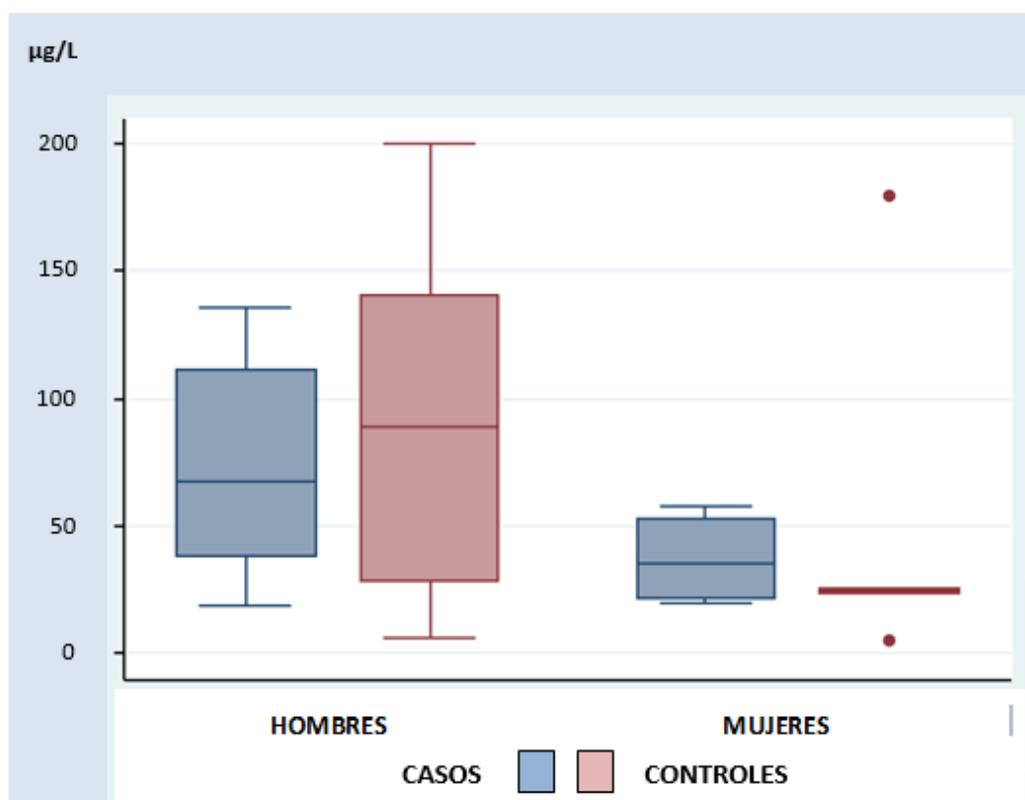


Figura 6.- Distribución de los valores de concentración de prolactina en casos y testigos, separados por género

Algunos datos anecdóticos permiten reforzar dicha asociación; Pitukcheewanont y cols (2006) reportaron a dos neonatos hermanos (no gemelos) con hiperplasia suprarrenal congénita e hiperandrogenismo marcado, que desarrollaron EHP; la probabilidad de que ambos padecimientos coincidan por efecto aleatorio es de 1 en 7,000,000 y la de una recurrencia familiar alcanza proporciones astronómicas. En el pseudohermafroditismo masculino por resistencia a los andrógenos, entidad con alto nivel de andrógenos también (Hu y cols, 2004; Gad y cols, 2003) y en el Síndrome de Smith-Lemli-Opitz, un trastorno en la síntesis de colesterol que permite la sobreacumulación de un precursor de andrógenos, se ha descrito una frecuencia aumentada de hipertrofia pilórica (Schechter y cols, 1997).

Se ha documentado también que las madres jóvenes, que tienen mayor producción de T y andrógenos durante la gestación (Carlsen y cols, 2003; Troiso y cols, 2003), tienen con mayor frecuencia hijos con EHP (Pedersen y cols, 2008); llama la atención que los primogénitos, que son más propensos a padecer la enfermedad, tienen niveles superiores de testosterona en su sangre (Maccoby y cols, 1979). Se ha observado también que, al llegar a la adultez, estos pacientes muestran abundante tejido musculo-esquelético (Carter, 1961);

Los resultados del presente estudio sugieren, además, que el incremento observado en la secreción de T en los niños y de E₂ en las niñas no es un fenómeno primario, sino incentivado por un aumento en la secreción de hormonas gonadotrópicas hipofisarias; esto significa que, más que una sobreproducción gonadal de hormonas sexuales, el aumento se origina en el hipotálamo o la hipófisis, probablemente por inmadurez en el mecanismo de retroalimentación negativa.

Hasta la fecha no existen informes sobre el papel de las hormonas sexuales en la hipertrofia pilórica o los mecanismos que lo propician. Se trata de un campo novedoso en el que se pueden obtener respuestas interesantes a

problemas clínicos aún hoy insolutos; por ejemplo: ¿es el píloro neonatal un órgano estructuralmente diferente del adulto?; ¿tiene el tejido muscular del píloro receptores para hormonas sexuales?; ¿crece el músculo pilórico en presencia de concentraciones fisiológicas de hormonas sexuales?; ¿es el reflujo gastroesofágico “fisiológico” de los niños pequeños un problema clínico derivado de un píloro crecido por el efecto hormonal?

El aceptar que las hormonas sexuales contribuyen al desarrollo de la EHP no implica descartar la importancia de los factores genéticos o ambientales en su presentación; todo lo contrario. La disregulación hipotalámica o hipofisiaria de la secreción perinatal de hormonas sexuales puede reflejar la influencia variable de ciertos genes maternos o infantiles; esto puede ser lo que explique, por ejemplo, por qué esta enfermedad no concuerda con la frecuencia esperada en gemelos monocigóticos (Mitchell y Risch, 1993), pero sí en gemelos dicigóticos (Velaoras y cols, 2005), lo que ha constituido un rompecabezas para los que sostienen la preponderancia del efecto genético en este padecimiento (Yen y cols, 2003).

La utilidad de estos resultados reside en el potencial de explotar la asociación entre hormonas sexuales y musculatura pilórica con fines preventivos y posiblemente terapéuticos. Si una elevación anormal de la concentración de hormonas sexuales causa la enfermedad, un bloqueo selectivo de su efecto sobre el tubo digestivo podría prevenirla y tal vez curarla sin interferir con el resto de sus efectos sistémicos..

Estudiar si las hormonas sexuales contribuyen al desarrollo de la EHP implicará, en proyectos futuros, probar que la elevación de las hormonas sexuales ocurre antes de que inicie la hipertrofia muscular, examinar si el descenso de los niveles hormonales de T y E₂ tiene lugar antes de la regresión de la hipertrofia, detallar el efecto específico de las hormonas sobre el músculo

pilórico y finalmente, caracterizar el gradiente biológico de la hipertrofia pilórica ante niveles hormonales diversos.

Algunos autores han señalado la necesidad de realizar una separación cromatográfica previa al ensayo inmunoquímico de T en niños pequeños; la justificación de esta maniobra es la de incrementar la exactitud de la prueba en alícuotas que contienen muy bajas cantidades de andrógeno (Albrecht y Styne, 2007; Stanczyk y cols, 2003; Taieb y cols, 2003; Dorgan y cols, 2002; Fuqua y cols, 1995). Nuestros resultados no disminuyen su valor a pesar de no cumplir con esta recomendación, ya que el objetivo del estudio no fue la descripción detallada de los valores, sino la comparación de los mismos entre alícuotas que fueron sometidas al mismo ensayo directo.

Por otro lado, el hecho de contar con un grupo control reclutado de un hospital pudiera originar una objeción metodológica por tratarse de niños enfermos. Sin embargo; como consta en la lista de diagnósticos, ninguna de las enfermedades anotadas afecta en forma directa o indirecta la medición de hormonas sexuales.

CONCLUSIONES

Las concentraciones séricas elevadas de T en los niños varones, así como la de E₂ en niñas están asociadas con la hipertrofia del músculo pilórico. La elevación de estas hormonas parece responder a un estímulo gonadotrópico hipofisario aumentado. Esto abre la posibilidad de que una disregulación del eje hipofisario-gonadal participe en el origen de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, R.M., Bishop, A.E., Dore, C.J., Spitz, L., Polak, J.M. 1998. A quantitative study of the morphological and histochemical changes within the nerves and muscle in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg.* 33(5):682-7.
- Albrecht, L., Styne, D. 2007. Laboratory testing of gonadal steroids in children. *Pediatr Endocrinol Rev.* 5 Suppl 1:599-607.
- Andersson, A.M., Toppari, J., Haavisto, A.M., Petersen, J.H., Simell, T., Simell, O., Skakkebaek, N.E. 1998. Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(2):675-81.
- Applegate, M.S., Druschel, C.M. 1995. The epidemiology of infantile hypertrophic stenosis in New York State, 1983 to 1990. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 149: 1123-9.
- Arena, J.F.P, Smith, D.W. 1978. Sex liability to single structural defects. *Am J Dis Child.* 132: 970-2.
- Barbosa, I.M., Ferrante, S.M., Mandarim-De-Lacerda, C.A. 2001. Role of nitric oxide synthase in the etiopathogenesis of hypertrophic pyloric stenosis in infants. *J Pediatr (Rio J).* 77(4):307-12.
- Bhasin, S., Taylor, W.E., Singh, R., Artaza, J., Sinha-Hikim, I., Jasuja, R., Choi, H., Gonzalez-Cadavid, N.F. 2003. The Mechanisms of Androgen Effects on Body Composition: Mesenchymal Pluripotent Cell as the Target of Androgen Action . *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 58:M1103-M1110.
- Bianca, S., Ingegnosi, C., Barbagallo, M.A., Ettore, G. 2003. *J Obstet Gynaecol.* 23(1): 43.

- Carlsen, S.M., Jacobsen, G., Romundstad, P. 2006. Maternal testosterone levels during pregnancy are associated with offspring size at birth. *Eur J Endocrinol.* 155: 365-70.
- Carlsen, S.M., Jacobsen, G., Bjerve, K.S. 2003. Androgen levels in pregnant women decrease with increasing maternal age. *Scand J Clin Lab Invest.* 63(1):23-6.
- Carneiro, P.M. 1991. Infantile hypertrophic pyloric stenosis in Dar Es Salaam. *Centr Afr Med J.* 37: 93-6.
- Carter, C.O. 1961. The inheritance of congenital pyloric stenosis. *Br Med Bull* 17: 251.
- Chada, M., Prusa, R., Bronsky, J., Kotaska, K., Sidlova, K., Pechova, M., Lisa, L. 2003. Inhibin B, Follicle Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone and Testosterone during childhood and puberty in males: Changes in serum concentration in relation to age and stage of puberty. *Physiol Res.* 52:45-51.
- Chakraborty, R. 1986. The inheritance of pyloric stenosis explained by a multifactorial threshold model with sex dimorphism for liability. *Genet Epidemiol.* 3(1):1-15.
- de Ronde, W., van der Schouw, Y.T., Pierik, F.H., Pols, H.A., Muller, M., Grobbee, D.E., Gooren, L.J., Weber, R.F., de Jong, F.H. 2005. Serum levels of sex hormone-binding globulin (SHBG) are not associated with lower levels of non-SHBG-bound testosterone in male newborns and healthy adult men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 62(4):498-503.
- Dick, A.C., Ardill, J., Potts, S.R., Dodge, J.A. 2001. Gastrin, somatostatin and infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Acta Paediatr.* 90(8):879-82.
- Dorgan, J.F., Fears, T.R., McMahon, R.P., Aronson Friedman, L., Patterson, B.H., Greenhut, S.F. 2002. Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. *Steroids.* 67(3-4):151-8.

Elmlinger, M.W., Kuhnel, W., Ranke, M.B. 2002. Reference ranges for serum concentrations of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), cortisol and ferritin in neonates, children and young adults. *Clin Chem Lab Med.* 40(11):1151-60.

Emmen, J.M., McLuskey, A., Adham, I.M., Engel, W., Grootegoed, J.A., Brinkmann, A.O. 2000. Hormonal control of gubernaculum development during testis descent: gubernaculum outgrowth in vitro requires both insulin-like factor and androgen. *Endocrinology.* 141(12):4720-7.

Fernández-Toral, J., Álvarez-Berciano, F., Barreiro, J., Bousoño, C., Llorian, M.R. 2005. Estenosis hipertrófica del píloro y macrosomía relativa al nacimiento. Estudio estadístico de 88 casos. *Bol Pediatr.* 45: 43-5.

Fuqua, J.S., Sher, E.S., Migeon, C.J., Berkovitz, G.D. 1995. Assay of plasma testosterone during the first six months of life: importance of chromatographic purification of steroids. *Clin Chem.* 41(8 Pt 1):1146-9.

Gad, Y.Z., Mazen, I., Lumbroso, S., Temtamy, S.A., Sultan, C. 2003. A novel point mutation of the androgen receptor (F804L) in an Egyptian newborn with complete androgen insensitivity associated with congenital glaucoma and hypertrophic pyloric stenosis. *Clin Genet.* 63(1):59-63.

Gassler, N., Peuschel, T., Pankau, R. 2000. Pediatric reference values of estradiol, testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin. *Clin Lab.* 46(11-12):553-60.

Gentile, C., Romeo, C., Impellizzeri, P., Turiaco, N., Esposito, M., Di Mauro, D., Mondello, M.R. 1998. A possible role of the plasmalemmal cytoskeleton, nitric oxide synthase, and innervation in infantile hypertrophic pyloric stenosis. A confocal laser scanning microscopic study. *Pediatr Surg Int.* 14(1-2):45-50.

Gómez-Alcalá, A.V. 1999. Predominio masculino y peso al nacer en estenosis hipertrófica del píloro. *Gac Med Mex.* 136(4):329-34.

- González-Montelongo, M.C., Marín, R., Gómez, T., Díaz, M. 2006. Androgens differentially potentiate mouse intestinal smooth muscle by nongenomic activation of polyamine synthesis and Rho kinase activation. *Endocrinology*. 147(12):5715-29.
- Guarino, N., Yoneda, A., Shima, H., Puri, P. 2001. Selective neurotrophin deficiency in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg*. 36(8):1280-4.
- Guarino, N., Shima, H., Oue, T., Puri, P. 2000. Glial-derived growth factor signaling pathway in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg*. 35(6):835-9.
- Haahr, P., Nielsen, J.P. 2000. [Infantile hypertrophic pyloric stenosis. A 25-year study from the county of Viborg]. *Ugeskr Laeger*. 162: 3456-9.
- Habbick, B.F., Khanna, C., To, T. 1989. Infantile hypertrophic pyloric stenosis: a study of feeding practices and other possible causes. *CMAJ*. 140(4):401-4.
- Hauben, M., Amsden, G.W. 2002. The association of erythromycin and infantile hypertrophic pyloric stenosis: causal or coincidental? *Drug Saf*. 25(13):929-42.
- Hedback, G., Abrahamsson, K., Husberg, B., Granholm, T., Oden, A. 2001. The epidemiology of infantile hypertrophic pyloric stenosis in Sweden 1987-96. *Arch Dis Child*. 85(5):379-81.
- Hernanz-Schulman, M., Lowe, L.H., Johnson, J., Neblett, W.W., Polk, D.B., Perez, R. Jr, Scheker, L.E., Stein, S.M., Heller, R.M., Cywes, R. 2001. In vivo visualization of pyloric mucosal hypertrophy in infants with hypertrophic pyloric stenosis: is there an etiologic role? *AJR Am J Roentgenol*. 177(4):843-8.
- Hu, M., Craig, J., Howard, N., Kan, A., Chaitow, J., Little, D., Alexander, S.I. 2004. A novel mutation of WT1 exon 9 in a patient with Denys-Drash syndrome and pyloric stenosis. *Pediatr Nephrol*. 19(10):1160-3.
- Huang, Y.C., Su, B.H. 2004. Medical treatment with atropine sulfate for hypertrophic pyloric stenosis. *Acta Paediatr Taiwan*. 45(3):136-40.

Iwai, N., Nanri, M., Hashimoto, K., Kaneda, H., Majima, S. 1984. Serum gastrin levels and lower oesophageal sphincter pressures in infants with congenital hypertrophic pyloric stenosis. *Z Kinderchir.* 39(4):234-6.

Jabłoński, J., Gawrońska, R., Gawłowska, A., Kobos, J., Andrzejewska, E. 2006. Study of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and platelet-derived endothelial cell growth factor (PDEGF) expression in children with infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Med Sci Monit.* 12(1):CR27-30.

James, W.H. 2004. Evidence that intrauterine and postnatal androgens affect the development of pyloric stenosis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 70(1): 37-9.

Jedd, M.B., Melton, L.J.^{3rd}., Griffin, M.R., Kaufman, B.H., Hoffman, A.D., Broughton, D.D., O'Brien, P.C. 1988. Trends in infantile hypertrophic pyloric stenosis in Olmsted County, Minnesota, 1950-1984. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2: 148-57.

Jedd, M.B., Melton, L.J. ^{3rd}., Griffin, M.R., Kaufman, B., Hoffman, A.D., Broughton, D., O'Brien, P.C. 1988. Factors associated with infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Am J Dis Child.* 142(3):334-7.

Kobayashi, H., Miyahara, K., Yamataka, A., Lane, G.J., Sueyoshi, N., Miyano, T. 2001. Pyloric stenosis: new histopathologic perspective using confocal laser scanning. *J Pediatr Surg.* 36(8):1277-9.

Kobayashi, H., O'Briain, D.S., Puri, P. 1995. Immunochemical characterization of neural cell adhesion molecule (NCAM), nitric oxide synthase, and neurofilament protein expression in pyloric muscle of patients with pyloric stenosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 20(3):319-25.

Kobayashi, H., O'Briain, D.S., Puri, P. 1994. Selective reduction in intramuscular nerve supporting cells in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg.* 29(5):651-4.

Kratzsch, J., Keller, E., Hoepffner, W., Muller, G., Reich, A., Meyer, K., Kiess, W. 2001. The DSL analog free testosterone assay: serum levels are not related to sex hormone-binding globulin in normative data throughout childhood and adolescence. *Clin Lab.* 47(1-2):73-7.

Krone, N., Hanley, N.A., Arlt, W. 2007. Age-specific changes in sex steroid biosynthesis and sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 21(3):393-401.

Kusafuka, T., Puri, P. 1997. Altered messenger RNA expression of the neuronal nitric oxide synthase gene in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int.* 12(8):576-9.

Lammer, E.J., Edmonds, L.D. 1987. Trends in pyloric stenosis incidence, Atlanta, 1968 to 1982. *J Med Genet.* 24: 482-7.

Langer, J.C., Berezin, I., Daniel, E.E. 1995. Hypertrophic pyloric stenosis: ultrastructural abnormalities of enteric nerves and the interstitial cells of Cajal. *J Pediatr Surg.* 30(11):1535-43.

Louik, C., Werler, M.M., Mitchell, A.A. 2002. Erythromycin use during pregnancy in relation to pyloric stenosis. *Am J Obstet Gynecol.* 186(2):288-90.

Maccoby, E.E., Doering, C.H., Jacklin, C.N., Kraemer, H. 1979. Concentrations of sex hormones in umbilical cord-blood: their relation to sex and birth order of infants. *Human Dev.* 50: 632-42.

MacMahon, B. 2006. The continuing enigma of pyloric stenosis of infancy: a review. *Epidemiology.* 17(2):195-201.

Mahon, B.E., Rosenman, M.B., Kleiman, M.B. 2001. Maternal and infant use of erythromycin and other macrolide antibiotics as risk factors for infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr.* 139(3):380-4.

Main, K.M., Schmidt, I.M., Skakkebaek, N.E. 2000. A possible role for reproductive hormones in newborn boys: progressive hypogonadism without the postnatal testosterone peak. *J Clin Endocr Metab.* 85: 4905-7.

- Martinez-Urrutia, M.J., Lassaletta, L., Lama, R., Barrios, V., Tovar, J.A. 1995. Gastric somatostatin content and binding in children with hypertrophic pyloric stenosis: a long-term follow-up study. *J Pediatr Surg.* 30(10):1443-6.
- Mayes, J.S., Watson, G.H. 2004. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev.* 5(4):197-216.
- Mitchell, L.E., Risch, N. 1993. The genetics of infantile hypertrophic pyloric stenosis. A reanalysis. *Am J Dis Child.* 147(11):1203-11.
- Miyazaki, E., Yamataka, T., Ohshiro, K., Taira, Y., Puri, P. 1998. Active collagen synthesis in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int.* 13(4):237-9.
- Nielsen, J.P., Haahr, P., Haahr, J. 2000. Infantile hypertrophic pyloric stenosis. Decreasing incidence. *Dan Med Bull.* 47: 223-5.
- Novotny, M., Wilson, D.H. 2005. Testosterone testing: an immunoassay with improved accuracy in samples from both males and females. *Clinical Laboratory International.* http://www.clionline.com/uploads/tx_ttproducts/datasheet/testosterone-testing-an-immunoassay-with-improved-accuracy-in-samples-from-both-males-and-females.pdf
- Ohshiro, K., Puri, P. 1998. Increased insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor system in the pyloric muscle in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg.* 33(2):378-81.
- Ono, M., Maruyama, T., Masuda, H., Kajitani, T., Nagashima, T., Arase, T., Ito, M., Ohta, K., Uchida, H., Asada, H., Yoshimura, Y., Okano, H., Matsuzaki, Y. 2007. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20;104(47):18700-5.
- Osifo, D.O., Evbuomwan, I. 2008. Does Exclusive Breastfeeding Confer Protection Against Infantile Hypertrophic Pyloric Stenosis? A 30-year Experience in Benin City, Nigeria. *J Trop Pediatr.* .

- Oue, T., Puri, P. 1999. Smooth muscle cell hypertrophy versus hyperplasia in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Res.* 45(6):853-7.
- Oue, T., Puri, P. 1999. Abnormalities of elastin and elastic fibers in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int.* 15(8):540-2.
- Paredes-Esteban, R.M., Salas-Molina, J., Ocana-Losa, J.M., Garcia-Ruiz, M. 2003. Immunohistochemical study of hypertrophic pyloric stenosis. *Cir Pediatr.* 16(2):61-5.
- Pasqualini, J.R. 2005. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 97(5):401-15.
- Paulozzi, L.J. 2000. Is Helicobacter pylori a cause of infantile hypertrophic pyloric stenosis? *Med Hypotheses.* 55(2):119-25.
- Pedersen, R.N., Garne, E., Loane, M., Korsholm, L., Husby S., EUROCAT Working Group. 2008. Infantile hypertrophic pyloric stenosis: a comparative study of incidence and other epidemiological characteristics in seven European regions. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 21(9):599-604.
- Piotrowska, A.P., Solari, V., Puri, P. 2003. Distribution of heme oxygenase-2 in nerves and interstitial cells of Cajal in the normal pylorus and in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Arch Pathol Lab Med.* 127(9):1182-6.
- Pitukcheewanont, P., Nimkarn, S., Austin, J., Sack, Z., Fisher, L.K. 2006. Salt-wasting 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia and pyloric stenosis in two Hispanic brothers. *J Pediatr.* 149(2):268-70.
- Quigley, C.A. 2002. The postnatal gonadotropin and sex steroid surge-Insights from the androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:124-8
- Pueyo Gil, C., Oshiro, K., Elias-Pollina, J., Esteban-Ibarz, J.A., Puri, P. 2001. Increase of the chondroitin-sulfate proteoglycan, fibronectin and fibroblasts in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Cir Pediatr.* 14(3):103-7.

Rainey, W.E., Rehman, K.S., Carr, B.R. 2004. The human fetal adrenal: making adrenal androgens for placental estrogens. *Semin Reprod Med.* 22(4):327-36.

Rasmussen, L., Green, A., Hansen, L.P. 1989. The epidemiology of infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Int J Epidemiol.* 18: 413-7.

Reyna, T.M., Otero, C., Weir, M.R. 1987. Epidemiological survey of 6 years' federal health service experience of pyloric stenosis: case report of presentation in a 26-month male. *Clin Pediatr (Phila).* 26: 412-4.

Rodríguez, G., Samper, M.P., Ventura, P., Moreno, L.A., Olivares, J.L., Pérez-González, J.M. 2004. Gender differences in newborn subcutaneous fat distribution. *Eur J Pediatr.* 163(8):457-61.

Rogers, I.M. 2006. The true cause of pyloric stenosis is hyperacidity. *Acta Paediatr.* 95(2):132-6.

Schechter, R., Torfs, C.P., Bateson, T.F. 1997. The epidemiology of infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 11: 407-27.

Sherwood, W., Choudhry, M., Lakhoo, K. 2007. Infantile hypertrophic pyloric stenosis: an infectious cause? *Pediatr Surg Int.* 23(1):61-3.

Shima, H., Ohshiro, K., Puri, P. 2000. Increased local synthesis of epidermal growth factors in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Res.* 47(2):201-7.

Shima, H., Puri, P. 1999. Increased expression of transforming growth factor-alpha in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int.* 15(3-4):198-200.

Shinkawa, O., Furuhashi, N., Fukaya, T., Kono, H., Tachibana, Y., Takahashi, T., Suzuki, M. 1983. [A study on testosterone secretion in neonates]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 35(3):266-8.

Simmons, D., France, J.T., Keelan, J.A., Song, L., Knox, B.S. 1994. Sex differences in umbilical cord serum levels of inhibin, testosterone, oestradiol, dehydroepiandrosterone sulphate, and sex hormone-binding globulin in human term neonates. *Biol Neonate.* 65(5):287-94.

- Singh, R., Bhasin, S., Braga, M., Artaza, J.N., Pervin, S., Taylor, W.E., Krishnan, V., Sinha, S.K., Rajavashisth, T.B., Jasuja, R. 2009. Regulation of myogenic differentiation by androgens: cross talk between androgen receptor/ beta-catenin and follistatin/transforming growth factor-beta signaling pathways. *Endocrinology*. 150(3):1259-68.
- Singh, S.J., Trudinger, B., Lam, A., Zhang, A.L., Cass, D. 2001. Antenatal prediction of hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int*. 17(7):560-2.
- Sinisi, A.A., Pasquali, D., Notaro, A., Bellastella, A. 2003. Sexual differentiation. *J Endocrinol Invest*. 26(3 Suppl):23-8.
- Sorensen, H.T., Skriver, M.V., Pedersen, L., Larsen, H., Ebbesen, F., Schonheyder, H.C. 2003. Risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis after maternal postnatal use of macrolides. *Scand J Infect Dis*. 35(2):104-6.
- Spicer, R.D. 1982. Infantile hypertrophic pyloric stenosis. A review. *Br J Surg*. 69: 128-35.
- Sretenovic, A., Smoljanic, Z., Korac, G., Sindjec, S., Lukac, M., Krstic, Z. 2004. Conservative treatment of hypertrophic pyloric stenosis in children. *Srp Arh Celok Lek*. 132 Suppl 1:93-6.
- Stanczyk, F.Z., Cho, M.M., Endres, D.B., Morrison, J.L., Patel, S., Paulson, R.J. 2003. Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. *Steroids*. 68(14):1173-8.
- Subramaniam, R., Doig, C.M., Moore, L. 2001. Nitric oxide synthase is absent in only a subset of cases of pyloric stenosis. *J Pediatr Surg*. 36(4):616-9.
- Sy, E.D., Shan, Y.S., Lin, C.H., Lin, P.W. 2004. Immature intrinsic nerve innervations of pyloric muscle in idiopathic hypertrophic pyloric stenosis. *Formos Med Assoc*. 103(7):558-61.
- Taieb, J., Mathian, B., Millot, F., Patricot, M.C., Mathieu, E., Queyrel, N., Lacroix, I., Somma-Delpero, C., Boudou, P. 2003. Testosterone measured by 10

immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin Chem.* 49(8):1381-95.

Tashjian, D.B., Konefal, S.H. 2002. Hypertrophic pyloric stenosis in utero. *Pediatr Surg Int.* 18(5-6):539-40.

To, T., Wajja, A., Wales, P.W., Langer, J.C. 2005. Population demographic indicators associated with incidence of pyloric stenosis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 159(6):520-5.

Tomlinson, C., Macintyre, H., Dorrian, C.A., Ahmed, S.F., Wallace, A.M. 2004. Testosterone measurements in early infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 89(6):F558-9.

Troisi, R., Potischman, N., Roberts, J., Siiteri, P., Daftary, A., Sims, C., Hoover, R.N. 2003. Associations of maternal and umbilical cord hormone concentrations with maternal, gestational and neonatal factors (United States). *Cancer Causes Control.* 14(4):347-55.

Vanderwinden, J.M., Liu, H., De Laet, M.H., Vanderhaeghen, J.J. 1996. Study of the interstitial cells of Cajal in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Gastroenterology.* 111(2):279-88.

Velaoras, K., Bitsori, M., Galanakis, E., Charissis, G. 2005. Hypertrophic pyloric stenosis in twins: same genes or same environments? *Pediatr Surg Int.* 21(8):669-71.

Wang, J., Waller, D.K., Hwang, L.Y., Taylor, L.G., Canfield, M.A. 2008. Prevalence of infantile hypertrophic pyloric stenosis in Texas, 1999-2002. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 82(11):763-7.

Wang, Y.M., Hsu, K.T., Tsao, L.Y. 1998. Levels of gonadotropins and adrenocortical hormones in newborns. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi.* 39(6):389-92.

- White, J.S., Clements, W.D., Heggarty, P., Sidhu, S., Mackle, E., Stirling, I. 2003. Treatment of infantile hypertrophic pyloric stenosis in a district general hospital: a review of 160 cases. *J Pediatr Surg.* 38(9):1333-6.
- White, P.C. 2006. Ontogeny of adrenal steroid biosynthesis: why girls will be girls. *J Clin Invest.* 116(4):872-4.
- Wu, H., Ramsay, C., Ozaeta, P., Liu, L., Aboleneen, H. 2002. Serum estradiol quantified by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry. *Clinical Chemistry.* 48: 364-66.
- Yamataka, A., Fujiwara, T., Kato, Y., Okazaki, T., Sunagawa, M., Miyano, T. 1996. Lack of intestinal pacemaker (C-KIT-positive) cells in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg.* 31(1):96-8; discussion 98-9.
- Yen, J.B., Kong, M.S., Wu, W.J., Huang, C.S., Chang, K.W. 2003. Idiopathic hypertrophic pyloric stenosis in identical twins. *Chang Gung Med J.* 26(12):933-6.