Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Prolactina : Regulación neuroendócrina

Arakelian, María Cristina

1981

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Arakelian, María Cristina. (1981). Prolactina : Regulación neuroendócrina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1714_Arakelian.pdf

Cita tipo Chicago:
Arakelian, María Cristina. "Prolactina : Regulación neuroendócrina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1714_Arakelian.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Prolactina : Regulación Neuroendócrina

Autor : Lic. María Cristina Arakelian

Director : Prof. Dr. Carlos Libertun

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

- 1981 -

Instituto de Biología y Medicina Experimental.
Obligado 2490, 1428 Buenos Aires, Argentina.

1714
cj·2

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Libertun por el aporte de sus conocimientos, pero por sobre todo, por su apoyo y constante estímulo para la realización de estos trabajos.

A mis compañeros del Laboratorio de Neuroendocrinología y en especial al Lic. Gustavo A. Larrea,por su desinteresada colaboración y apoyo.

A todos los miembros del Instituto de Biología y Medicina Experimental, por sus condiciones de solidaridad y por crear el adecuado ambiente científico que facilitó nuestros trabajos.

Al Dr. Alejandro F. de Nicola y a la Lic. Liliana S. Weisenberg, por su colaboración en la realización de los experimentos de receptores hormonales.

Al Dr. Virgilio G. Foglia, por su constante estímulo.

A mi familia, por su comprensión, solidaridad y amor.

I N D I C E

	pág.
1 Introducción	1
2 Reseña anátomo funcional del hipotálamo	1
3 Hormonas hipotalámicas	6
4 Neurotrasmisores hipotalámicos	10
4.1. Histamina	12
4.2. Acido gamma aminobutírico (GABA)	13
5 Prolactina	13
5.1. Importancia de su estudio	13
5.2. Histofisiología de la célula prolactínica	16
5.3. Química	16
5.4. Cuantificación	18
5.5. Prolactina circulante	22
5.6. Mecanismos básicos de regulación de su secreción	24
6 Objetivos experimentales	29
7 Material, métodos y experimentos preliminares	32
7.1. Animales	32
7.2. Técnicas y microtécnicas quirúrgicas	32
7.2.1. Ovariectomía	32
7.2.2. Cateter intravascular	32

pág.

7.2.3. Técnicas estereotáxicas 33

7.2.3.1. Lesiones electrolíticas 33

7.2.3.2. Cánula de acero en el III ventrículo cerebral 34

7.2.4. Incubación 34

7.2.5. Injertos hipofisarios 35

7.2.6. Recolección de muestras 36

7.2.6.1. Sanguíneas 36

7.2.6 2. Tisulares 36

7.3. Determinaciones bioquímicas 37

7.3.1. Síntesis de proteínas totales 37

7.3.2. Receptores hormonales en hipotálamo, otras áreas neurales e hipófisis 38

7.3.3. Captación hormonal in vivo en hipotálamo, otras regiones neurales e hipófisis 40

7.4. Radioinmunoanálisis 40

7.4.1. Prolactina 41

7.4.2. Hormona luteinizante 43

7.5. Situaciones experimentales 45

7.5.1. Animales adultos 45

pág.

7.5.2. Modelos hiperprolactinémicos 46

7.5.2.1. Reflejo de succión 46

7.5.2.2. Stress experimental 48

7.5.2.3. Injerto hipofisario prolactinosecretor 48

7.5.2.4. Desconexión hipotálamo hipofisaria 48

7.6. Materiales radioactivos 49

7.7. Tratamientos farmacológicos 49

7.7.1. Drogas histaminérgicas 49

7.7.2. Drogas GABAérgicas 50

7.8. Análisis estadísticos 51

8 Resultados 53

8.1. Estudios mediante neurofármacos 53

8.1.1. Histamina hipotalámica 53

8.1.1.1. Madres en el postparto, con y sin succión 53

8.1.1.1.1. Valores basales 53

8.1.1.1.2. Bloqueantes H1:difenhidramina y mepiramina 53

8.1.1.1.3. Bloqueantes H2: metiamida 54

8.1.1.1.4. Histamina: microinyección intraventricular 55

pág.

8.1.1.1.5. Agonistas H2:4 metilhistamina 55

8.1.1.2. Ratas ovariectomizadas estrogenizadas 55

8.1.1.2.1. Bloqueantes H2: cimetidina *in vivo* 55

8.1.1.2.2. Agonistas muscarínicos y antihistamínicos 56

8.1.1.2.3. Cimetidina *in vitro* 56

8.1.2. GABA hipotalámico 56

8.1.2.1. Madres en el postparto, con o sin succión 57

8.1.2.1.1. GABA: microinjección intraventricular 57

8.1.2.1.2. Acido aminooxiacético (AAOA) 57

8.1.2.2. Stress experimental en ratas machos 57

8.1.2.2.1. GABA exógeno 57

8.1.2.2.2. GABA endógeno (tratamiento con ácido aminooxiacético) 58

8.2. Destrucción experimental del hipotálamo medio basal 58

8.2.1. Unión de ^{3}H-estradiol en hipotálamo e hipófisis anterior 58

pág.

8.2.2. Efecto del tiempo de lesión 59

8.2.3. Análisis de Scatchard 59

8.2.4. Captación in vivo de ^{3}H-estradiol en el hipotálamo, otras áreas neurales e hipófisis 60

8.2.5. Síntesis de proteínas hipotalámicas e hipofisarias 60

8.2.6. Efecto de la bromoergocriptina en animales con destrucción del hipotálamo medio basal 61

8.2.7. Efecto de la bromoergocriptina en animales con la unidad hipotálamo hipofisaria intacta 61

8.2.8. Efecto de la hiperprolactinemia por injerto de hipófisis 61

9 Discusión y Conclusiones 86

10 Resumen 102

11 Bibliografía 103

1 Introducción

La neuroendocrinología se ocupa del estudio de las interrelaciones entre los sistemas nervioso y endócrino. Ambos son los integradores primordiales de las funciones orgánicas.
Su estudio es fundamental para la comprensión íntima de los mecanismos de regulación homeostáticos.
Las relaciones anatómicas y funcionales entre el sistema nervioso y las glándulas de secreción interna son múltiples y complejas.
Una de gran importancia y que mayor atención ha merecido,es la relación hipotálamo hipofisaria. Precisamente, el presente trabajo está dedicado a dilucidar un aspecto de esta interrelación: el control neuroendócrino de la secreción prolactínica.

2 Reseña anátomo funcional del hipotálamo

El hipotálamo es un área sumamente compleja derivada casi en su totalidad del diencéfalo y que ocupa la región ventromediana del mismo, en estrecha vecindad con la hipófisis. Comprende la zona gris que rodea ventralmente, por debajo del surco hipotalámico, al tercer ventrículo. Sus límites anterior y posterior están dados por sendos planos frontales, pasando el primero por delante del quiasma óptico y comisura anterior y el segundo, por detrás de los cuerpos mamilares.
Lateralmente limita con el tálamo ventral, el ansa pedúncularis, la cápsula interna, el globus pallidus y el tracto óptico. Ventralmente adquiere una disposición infundibular (infundibulum) que se continúa

con el tallo hipofisario. Entre el infundibulum y el tallo existe una pequeña prominencia; la eminencia media del tuber cinereum, que hace cierto relieve en el piso del tercer ventrículo. Las neu ronas hipotalámicas están distribuidas dentro de estos límites cons tituyendo en algunos casos núcleos bien definidos, pero la mayoría de ellas se agrupan en acúmulos de límites poco netos y con variaciones según la especie estudiada.

Le Gross Clark dividió el hipotálamo en tres regiones frontales: preóptica, tuberalis y mamilaris (1, 2). En la región hipotalámica anterior, preóptica supraquiasmática, hallamos las siguientes áreas y núcleos: las áreas preóptica e hipotalámica anterior con neuronas pequeñas de escaso material basófilo y gran cantidad de vesículas visibles al microscopio electrónico. El núcleo supraóptico se extiende anteroposteriormente cabalgando sobre el extremo lateral del quiasma; está compuesto por neuronas grandes con material Gomori positivo. Los axones de éstas terminan en la neurohipófisis luego de atravesar la zona interna de la eminencia media (haz supraóptico-neurohipofisario). El nucleo paraventricular es dorsal y posterior al anterior y adyacente al tercer ventrículo. De él, emerge el haz paraventrículo-neurohipofisario. El núcleo supraquiasmático es un cúmulo de células medianas de citoplasma claro extendidas lateralmente al extremo ventral del tercer ventrículo. Existen además un conjunto de neuronas pequeñas que rodean a esta cavidad: el núcleo parvocelular periventricular.

En la región hipotalámica media o tuberal encontramos las áreas

hipotalámicas lateral y dorsal conteniendo neuronas medianas que no adoptan una disposición definida. Por fuera de la capa ependimaria se destacan los núcleos dorsomediano y ventromediano. El núcleo arcuato contiene un importante conjunto de neuronas ricas en catecolaminas, dispuestas a ambos lados y por debajo del ventrículo a nivel del infundibulum (3). Envía un manojo de fibras que terminan en estrecho contacto con los capilares del plexo primario del sistema porta en la zona externa de la eminencia media (haz túbero-infundibular).

En la región hipotalámica posterior o mamilar se destacan el área supramamilar y el complejo mamilar con una porción medial de neuronas grandes y medianas y otra lateral de células pequeñas en agrupación compacta. Las restantes agrupaciones mamilares están constituidas por neuronas medianas y pequeñas.

Las conexiones del hipotálamo son múltiples y complejas (4). Este, como centro neuroanatómico primario de la regulación endócrina, se relaciona mediante vías aferentes y eferentes con el sistema límbico, el polo frontal, la cara inferior del cerebro y con los centros mesencefálicos y la sustancia reticular del tallo encefálico. Estas profusas conexiones constituyen la base anatómica que sustenta la función de estos centros neuroanatómicos secundarios en la regulación endócrina.

Una particular importancia tienen las vías eferentes hacia la hipófisis. El haz hipotálamo-hipofisario está constituido por las

fibras supraóptico y paraventrículo neurohipofisarias que atravie san la zona interna dorsal o subventricular de la eminencia media. El tracto túbero-hipofisario o túbero infundibular lo componen fibras que saliendo del núcleo arcuato llegan a la zona externa de la eminencia media en estrecho contacto con los capilares del ple xo portal primario (5).

Macroscópicamente, la hipófisis se une a la cara inferior del hipotálamo mediante el tallo glandular compuesto por una porción adenohipofisaria, la pars tuberalis y otra neurohipofisaria: el tallo infundibular y la eminencia media. La porción de origen ner vioso se halla íntimamente relacionada con el diencéfalo por medio de los haces supraóptico y paraventrículo-neurohipofisario y túbero infundibular. En cambio, la derivada del ectodermo bucal recibe escasos filetes nerviosos (5, 6).

Estas dos porciones también difieren notablemente en su vascularización. La neurohipófisis está irrigada por las arterias hipofisarias inferiores, ramas de la carótida, las que se dividen en capilares que son continuados por el sistema venoso. La vascularización de la adenohipófisis adquiere características peculiares: las arterias hipofisarias superiores se capilarizan y anastomosan determinando a nivel de la eminencia media una importante red vascular: el plexo capilar primario.

Estos capilares se unen nuevamente emitiendo los vasos portales largos, quienes a través del tallo glandular llegan a la pars distalis. Aquí se dividen en capilares sinusoides que se hallan en es

trecho contacto con las células parenquimatosas; constituyen el plexo capilar secundario. Queda así determinado una circulación tipo portal: capilares-vasos portales-sinusoides. Existe un segundo plexo capilar primario en el límite inferior del tallo infundibular que drena a través de los vasos portales cortos, totalmente intraglandulares, hacia el único plexo sinusoidal. Este se continúa por venas cortas hacia los senos venosos adyacentes. Existe un par de arterias, ramas de las hipofisarias superiores que llegan directamente a la pars distalis (arterias de la trabécula) (7).

El sentido descendente de la circulación portal, desde la eminencia media hacia la pars distalis, fue dilucidada por Houssay y col., estudiándola en anfibios (8). Trabajos posteriores confirman el sentido de este torrente en una gran variedad de especies (7, 9). De ello resulta que la sangre que irriga las células adenohipofisarias pasa previamente por los capilares existentes en el tejido neural. Evidencias recientes parecen indicar la coexistencia de una pequeña corriente ascendente (10). Ella podría explicar ciertos aspectos de la acción directa de las hormonas hipofisarias sobre el hipotálamo. Si bien aún se desconocen los factores locales y generales que regulan la circulación portal, nos parece adecuada la denominación dada por Greep al llamarla vía final común desde el sistema nervioso central hacia la hipófisis, y que constituye el sustrato anatómico para el control humoral del encéfalo sobre la glándula (11).

Las funciones atribuidas al hipotálamo son múltiples y sólo parcialmente conocidas. Ha sido considerado como el área cerebral donde se integran funciones vegetativas altamente organizadas. De allí que los estudios experimentales y clínicos lo han relacionado prácticamente con cada aparato y sistema orgánicos. Las funciones más claramente dilucidadas lo relacionan con la regulación de la temperatura corporal, del metabolismo hidrosalino, de la ingesta y el metabolismo, de la función digestiva y circulatoria. También influye profundamente en otras funciones neurológicas y psíquicas.

Pero de todas ellas, las funciones relacionadas con las secreciones internas son las mejor conocidas y con mayores avances recientes. En efecto, la íntima relación anatómica y funcional del hipotálamo y la hipófisis es tal vez la base más importante de la neuroendocrinología (12).

3 Hormonas hipotalámicas

La influencia que el hipotálamo ejerce sobre la adenohipófisis, y por su intermedio sobre el sistema endócrino, es mediada por mensajeros químicos. Estos son transportados por un circuito sanguíneo particular como es el portal hipofisario, que lleva la sangre desde la eminencia media hasta los sinusoides anterohipofisarios. De acuerdo con la teoría original de Harris de la quimiotransmisión portal, estos factores u hormonas serían sintetizados por neuronas hipota

lámicas y luego vertidas por sus terminaciones en el plexo capilar del sistema portal existente en la eminencia media (13). A través de esta circulación, descienden hasta las células adenohipofisarias para controlar la liberación hormonal. Cada hormona anterohipofisaria tendría una o más hormona hipotalámica que la regula (14). La nomenclatura de estas hormonas ha sido recientemente reconsiderada. Se recomienda llamarlas mediante una palabra constituida por un prefijo que indica la hormona hipofisaria a la que regula y un sufijo que indica el efecto liberador (liberina) o inhibidor (estatina) que ejerce. Por ejemplo, la hormona hipotalámica que inhibe la secreción de somatotrofina se llama somatostatina, la que libera tirotrofina se denomina tiroliberina. Hoy conocemos la composición química de tres de estas hormonas: la tiroliberina (o TRH o TRF) la primera descripta, es un tripéptido; la luliberina (LHRF, GnRH LRF), es un decapéptido y la somatostatina (GHIF, SIF, SRIF, SRIH) , es un tetradecapéptido. Existen otros miembros de esta nueva familia hormonal de estructura química aún desconocida : corticoliberina (CRF) que libera corticotrofina; somatoliberina, que libera somatotrofina; prolactostatina, que inhibe la secreción prolactínica y posiblemente una prolactoliberina y hormonas hipotalámicas que liberan o inhiben la secreción de hormona melanocito dispersante (12, 15, 16, 17, 18).

Es posible mediante ensayos biológicos o radioinmunológicos, cuantificar estas hormonas hipotalámicas (19). Su mayor concentración se encuentra en el hipotálamo y sobre todo en la eminencia

media, pero también se hallan en áreas extrahipotalámicas. Debido a la gran masa tisular extrahipotalámica, una llamativa proporción de hormonas hipotalámicas se encuentran fuera del hipotálamo. Por ejemplo, tres cuartas partes o más de la tiroliberina o la luliberina existente en el encéfalo de mamífero es extrahipotalámica (15).

Estas hormonas se sintetizan en el tejido hipotalámico aunque posiblemente también en otras regiones neurales. Según Knigge estas hormonas podrían sintetizarse en parte extrahipotalámicamente para ser vertidas al líquido cefalorraquídeo (20). Serían luego captadas por células ependimarias especializadas, los tanicitos, las que debido a su bipolaridad funcional, la liberarían hacia el plexo primario de la eminencia media.

Posiblemente, la teoría de la quimiotransmisión portal clásica de Harris y la hipótesis de los tanicitos son complementarias, lo evidente es que el hipotálamo y el sistema portal hipofisario constituyen la vía final común desde el encéfalo hacia la adenohipófisis (11, 15).

Mediante técnicas inmunocitoquímicas, se ha establecido que las neuronas que secretan luliberina poseen sus cuerpos neuronales en las áreas preópticas, hipotalámica anterior y arcuata y que sus axones convergen hacia la eminencia media. Las neuronas con tiroliberina se hallan en el núcleo dorsomediano y sus adyacencias y en el arcuato; sus axones se proyectan a la eminencia media. La somatostatina es liberada en la eminencia media del tuber cinereum por las terminaciones de neuronas cuyos cuerpos se hallan en las

áreas hipotalámicas anterior y preóptica. La localización de las restantes hormonas hipotalámicas es aún incierta. Es necesario dilucidar con certeza su estructura química y luego aplicar técnicas de localización (21).

Se ha descripto la presencia de hormonas peptídicas hipotalámicas en regiones ajenas al SNC. La más claramente demostrable es la somatostatina, que se halla ricamente concentrada en el tracto gastrointestinal y en el páncreas. Pero más sorprendente aún es hallar estos péptidos en especies filogenéticamente primitivas y que carecen de la hormona a la que básicamente controlarían. Por ejemplo, es posible cuantificar por radioinmunoanálisis tiroliberina (TRH) en el tejido neural de especies que carecen de tirotrofina y más aún, de pituitaria (15, 22).

Sumados a estos conceptos sobre la distribución anatómica y filogenética de las hormonas hipotalámicas, debemos considerar algunos aspectos funcionales. Primariamente, las hormonas hipotalámicas naturales o aquelas sintetizadas, actúan sobre una hormona hipofisaria; son suficientes algunos nano o microgramos para ejercer sus efectos endócrinos. Pero la luliberina libera LH y FSH; tiroliberina libera tirotrofina y prolactina y la somatostatina inhibe la liberación de somatotrofina y en ciertas condiciones, a la prolactina y a la tirotrofina. También puede inhibir a la insulina. glucagon, gastrina, entre otras.

Podemos decir entonces que las hormonas hipotalámicas de naturaleza química ya dilucidadas, son efectivas a muy bajas dosis, pero

su especificidad es limitada: actúan primordialmente sobre una hormona hipofisaria, pero también sobre otras. Más aún, las hormonas hipotalámicas hipofisotropas han revelado poseer claras funciones no endócrinas. Algunas de ellas pueden provocar cambios conductales sexuales, del sueño, la alimentación, la motricidad; pueden modificar el efecto de algunos neurofármacos o la metabolización de neurotrasmisores, así como los potenciales de membrana neuronales (16, 23). Por su distribución, evolución filogenética y múltiples acciones, las hormonas hipotalámicas son péptidos de enorme significado funcional. Una de ellas, la primera en conocerse pero no la única, es la endócrina.

4 Neurotrasmisores hipotalámicos

Un concepto de importancia es que la neurona que produce hormonas y las vierte al medio interno, recibe información de otras neuronas a través de sinapsis químicas, las que regulan su función. En el concepto de Wurtman, la neurona secretora es un "transductor", ya que la información que recibe de otras neuronas (neuroinformación) las "transduce" como un producto de secreción interna (secreción) (24). Esto explica porqué las drogas neurotrópicas, sobre todo las que mimetizan o inhiben a los neurotrasmisores, pueden modificar la actividad hipotalámica y consecuentemente, el control de la secreción hipofisaria (3, 12, 15, 21, 25, 26, 27, 28).

Los neurotrasmisores cumplen un papel fundamental en el hipotá-

lamo normal o enfermo, de allí la importancia de su conocimiento. Las catecolaminas, dopamina, noradrenalina y adrenalina, son sintetizadas en el tejido neural a partir de la L-tirosina. Neuronas dopaminérgicas y sus terminaciones se hallan en estructuras límbicas y diencefálicas.

La concentración de dopamina de la eminencia media es una de las mayores del cerebro; también es alta en las regiones retroquiasmática, arcuata, ventromedial, dorsomedial y paraventricular. Las neuronas se hallarían agrupadas en tres vías dopaminérgicas relativamente independientes: la tuberoinfundibular, la incertohipotalámica y la mesolímbica. La primera es la de mayor interés en nuestro trabajo. La constituyen las neuronas del núcleo arcuato cuyo corto axon termina en la capa externa de la eminencia media en estrecho contacto con el plexo capilar primario, en el que liberarían dopamina. Esta llegaría a la circulación local o podría modular la función de otros axones neurosecretores. El haz incerto-hipotalámico posee sus neuronas en la zona incerta y se proyecta a corta distancia en la zona medial preóptica, supraquiasmática y dorsomedial e hipotálamo anterior. El sistema mesolímbico se proyecta, desde el área tegmental ventromediana por la cinta media del cerebro anterior hacia la amígdala, núcleos septales, accumbens, olfatorios y neocortex (3, 21, 25, 26, 29).

Los cuerpos de las neuronas noradrenérgicas se localizan mayormente en el cerebro posterior y de allí se proyectan caudal y cefálicamente, llegando también al hipotálamo. A diferencia de la

dopamina, que tiene neuronas intra y extrahipotalámicas, la noradrenalina hipotalámica proviene mayormente de sistemas extrahipotalámicos. Las regiones más ricas son los núcleos paraventricular, supraóptico, arcuato, supraquasmático y en la eminencia media (30). La adrenalina, y la enzima que la sintetiza, fenil etanolamina N-metiltransferasa, se hallan en el hipotálamo, principalmente en los núcleos arcuato, para y periventricular y en la eminencia media; posiblemente la mayor parte proviene de áreas extrahipotalámicas (30). La serotonina también se halla difusamente en el hipotálamo con mayores concentraciones en las regiones premamilar, supraquiasmática, arcuata y en la eminencia media. En parte las fibras serotoninérgicas son de origen extrahipotalámico, algunas serían intrahipotalámicas (21, 31). La acetilcolina y sus enzimas de síntesis y degradación también han sido halladas en el hipotálamo y las drogas que modifican a este neurotrasmisor, alteran significativamente la función hipotalámica (32, 33, 34, 35).

4.1. Histamina proviene de la decarboxilación de la L-histidina (Gráf.1).

Se halla presente en el hipotálamo, con concentraciones altas en la eminencia media, y núcleos arcuatos, premamilar y supraquiasmático. Estaría contenida en las terminaciones neurales, las que poseen la enzima histidina decarboxilasa que la sintetiza, y también en los mastocitos, que carecen de dicha enzima. En la eminencia media, la histidina decarboxilasa contenida es mínima; en cambio hay buena correlación entre el contenido de la enzima y el de his-

tamina en las restantes regiones hipotalámicas. La desaferentación total no afecta el contenido en la región mediobasal hipotalámica, por lo que puede suponerse que se halla en neuronas regionales o en mastocitos (21, 31, 36, 37, 38, 39, 40).

La acción de la histamina es mediada por dos tipos de receptores, H1 se llaman a aquellos bloqueados por los antihistamínicos clásicos como mepiramina o difenhidramina; los que no son bloqueados por los mismos se los considera H2; ambos se hallan en tejido neural (41, 42, 43, 44).

4.2. El ácido gamma amino butírico (GABA) se encuentra en altas (Gráf.2) concentraciones en el encéfalo donde posee una difusa distribución, desconociéndose aún vías precisas GABAérgicas tal como la tienen, por ejemplo, ciertas aminas neurotrasmisoras. Su concentración es importante en el hipotálamo; se lo ha relacionado con la función neural incluyendo la neurotrasmisión (45, 46, 47). En general, como ácido dicarboxílico, estaría involucrado con los procesos de inhibición sináptica, así como los monocarboxílicos lo estarían con los de estimulación. Receptores GABAérgicos fueron descriptos en diversas áreas encefálicas y más aún, en la hipófisis, lo que reafirmaría la función neuroendócrina de este aminoácido (48).

5 Prolactina

5.1. Importancia de su estudio

La prolactina liberada por la adenohipófisis fue objeto,

recientemente, de numerosos estudios. Este interés por la hormona podríamos atribuirlo a múltiples factores (28).

- Tiene un llamativo mecanismo de control neuroendócrino que la hacen un modelo de características peculiares. En efecto, mientras que la secreción de las restantes trofinas hipofisarias son estimuladas por el encéfalo, la prolactina es tónicamente inhibida por el mismo (49, 50).
- Actualmente es posible su cuantificación en la circulación en distintas circunstancias fisiológicas y patológicas del humano y en condiciones experimentales en diferentes especies. El aislamiento, purificación y dilucidación de la composición química de esta hormona proteica; y la utilización de su capacidad antigénica para lograr anticuerpos apropiados, llevó al desarrollo de radioinmunoanálisis homólogos y heterólogos para la misma (19, 51).
- Se le han descripto numerosísimos efectos periféricos, hoy superan el centenar. El concepto de que se trata de una hormona que actúa sobre la gonada ("gonadotrofina") y la glándula mamaria exclusivamente, debe ser superado. Es capaz de actuar sobre múltiples tejidos aún no relacionados directamente con la reproducción. Muchas de estas acciones periféricas dependen de la especie considerada; por ejemplo, una de sus acciones clásicas como la luteotrófica, es muchísimo más marcada en los roedores que en el humano. Debe considerársela como una hormona capaz de actuar sobre todas aquellas células con receptores específicos para la misma y en las que modificaría el metabolismo, fenómenos de membrana, etc. Han sido des

criptos receptores en el ovario, glándula mamaria, pituitaria, útero, vesículas seminales, próstata, adrenal, hígado, riñón, tejido adiposo, músculo, folículo piloso, entre otros (52). Los receptores, fundamentalmente su número, podrían condicionar los efectos de la hormona a nivel tisular y serían un importante nivel de regulación de su acción periférica. Se han descripto acciones sobre la glándula mamaria, el ovario y el testículo, así como sobre los tractos genitales femenino y masculino. También sobre blancos no relacionados directamente con la reproducción. Se describieron numerosas acciones metabólicas, circulatorias y en el mantenimiento del medio interno.

- La prolactinemia es fácilmente cuantificable en los servicios asistenciales, y con no poca sorpresa se observó que ésta se halla modificada en numerosísimas situaciones clínicas, endócrinas y no endócrinas (52, 53, 54). Tan diversas y numerosas son ellas que es difícil aceptar que la hormona posea una acción fundamental en todas ellas.

  El hecho de hallar modificaciones disprolactinémicas o cambios en su ritmo de secreción no indica necesariamente una relación causal entre la prolactina y el cuadro nosológico. Sin embargo, las mejorías observables, a veces espectaculares, cuando se corrige farmacológica o quirúrgicamente la secreción alterada, subraya la importancia de la hormona en el desencadenamiento o mantención de algunos cuadros patológicos. Esto contribuyó a impulsar los estudios

para la obtención de fármacos capaces de corregir la secreción prolactínica (28, 55).

5.2. Histofisiología de la célula prolactínica

La prolactina es sintetizada por las células acidófilas de la adenohipófisis que son teñibles por el azocarmín y la eritrosina, llamadas células prolactínicas o lactotropas. Mediante técnicas citoquímicas y de electromicroscopia, son diferenciables de las restantes células hipofisarias.

Las células prolactínicas experimentan cambios estructurales de acuerdo al estado funcional.
Así muestran signos de mayor actividad secretoria durante la preñez y más aún, durante la lactancia. Luego de ésta, hay evidencias histológicas de una rápida reducción de la actividad secretoria e involución. Estas células son más abundantes en la hembra que en el macho, más en animales adultos que en prepúberes y muestran una clara estimulación por los estrógenos (56, 57, 58, 59).

5.3. Química

Si bien actividad prolactínica como la de estimular el buche de paloma fue hallada en hipófisis de numerosas especies, sólo de un pequeño número de ellas fue posible aislar y purificar la hormona como una molécula con identidad propia. Se han obtenido preparaciones purificadas de ovinos, bovinos, roedores y más recien

temente, de primates y de humanos. La ovina, indiferenciable por los métodos físico-químicos habituales de la bovina, es una proteína de peso molecular 23.000 y un punto isoeléctrico, en el cual es muy insoluble, de pH 5.7. Li y colaboradores la describieron como una cadena polipeptídica única de 198 aminoácidos, con tres puentes disulfuros (60). La integridad total de la molécula no es indispensable para conservar su actividad biológica, pero la destrucción de los puentes disulfuros la suprime. En solución las moléculas hormonales tienden a agregarse, esto no altera mayormente su actividad biológica pero sí la inmunológica.

En la rata, un importante paso para aislar la hormona fue la obtención de suficiente material. Kwa y col. aislaron la hormona de un tumor prolactino-secretor inducido por estrógenos (61). Ellis y col., consiguieron purificar prolactina aislada de hipófisis de rata normal (62). Ambas prolactinas, la obtenida de adenomas o la de pituitarias normales son inmunológicamente similares. En humanos, la purificación de la hormona fue demorada por varios factores. Así, la hormona de crecimiento altamente purificada evidencia actividad prolactínica intrínseca. A esto se suma el hecho de que en la hipófisis existe 20 a 100 veces más hormona de crecimiento que prolactina y por último, que el método biológico de cuantificación del buche de paloma no es absolutamente específico ni extremadamente sensible para medir la actividad de la molécula prolactínica. Friesen y col., lograron la obtención de prolactinas purificadas de primates y de humanos, que están relacionadas inmunológicamente

con la ovina, pero que son secretadas separadamente y son inmunológicamente distintas de la hormona de crecimiento (63). Primeramente, fue obtenida la hormona del medio de incubación de cultivos de hipófisis provenientes de monas preñadas. Otra preparación se obtuvo a partir de la prolactina secretada por un adenoma cromófobo en cultivo, proveniente de una paciente con galactorrea. Finalmente, pudo aislarse a partir de hipófisis humanas desecadas con una pureza estimada del 50 %. Paralelamente, Lewis y col., informaron la purificación de prolactina humana, con una actividad de 20 UI/mg, por la prueba del buche (64). La preparación tiene una pequeña actividad somatotrófica, alrededor del 2 % por radioinmunoanálisis. La secuencia de aminoácidos se aproxima más a la descripta para la prolactina ovina que a la constitución propuesta para la somatotrofina humana (65).
Las preparaciones aisladas por Friesen y por Lewis son las que sirven de base para el radioinmunoanálisis de prolactina humana de mayor utilización actual.

5.4. Cuantificación

Básicamente, su determinación puede hacerse por métodos biológicos o inmunológicos (19). La actividad biológica de la hormona se basa en la cuantificación de los efectos de la prolactina sobre órganos y tejidos efectores. Tan múltiples son las pruebas biológicas utilizadas como múltiples son los efectos descriptos

para esta hormona, en las distintas especies. Los métodos basados en el efecto luteotrófico en roedores suelen ser de buena especificidad pero de pobre precisión y sensibilidad. Numerosas pruebas se basan en la cuantificación de los cambios anatómicos o metabólicos ejercidos por la hormona, inyectada localmente o por vía general, sobre el buche de paloma. Aún con las últimas modificaciones, la especificidad y sensibilidad son limitadas y no permiten, con facilidad, cuantificar prolactina sérica en humanos normales. La actividad mamotrófica de la hormona ha sido utilizada recientemente para el desarrollo de una serie de métodos biológicos de buena sensibilidad. La hormona es añadida in vitro a cultivos de glándulas mamarias y se determinan ciertos efectos histológicos o cambios en algún parámetro metabólico. La sensibilidad de estas pruebas permitiría detectar, en ciertos casos, los niveles circulantes de prolactina en humanos adultos. La especificidad de éstos es limitada debido a efectos biológicos similares producidos por la hormona de crecimiento o el lactógeno placentario. La especificidad puede mejorar neutralizando a estas hormonas con antisueros específicos (66, 67).

Utilizando homogenatos de próstata de rata se describió un micrométodo biológico con buena sensibilidad y que no requiere cultivo de órganos (68). La molécula de prolactina también puede separarse por electroforesis en gel de poliacrilamida lo que permite su valoración en pituitarias incubadas y en el medio. Este método es

muy específico; permite la diferenciación con la hormona de crecimiento, y es bastante preciso, pero su sensibilidad es muy escasa (69).

La capacidad antigénica de la hormona ovina y bovina es conocida desde hace décadas, pero sólo recientemente esta propiedad es el fundamento de su cuantificación. La prolactina como otras hormonas de la pituitaria, al ser unida a su anticuerpo, da un complejo polimerizado que precipita. Basándose en esto se desarrollaron distintas técnicas (pruebas de precipitación, prueba de Ouchterlony) útiles para caracterizar algunas propiedades de la molécula hormonal, tales como homogeneidad, especificidad de especie, la presencia de prolactina como contaminante de otras preparaciones hormonales y su estudio en tejidos. Con similares propósitos han sido útiles técnicas de fijación de complemento y de hemoaglutinación (70, 71).

Por otro lado, todo un grupo de procedimientos inmunohistoquímicos se han empleado para localizar la hormona en tejidos y células. El anticuerpo marcado al unirse directa o indirectamente al antígeno hormonal, lo hace evidente a los estudios histológicos. El anticuerpo antiprolactina puede marcarse fluorescentemente y el complejo localizado por microscopia de fluorescencia. Mediante anticuerpos marcados obtenidos en conejos contra prolactina ovina pudo identificarse la hormona en células acidófilas hipofisarias en diversas especies cuyas prolactinas tienen cierta similitud inmunológica

con la ovina (72).

La actividad biológica de la prolactina puede ser neutralizada por sus anticuerpos específicos. Así, el antisuero de conejo contra prolactina puede inhibir el efecto de la hormona sobre el buche y la mama. Esta neutralización de la actividad biológica por el antisuero constituye un método de importancia en el estudio de los efectos periféricos de la hormona, pero es necesario recordar que los antisueros habituales pueden contener otros anticuerpos, además del específico para prolactina. Es fundamental conocer las características del antisuero y utilizar adecuados controles, por ejemplo antisueros de conejo contra otras hormonas, para que los resultados posean significado fisiológico (70).

Radioinmunoanálisis: La alta sensibilidad de la cuantificación radioinmunoanalítica, permitió la medición de la hormona en el plasma de distintas especies y en distintas situaciones. La base fundamental es que la hormona natural presente en los tejidos y líquidos orgánicos se comporta inmunológicamente de manera similar a la hormona patrón, para desplazar a la prolactina radiactiva en su unión al anticuerpo. Ambas hormonas, la prolactina natural y la patrón compiten por la unión al anticuerpo. El radioinmunoanálisis de prolactina sigue las líneas generales de esta metodología (19). Como sucede con otras proteínas, la especificidad inmunológica de especie no es absoluta lo que posibilita la existencia de análisis homólogos y heterólogos. Por ejemplo, mediante prolactina ovina y

su antisuero se desarrollaron cuantificaciones heterólogas para prolactina bovina, caprina y para ciertos peces. Existen análisis homólogos para ovinos, bovinos, rata y también para humanos (73). El radioinmunoanálisis de prolactina de rata es uno de los más empleados en investigación. El mayor obstáculo en su desarrollo consistió en la obtención de suficiente hormona purificada. Ni la marcación isotópica con ^{125}I o ^{131}I, ni la producción de anticuerpos ofrecieron mayores dificultades. Kwa y Verhofstad desarrollaron el primer radioinmunoanálisis utilizando el antisuero obtenido contra prolactina de un adenoma hipofisario y que permitió la cuantificación de la hormona sérica (61). Casi simultáneamente, Ellis y col., describieron la obtención de prolactina de hipófisis normales y sus antisueros (62). Ambas preparaciones son similares inmunológicamente y pueden ser usadas para marcación y obtención de antisueros y los resultados de los radioinmunoanálisis son equivalentes utilizando una u otra (73).
Niswender y col., utilizando la hormona purificada por Ellis para marcación y producción de antisueros desarrollaron un radioinmunoanálisis por doble anticuerpo que hoy es muy utilizado (74).En 7.4. se describe detalladamente la metodología empleada en nuestros estudios.

5.5. Prolactina circulante

La cantidad de prolactina cuantificable, en ng por ml, de sangre, plasma o suero, es reflejo de su secreción y desaparición,

siendo éste un balance sumamente dinámico. Su vida media biológica en la circulación es corta, de 5 a 15 minutos (75). Todas las evidencias experimentales indican que es la liberación de la hormona el principal factor que modifica la prolactinemia. Su desaparición por metabolización, unión al tejido efector o eliminación sería de mucha menor importancia.

La prolactina plasmática radioinmunoensayable es baja en condiciones basales en el prepúber y adulto (4 a 40 ng/ml) (73).

Durante la pubertad los cambios en el humano son mínimos, con un pequeño incremento en el sexo femenino. En general, aumenta paralelamente al incremento de estrógenos endógenos. También son pequeñas las modificaciones halladas durante el ciclo menstrual, contrariamente a lo que se observa en el ciclo estral de los roedores que tienen un neto pico ovulatorio de prolactina. Desciende en la postmenopausia. Aumenta progresivamente hacia el final del embarazo en la mujer, para descender lentamente en el postparto. Es llamativamente alta en el líquido amniótico, sangre del cordón umbilical, en el recién nacido y también en el semen humano. La succión del pezón es un poderoso estímulo de su liberación durante el amamantamiento, como también lo son el "stress" y el ejercicio. La prolactinemia tiene un ritmo diario, con los valores más altos durante el sueño nocturno. También posee un ritmo horario, con cambios pequeños pero frecuentes, aparentemente debido a su liberación "en pulsos" (12, 51).

5.6. Mecanismos básicos de regulación de su secreción

La información que llega a la célula prolactínica es media da por agentes químicos. Estos tienen su origen en el sistema ner vioso central y en las glándulas de secreción interna.

El cerebro de mamífero es un fuerte inhibidor de la secreción pro lactínica. Regionalmente, la actividad inhibitoria reside fundamen talmente en el hipotálamo medio basal y eminencia media del tuber cinereum.

Temporalmente, sabemos que es una inhibición constante, ejercida minuto a minuto. Esto se comprueba fácilmente, al suprimir la re- lación normal encéfalo pituitárica, por lesión electrolítica del hipotálamo medio-basal, sección del tallo glandular o transplante de la hipófisis a un lugar distante del hipotálamo. En todas estas situaciones, la prolactinemia aumenta rápidamente a niveles varias veces superiores a los basales. También aumenta la síntesis hormo nal y ambos incrementos, síntesis y liberación, son persistentes y sólo retrogradan si se restablece la normal relación vascular portal. Las neuronas hipotalámicas liberan en el plexo portal pri mario el agente químico que llevado por la circulación inhibe la secreción prolactínica (factor inhibidor de prolactina, PIF, o prolactoestatina). En algunas condiciones experimentales en los mamíferos y en otras especies, como en las aves, actuaría o coexis tiría un factor liberador de la secreción de esta hormona (Factor liberador de prolactina, PRF, o prolactoliberina) (15, 28, 50, 76).

Es evidente que todas las influencias que desde el medio externo y desde el medio interno actúan sobre el encéfalo modificando la secreción prolactínica, lo hacen fundamentalmente a través de este o estos factores hipotalámicos.

Es importante destacar la función integradora encefálica, pues a las múltiples y complejas informaciones que recibe las sintetiza en cambios en la secreción de uno o unos de los factores hipotalámicos que actúan a través de la vía final común hipotálamo hipofisaria. Se explica consecuentemente que toda droga neurotrópica, pueda modificar la secreción de prolactina al actuar sobre los circuitos neurales que modulan la liberación de las hormonas hipotalámicas.

Además del nivel de regulación cerebral, los agentes originados en el medio interno, como las hormonas, pueden directamente actuar sobre la hipófisis regulando la síntesis y/o liberación hormonal o la respuesta de la célula lactotrófica a las hormonas hipotalámicas. Así, las hormonas esteroideas modifican profundamente la secreción de prolactina. Las más activas son los estrógenos. Estos son capaces de incrementar la síntesis pituitárica y la liberación hormonal cuando se los administra en un amplio rango de dosis (49). La progesterona puede en parte contrarrestar los efectos del estradiol, pero es poco efectiva empleada aisladamente (69).

El efecto de los esteroides se ejerce sobre el encéfalo, regulando la liberación de los factores hipotalámicos y también, directa

mente sobre la célula adenohipofisaria.

Finalmente, podemos mencionar que la misma prolactina puede retroactuar sobre el encéfalo y modular la liberación de los factores hipotalámicos que la regulan.

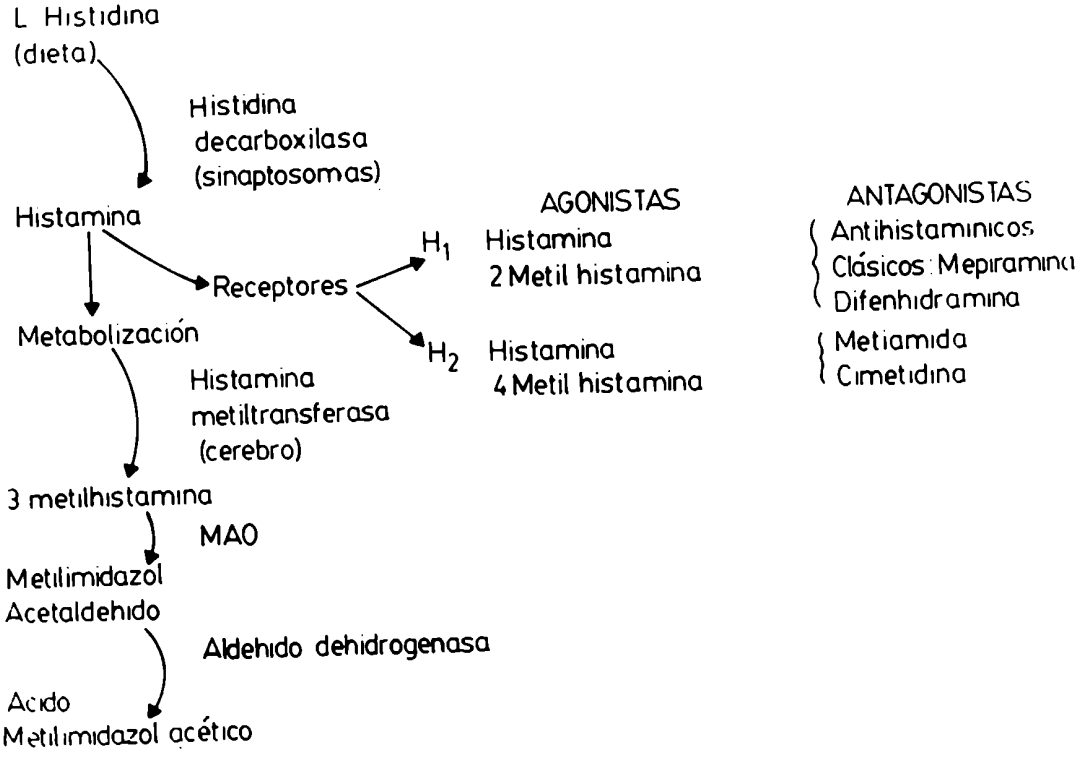

GRAFICO 1: Se esquematiza la síntesis y degradación de la histamina y la interacción con sus receptores. Además, se indican las drogas agonistas y antagonistas H1 y H2 de mayor utilización.

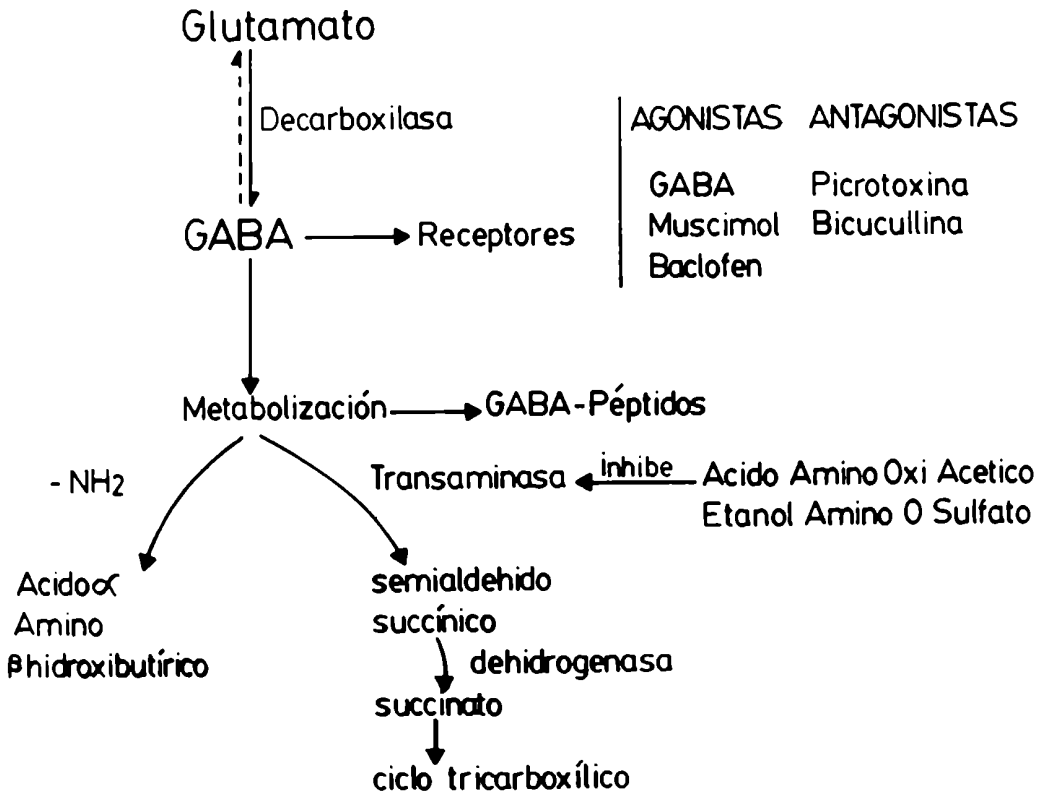

GRAFICO 2: Se esquematizan los distintos caminos metabólicos del ácido Gama Aminobutírico y algunas de las drogas que los modifican, así como los agonistas y antagonistas GABAérgicos.

6 Objetivos experimentales

Con el objeto de precisar los mecanismos íntimos de control neuroendócrino de la secreción prolactínica hemos utilizado dos aproximaciones complementarias. La primera la realizamos mediante la neurofarmacología experimental. Mencionamos anteriormente la trascendencia funcional que tienen las hormonas y los neurotrasmisores hipotalámicos. La fisiología y la patología hipotalámica ha sido relacionada con dichas hormonas y neurotrasmisores regionales. Nuestro propósito es profundizar este conocimiento y también, explicar ciertas observaciones derivadas de la utilización de fármacos. En efecto, el uso clínico de ciertas drogas ha sido seguida por modificaciones, deseables o indeseables, de la función hipotalámica y endócrina. Como veremos, algunos de nuestros resultados clarifican el efecto neural y endócrino de ciertos fármacos de uso habitual. Especial atención hemos dedicado a aquellos neurotrasmisores, o posibles neurotrasmisores, a los que menor atención se les ha prestado en la bibliografía, y consecuentemente, mayor originalidad presentaba su estudio: la histamina y el GABA.

La segunda aproximación la realizamos utilizando cirugía estereotáxica experimental, para provocar lesiones hipotalámicas y comprobar sus efectos. La destrucción de áreas discretas neurales producen fenómenos deficitarios de la función neural y ésta ha sido un método sumamente valioso en neurofisiología. Más aún, es un hecho obvio que afecciones hipotalámicas de diversa etiología, se mani-

fiesten por déficit funcional de este área neural. El área que mayor atención nos ha merecido es la eminencia media, por la enorme jerarquía funcional que posee. (Gráf. 3). Su destrucción elimina el control neural de la hipófisis, permitiendo el estudio de la glándula aislada.

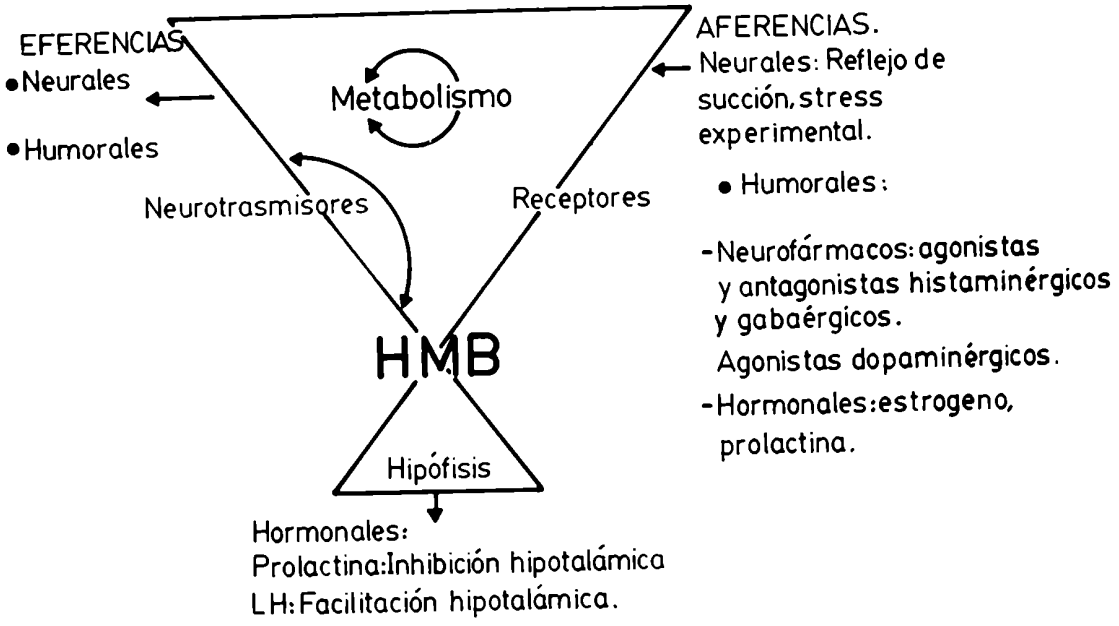

GRAFICO 3: El hipotálamo es un centro integrador que recibe aferencias neurales y humorales, las elabora, y emite respuestas a otras regiones nerviosas y a la hipófisis. La elaboración implica cambios hipotalámicos neuroquímicos y electrofisiológicos.
En el presente trabajo se utilizan aferencias neurales (reflejo de succión, stress) y humorales (neurofármacos, hormonas).
Además, se procede a la destrucción estereotáxica experimental del hipotálamo medio basal (HMB). Se estudian las modificaciones hipotalámicas e hipofisarias, cambios en los receptores y en la respuesta endócrina.

7 Materiales,métodos y experimentos preliminares

7.1. Animales

Se utilizaron ratas blancas de la cepa del Instituto de Biología y Medicina Experimental, adultas, de 200 a 270 g de peso corporal. Fueron mantenidas en bioterio con aire acondicionado (23º - 25º C) y luz controlada (encendida de 07.00 a 19.00 h). La ingesta sólida y líquida fue "ad libitum".
Las ratas adultas fueron mantenidas en jaulas grupales, entre 8-10 animales. Las hembras preñadas, y en el postparto, las madres con sus crías, se alojaron en jaulas individuales.

7.2. Técnicas y Microtécnicas Quirúrgicas.

7.2.1. Ovariectomía: las ratas adultas fueron ovariectomizadas por vía lumbar bajo anestesia etérea. Se utilizaron de dos a cuatro semanas después de la operación.

7.2.2. Cateter intravascular: Bajo anestesia por ketamina, 100 mg/Kg, intraperitoneal, cierto grupo de animales fue implantado crónicamente con un cateter intrayugular. Se utilizó una cánula de silastic (Dow Corning) de 0.05 cm y 0.09 cm de diámetro interior y exterior, respectivamente, la que fue introducida por la vena yugular hasta la aurícula derecha.
Se la fijó convenientemente al músculo pectoral, mediante una lámi

na de teflón, sacándose la cánula por contraabertura, en el dorso del animal. En el momento de su uso, podía conectarse la misma a una jeringa exterior. Mediante este cateter es posible obtener muestras de 0.6 ml de sangre auricular o inyectar soluciones por vía general (intrayugular) sin que el animal evidencie cambios conductales (77).

7.2.3. Técnicas estereotáxicas

7.2.3.1. Lesiones electrolíticas. Se destruyó el hipotálamo medio basal, incluyendo la eminencia media del tuber cinereum mediante una corriente anódica. Se utilizó un aparato estereotáxico para ratas Krieg Johnson y electrodos de nicrome aislados, excepto en la punta, mediante barniz dieléctrico. Se utilizó una corriente de 3 mAmp, durante 20 segundos. En todos los casos las lesiones fueron bilaterales con las siguientes coordenadas: 1.4 mm detrás del bregma, 0.3 mm sobre la base del cerebro y 0.5 mm lateralmente. La anestesia fue por ketamina o por embutal (33 mg/Kg, intraperitoneal). La evaluación de las lesiones fue realizada por examen anatómico del hipotálamo y por el valor de las hormonas circulantes. Sólo fueron utilizados animales con menos de 1 ng/ml de LH sérico (69, 78). Los animales controles fueron igualmente tratados, excepto que no se pasó corriente por los electrodos. Estas ratas se utilizaron 7 - 14 días después de la cirugía, excepto en aquellos casos que se especifican en "Resultados".

7.2.3.2. Cánula de acero en el III ventrículo cerebral. Se procedió a la inserción crónica de una cánula de acero inoxidable en el tercer ventrículo cerebral de la rata. Se utilizó el mismo aparato estereotáxico y anestesia que en el punto previo. La cánula (23 ga. de diámetro externo, 20 mm de longitud) se introdujo por un orificio en la calota, 0.6 mm detrás del bregma y en la línea media, apartando cuidadosamente el seno longitudinal para prevenir su ruptura. Se descendió lentamente unos 8 mm bajo la duramadre, hasta que el líquido cefaloraquídeo comenzó a fluir; se observó un ciudado especial para no tocar las áreas hipotalámicas. Finalmente, la cánula se fijó mediante cemento acrílico a pequeños tornillos que habían sido sujetos a la calota (79, 80). Los animales se utilizaron 48 hs después de la cirugía. Se utilizó una microjeringa Hamilton de 10 µl conectada mediante una tubuladura de polietileno a una aguja que insertaba perfectamente en el interior de la cánula fija. Se inyectó 2 µl de las soluciones conteniendo las distintas drogas en estudio (via intraventricular).
Mediante esta técnica es posible localizar las áreas de acción de los fármacos; además es posible estudiar aquellas drogas que no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica.

7.2.4. Incubación

En una serie de experimentos, se ensayó el efecto de diversos agentes sobre la actividad secretoria hipofisaria in vitro.

Ratas adultas donantes, recibieron 48 hs antes de la utilización 10 µg de benzoato de estradiol intramuscular. Este tratamiento sensibiliza la respuesta hipofisaria prolactino-secretora a distintos agentes (79, 81).

Los animales fueron decapitados durante la mañana y la hipófisis anterior rápidamente disecada. Cada glándula fue dividida en dos hemihipófisis de aproximadamente igual peso. Cada hemipituitaria se llevó a un tubo de incubación conteniendo 1 ml de buffer Krebs Ringer bicarbonato, con glucosa 14 mM, pH 7.4. Las incubaciones se realizaron en un agitador tipo Dubnoff, bajo aire, a 37ºC. Luego de 30 minutos de preincubación el medio fue desechado, la hemipituitaria lavada una vez con 500 µl de buffer y finalmente se añadió 1 ml de medio, por hemiglándula, con o sin la droga en estudio. La comparación se hizo entre cada hemihipófisis, una control y otra con la droga.

Después de 3 hs de incubación, el medio fue separado, centrifugado y 100 µl del sobrenadante diluido con buffer fosfosalino conteniendo 1 % de albúmina de huevo, conservándoselo a -20ºC hasta el radioinmunoaálisis de las hormonas. Los detalles de las incubaciones realizadas para el estudio de la síntesis de proteínas se hallan en 7.3.1.

7.2.5. Injertos hipofisarios

Se utilizó como modelo experimental, animales hiper-

prolactinémicos por injerto de hipófisis bajo la cápsula renal (82, 83). Los animales donantes fueron decapitados y la hipófisis rápidamente disecada. Tres o cuatro hemipituitarias fueron injectadas bajo la cápsula renal izquierda, previamente preparada y disecada, según la técnica de Everett (83). Se utilizó una laparatomía lateral izquierda. Los animales receptores fueron hembras crónicamente ovariectomizadas, anestesiadas con eter.
Los estudios se efectuaron, 8 días después del transplante, en la hipófisis *in situ* del animal receptor y en las glándulas transplantadas bajo la cápsula.

7.2.6. Recolección de muestras

7.2.6.1. Sanguíneas

Toda vez que las muestras no fueron recogidas a través de la cánula de silastic, se obtuvieron las mismas por recolección de la sangre troncal, luego de la decapitación.
Luego de tomadas las muestras sanguíneas se les permitió coagular. Se las mantuvo a 4ºC hasta total retracción del coágulo. El suero se separó por centrifugación, manteniéndoselo a -20ºC, hasta las cuantificaciones radioinmunológicas hormonales.

7.2.6.2. Tisulares

Hipotálamo: fue disecado tomando como límite anterior el quiasma óptico, lateral.las fisuras hipotalámicas y

posterior los cuerpos mamilares. En profundidad se consideró hasta 1 mm (surco subtalámico) (1, 2, 84). Otras áreas neurales: septum, área preóptica, amígdala, hipocampo y corteza cerebral, fueron disecadas de acuerdo a los límites y procedimientos dados por McEwen y Pfaff (85). Se utilizó también la hipófisis anterior aislada.

7.3. Determinaciones bioquímicas

7.3.1. Síntesis de proteínas totales

Fue determinada en hipófisis anterior e hipotálamos aislados e incubados utilizando ^{3}H glicina (2 μCi, 2 μmol) como sustrato. Se utilizaron pesos equivalentes de tejidos provenientes de cada animal, control o experimental.

Las incubaciones hipofisarias fueron adaptadas de la siguiente manera: Después de un período de preincubación de 15 minutos, los tejidos fueron incubados 120 minutos a 37ºC en 1 ml de solución buffer Krebs Ringer bicarbonato y glucosa 200 mg %, pH 7.4 bajo atmósfera de carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2). La velocidad de síntesis proteica permanece lineal hasta tres horas en estas condiciones (59).

Se utilizó el método de Coles y col. (86). Luego de homogenizar el tejido en ácido tricloroacético al 5% y precipitar las proteínas, se hidrolizaron los ácidos nucléicos por calentamiento a 90ºC en medio ácido y los lípidos por calentamiento a 40º C en etanol-eter. El pellet proteico así purificado se disolvió en 0.4 ml NaOH 1 N y una alícuota se utilizó para la determinación de proteínas por el

método de Lowry y col. (87). La solución proteica remanente fue evaporada a sequedad con aire, y el precipitado disuelto en 0.2 ml de solubilizador NCs (Amersham Searle) por calentamiento a 30º C durante 8 horas. Luego de agregar 10 ml de solución de PPO-POPOP-tolueno, se determinó la radioactividad en un contador líquido de centelleo Packard Tri-Carb, expresándose los resultados como cpm/mg proteína.

7.3.2. Receptores hormonales en hipotálamo, otras áreas neurales e hipófisis

Obtenidas las muestras tisulares, éstas fueron pesadas y homogenizadas en buffer TEM (10mM Tris, 1.5 mM EDTA, 2 mM mercaptoetanol, pH 7.4), a 0º - 4ºC. El homogenato se centrifuga a 105.000 g durante 60 minutos a 0ºC. Alícuotas del citosol aislado (0.2 ml para anterohipófisis; 0.25 ml para hipotálamo) fueron incubadas a 30ºC con 2.2. 10^{-9} M de ^{3}H-estradiol por triplicado; simultáneamente, similares alícuotas fueron incubadas por duplicado con igual cantidad de ^{3}H-estradiol más el agregado de una concentración molar 1000 veces superior de la hormona no radioactiva. El método para la incubación y separación de la radioactividad libre de la unida fue adaptado de Ginsburg y col. (88). Estudios preliminares indican que el equilibrio se logra después de 20 minutos de incubación, para la hipófisis y el hipotálamo.

Después de la incubación, el estradiol libre y unido fue separado

por filtración por Sephadex LH-20 (Pharmacia). Los eluidos conteniendo el ^{3}H-estradiol unido fue recogido en viales, a los que se añadió 10 ml de solución centelladora (Omnifluor New England Nuclear 4 g, tolueno 1:1).

La radioactividad fue cuantificada en un contador de centelleo líquido Beckman LS 100 C con un 83% de eficiencia para ^{3}H . La unión inespecífica (radioactividad presente después de la adición de estradiol no radioactivo) fue sustraída de la radioactividad total, considerándose la diferencia como la hormona específicamente unida al receptor citoplasmático. Los resultados se expresan como fmol/mg proteína unidos.

Las proteínas fueron determinadas en el citosol utilizando una alícuota de 0.2 ml, tratada con un volumen igual de ácido tricloroacético 10%. Después de la centrifugación las proteínas precipitadas fueron cuantificadas mediante el método de Lowry utilizando albúmina-bovina sérica como patrón (59, 83). En estas condiciones experimentales, la unión de la hormona radioactiva al citosol hipotalámico o hipofisario fue casi completamente abolida por pretratamiento de los animales con 10 - 75 µg de la hormona no radioactiva inyectada por vía endovenosa, 30 minutos antes de la decapitación. La especificidad de la unión fue determinada in vivo, ya que tanto progesterona, corticosterona y testosterona, en concentraciones molares 25 veces superiores no interfirieron la unión del estradiol en hipotálamo e hipófisis. Pero la unión fue disminuida por la coincubación con estradiol o dietilestilbestrol no radioactivos.

7.3.3. Captación hormonal in vivo en hipotálamo, otras regiones neurales e hipófisis

Para los estudios in vivo los animales fueron inyectados con 10 µCi/150 g de peso corporal de ^{3}H-estradiol disuelto en 0.2 ml de solución salina etanólica al 20%. Una hora después, los animales fueron anestesiados con eter y perfundidos a través del corazón, con 60 ml de solución salina fría, obteniéndose seguidamente las muestras tisulares. Luego de pesadas, alícuotas de las mismas fueron digeridas con 0.3 ml de solubilizador NCS, a 50º C durante la noche. Después de la neutralización con 100 µl de ácido acético glacial, se añadió 10 ml de solución centelladora para medir la radioactividad. La concentración tisular de la misma fue expresada como dpm/mg de tejido; también se calcula la relación entre la radioactividad de las distintas áreas neurales y la fijada en corteza cerebral tomada como referencia. La captación de la hormona marcada in vivo es un proceso saturable pues la administración previa de la hormona no radioactiva disminuye la captación de ^{3}H-estradiol. La saturabilidad fue mayor en el hipotálamo y anterohipófisis (62% y 90%, respectivamente), y menor en otras áreas neurales (entre 20% y 49%).

7.4. Radioinmunoanálisis

Se utilizó el radioinmunoanálisis por doble anticuerpo para las determinaciones. Todas ellas se efectuaron por duplicados en

alícuotas que oscilaron entre 25 y 200 ul de suero. En ciertos casos se usaron distintos niveles de concentración, para efectuar la lectura en la zona óptima (19).

7.4.1. Prolactina

La prolactina se cuantificó utilizando el juego de reactivos provistos por el NIAMDD, NIH, Maryland.

Marcación: Se utilizó prolactina de rata purificada (NIAMD R P I 1 ó 2) con una actividad biológica de unos 30 UI/mg por el análisis del buche y contaminación mínima con somatotrofina y tirotrofina. La hormona se obtuvo liofilizada, solubilizándola en solución de CO_3 HNa 0.01 M, a la concentración final de 100 µg/ml. El pH alcalino es importante; debe agitarse suavemente hasta lograr la solubilización completa. Se dividió en alícuotas de 25 µl conteniendo 2.5 ug de la hormona, en tubos de vidrio de 12.75 mm en los que se efectúa la marcación. Se usó ^{125}I, libre de portador, apto para marcar proteínas, con actividad específica de 300 a 500 m C/mg.

Las soluciones empleadas fueron: buffer fosfato 0.5 M pH 7.5; buffer fosfato 0.05 M pH 7.5; buffer fosfosalino: buffer fosfato 0.01 M; Cl Na 0.15 M; Mertiolate 0.01%; pH 7.0; solución de transferencia: 100 mg IK; 0.8 g sucrosa; H_2 O csp 10 ml; solución de cloramina T. Inmediatamente antes de su uso, se prepara la misma en buffer fosfato 0.05 M, a una concentración de 1 µg/µl; solución de metabisulfito de sodio ($S_2O_5Na_2$). Se diluye en buffer fosfato 0.05 M pH 7.5 a una concentración 2.5 µg/µl.

La columna que se utilizó fue de Bio Gel, P 60; 100-200 mesh en buffer fosfato 0.05 M pH 7.5 de 0.8 · 10 cm aproximadamente. Por ella se hizo pasar buffer fosfosalino con EDTA 0.05 M y 1 a 2 % de albúmina de huevo, para saturar los sitios activos.

Procedimiento: a la hormona se añadió 25 µl de buffer fosfato 0.5 M y luego 0.5 mC de ^{125}I. La oxidación se fectuó con 10 µl de la solución de cloramina (10 µg). Luego de 60 segundos, durante los que se agitó muy suavemente, se detiene la reacción mediante 25 µl de solución de metalisulfito de sodio (62.5 µg). Se añadió luego la solución de transferencia. Se recogieron 20 gotas en el primer tubo y 8 en los restantes (unos 500 µl finales por tubo). El pico con la hormona marcada apareció entre los tubos 3 y 6; el de ^{125}I libre después del octavo. La actividad específica de la prolactina marcada osciló entre 100 y 200 mC/mg.

Primer Antisuero: Se usó antisuero contra prolactina de rata obtenido en conejos (NIAMD anti Rat prolactin Serum 1 a 5). Se diluyó con buffer fosfosalino, EDTA 0.05 M con 1 a 3% de suero de conejo normal, pH 7.0 a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo. En la práctica, la máxima unión fue de aproximadamente 35%.

Preparación de referencia: Se usó prolactina de rata (NIAMD Rat P1) con una actividad biológica de 11 UI/mg (prueba del deciduoma en ratona). Se preparó una solución de 10 µg/ml de buffer fosfosalino con 1% albumina de huevo, pH 7.0. Los patrones fueron de 1 a 256 µg/ml.

La separación se hizo por segundo anticuerpo. Se usa antisuero de oveja contra γ globulina de conejo, a diluciones de trabajo establecidas experimentalmente.

Rutinariamente, se efectuó una prueba corta preliminar a cada determinación. En éstas el precipitado inespecífico no superó el 5% y el específico fue mayor del 25%.

El procedimiento definitivo fue el siguiente: El primer día se añadió el primer anticuerpo; el segundo la hormona trazadora; el tercero el segundo anticuerpo. Luego de 48-72 hs. se centrifugó y leyó.

7.4.2. Hormona luteinizante

Para la cuantificación de la hormona luteinizante se usó el método heterólogos desarrollado por Niswender y col., a partir de un antisuero obtenido en conejos inmunizados con LH ovina. Este antisuero reacciona no sólo con la LH de oveja, sino la de numerosas especies, incluyendo la rata y el mono, pero es ineficaz para la LH humana (90). El análisis heterólogo para LH de rata es de uso muy habitual por su buena calidad. En él se utiliza antisuero contra LH ovina y LH ovina como trazadora.

Marcación isotópica: Se utilizó LH purificada, aislada de glándulas ovinas por Reichert y col., (LER 1056). La hormona es conservada en alícuotas, en tubos de vidrio de 12.75 mm, cerrados, a -20ºC. Cada tubo contiene 2.5 µg de LH ovina en 25 µl de buffer fosfato 0.05 M, pH 7.5. El ^{125}I y las soluciones fueron como las descriptas para

prolactina, pero la concentración de Cloramina T empleada fue mayor, de 2.5 µg/µl.

Procedimiento: A la hormona se añadió 25 µl de buffer fosfato 0.5 M, seguido por el ^{125}I. Se inicia la oxidación por la adición de 10 µl de la solución de cloramina T (30 µg). Luego de 60 segundos se detuvo la misma mediante 50 µl de solución de metabisulfito (125 µg). Se añadió 50 µl de la solución de transferencia, pasándose luego a la columna de Bio Gel.

Se recogió 10 gotas por tubo. El pico de hormona marcada apareció entre los tubos 4 y 6. El pico de ^{125}I libre apareció luego del tubo 8.

Como primer antisuero se utilizó el obtenido por Niswender y col., inmunizando conejos con LH ovina emulsionada en adyuvante de Freund completo. Se diluyó con buffer fosfosalino, 0.05 M EDTA y 3% de suero de conejo normal. La dilución de trabajo se determinó experimentalmente para cada partida, estudiándose de 1/15.000 a 1/40.000 y seleccionando la que fija 50% de la hormona trazadora. Usualmente fue de 1/20.000 a 1/25.000.

Como preparación de referencia utilizamos la LH purificada de hipófisis de rata (NIAMD Rat LH R P1), que tiene una potencia biológica de 0.03 veces el NIH LH S1, por la prueba del ácido ascórbico y mínimos contaminantes de FSH y TSH. La curva patrón va desde 1280 a 10 ng de LH R P1. Los resultados se expresan en ng del NIH LH S1, obtenidos al multiplicar los µg de NIAMD Rat LH RP1 por 0.03 (32). Además, usamos plasmas patrones obtenidos de ratas enteras y gona-

dectomizadas en volúmenes de 25 a 100 µl cuyos valores se hallan en la zona baja, media y alta de la curva; sirvieron para calcular la variabilidad interanálisis.

La separación por segundo antisuero se hizo utilizando antisuero de oveja contra γ globulina de conejo. Diluido en buffer fosfosalino pH 7.0, ensayamos diluciones 1/10 a 1/50; un valor habitual fue 1/20.

Procedimiento: Además de hallar las mejores diluciones para cada anticuerpo fue útil efectuar una prueba corta, para verificar todos los reactantes. En la prueba definitiva, el primer día se añadió 100 µl del 1er. antisuero, incubó 24 hs. a 4ºC, y el segundo día se añadió 100 µl de la hormona marcada (unos 20.000 cpm). Se incubó nuevamente a 4ºC. El tercer día, se añadió 100 µl del 2º anticuerpo e incubó. El quinto día se centrifugó a 4ºC durante 30 minutos y 3.000 rpm (aprox.: 1000 g). Se aspiró el sobrenadante y contó el precipitado en contador de buena eficiencia. Se efectuó el cálculo y se determinó la calidad del análisis.

7.5. Situaciones experimentales

Se seleccionaron aquellas en que la secreción prolactínica se halla dinámicamente regulada por el hipotálamo y en las que se podría investigar el control neural de la hipófisis en múltiples situaciones.

7.5.1. Animales adultos

Machos normales y hembras ovariectomizadas. En ambas

situaciones la prolactinemia es baja, por el fuerte tono inhibidor ejercido por el encéfalo.

La ovariectomía fue realizada para eliminar la principal fuente de estrógenos y la posible interferencia de la actividad cíclica ovárica. Además, algunos de estos animales recibieron 10 µg de benzoato de estradiol, 48 hs antes del experimento. La finalidad de este pretratamiento fue obtener, por contrapartida, ratas con hiperprolactinemia mas o menos estables, sensibilizar la hipófisis a las influencias hipotalámicas, especialmente sobre el control secretorio de la prolactina (91).

7.5.2. Modelos hiperprolactinémicos

Se utilizaron diversas situaciones fisiológicas y experimentales en las que la secreción prolactínica es estimulada dinámicamente.

7.5.2.1. Reflejo de succión

Se estudió el efecto de ciertos fármacos sobre el reflejo neuroendócrino de succión. Las crías al succionar el pezón de las madres durante el postparto, desencadenan un reflejo que llega por vía neural aferente hasta el hipotálamo donde se integra y canaliza hacia la hipófisis anterior y la posterior (92).

La vía eferente es hormonal, descargándose prolactina antero-hipofisaria y ocitoxina neurohipofisaria, las que actúan sobre la síntesis y eyección láctea de la glándula mamaria. En este modelo

de estudio se utilizaron ratas preñadas. El día siguiente al parto se consideró como día 1 y en ese momento se ajustó el número de crías a ocho. Los experimentos se realizaron entre los días 10 y 15 postparto. Algunas de las madres fueron implantadas con una cánula de acero en el tercer ventrículo y otras con cánulas de silastic intrayugular.

La mañana del día del experimento (09.30 - 10.00 hs) las crías se separaban de sus madres durante 5 a 5 1/2 hs. Después de tomar una muestra inicial de sangre, se inyectaron las drogas en estudio por vía general o por microinyección intraventricular. Luego, las crías se reunieron nuevamente con sus madres y el momento en que comenzaron a succionar activamente, se consideró como tiempo cero. Nuevas muestras se tomaron a distintos tiempos durante la succión. Otros grupos de madres fueron igualmente tratadas, pero luego de la administración del fármaco se mantuvieron separadas de sus crías durante todo el experimento. Tiempo cero se consideró el momento de completarse la inyección.

El procedimiento experimental no modifica los valores basales de prolactinemia. Así en 7 ratas subsecuentemente inyectadas con 2 μl de solución salina 0.09% en el tercer ventrículo, la media de la prolactinemia en la muestra basal obtenida por el cateter de silastic fue de 25.0 : 3.2 ng/ml. En un segundo grupo de siete animales que igualmente portaban ambas cánulas pero en los que la muestra se obtuvo por decapitación, la prolactinemia fue de 17.0 4.0 ng/ml, es decir, fue similar en ambos grupos (Gráf. 4).

7.5.2.2. Stress experimental

El"stress" constituye un poderoso estímulo para la liberación de hormonas hipofisarias, con un importante componente de integración encefálica. Por ello, en ciertos animales provocamos un "stress" por eter, manteniéndolos bajo anestesia de eter sulfúrico durante 3 minutos, al cabo de los cuales tomamos la muestra (79). Tanto la succión como el "stress", son estímulos que por distintas vías y mecanismos liberan abruptamente la hormona. Además, el primer estímulo es más poderoso que el "stress" (93).

7.5.2.3. Injerto hipofisario prolactino secretor

Mediante el injerto glandular bajo la cápsula renal se obtiene una hiperprolactinemia cuya magnitud depende del número de hipófisis transplantadas (94). Esta situación experimental difiere de las fisiológicas anteriores en distintos aspectos. La hiperprolactinemia lograda mediante injertos, es perdurable mientras persista la viabilidad de los mismos. En la hipófisis transplantada, desprovista del control neural, se desarrollan las células prolactínicas e involucionan los restantes tipos celulares (82, 83, 95).

7.5.2.4. Desconexión hipotálamo hipofisaria

Este modelo experimental, sumamente útil, se caracteriza por la supresión total del control hipotalámico de la hipófisis. El mismo es irreversible, a menos que se restituya

la vascularización portal. Se obtiene una de las hiperprolactinemias de mayor magnitud, perdurable, acompañada por concentraciones mínimas de las otras hormonas hipofisarias (96).

7.6. Materiales radioactivos

2-^{3}H glicina 9.3 Ci/nmol.; 2,4,6,7-^{3}H-estradiol 17β; ^{125}I libre de portador, 300-400 mCi/μl, apto para marcar proteínas. Todos fueron obtenidos de New England Nuclear.

7.7. Tratamientos farmacológicos

7.7.1. Drogas histaminérgicas

Distintas drogas han sido descriptas como agonistas o como antagonistas de los receptores H_1 y H_2 (42, 97). Esquemáticamente, se representan en el Gráfico 1.

Las drogas utilizadas en los presentes trabajos, origen, dosis y vías de administración empleadas experimentalmente fueron:

Mepiramina, maleato (May & Barker); 5 mg/Kg, intrayugular (3.11 μmol/rata).

Difenhidramina, hidroclorhidrato (Parke Davis) 5 mg/Kg intrayugular (4.28 μmol/rata) o 10 μg en 2 μl de solvente/rata, intraventricular (34 nmol/rata).

Metilhistamina, dihidroclorhidrato (Smith,Kline & French) 25 μg intraventricular (0.13 μmol/rata).

Histamina, dihidroclorhidrato (Sigma) 25 µg, intraventricular (0.14 µmol/rata).

Metiamida (Smith, Klein & French) 244 mg de la droga se disolvieron en 1.10 ml de HCl, 1.0 N; luego se añadió 2.0 ml de NaHO, 0.1 N y agua hasta 10 ml.

Dos µl de esta solución conteniendo 48.8 µg de metiamida se inyectó intraventricularmente (0.20 µmol/rata) o 0.04 ml (9.76 mg) por vía intrayugular (40 µmol/rata). Los controles recibieron sólo el solvente. Como los resultados en estos últimos fue similar a los controles inyectados con solución salina 0.9%, los mismos se presentan conjuntamente.

Cimetidina (Smith, Kline & French) 20 mg i.p. (0.2 ml)/rata.

Todos los fármacos, excepto metiamida, fueron solubilizados en solución salina 0.9%.

7.7.2. Drogas GABAérgicas

Las líneas generales de metabolización del ácido GAMA aminobutírico y las drogas capaces de actuar sobre receptores GABAérgicos se hallan diagramadas en el Gráfico 2. (46).

En los presentes experimentos, las drogas, origen, dosis y vías de administración utilizadas fueron: GABA (Sigma) a la dosis de 150 µg (1.46 µmol/rata) y 825 µg (8.00 µmol/rata). Se microinyectó en un volumen de 2 µl en el III ventrículo.

Acido aminooxiacético, hemihidroclorhidrato (AAOA) (Sigma) 30 mg/Kg,

vía intraperitoneal. Su mecanismo de acción es inhibir la degradación enzimática del GABA cerebral, por lo que aumenta significativamente la concentración hipotalámica de éste, a los 90 minutos de la administración de AAOA (98).

7.8. Análisis estadísticos

Los resultados son expresados por su media y error estándar. El significado de las diferencias entre dos grupos apareados fue hecho mediante el test t de Students; cuando un número mayor de grupos fueron comparados se utilizó análisis de varianza. Cambios producidos en los niveles de hormonas circulantes por un tratamiento fueron analizados mediante el test t apareado (entre muestra basal y otra posterior). Análisis de regresión lineal fue utilizado para calcular la pendiente y número máximo de sitios de unión en el análisis de Scatchard (99). Los datos fueron obtenidos mediante una computadora Hewlett Packard 9815 A.

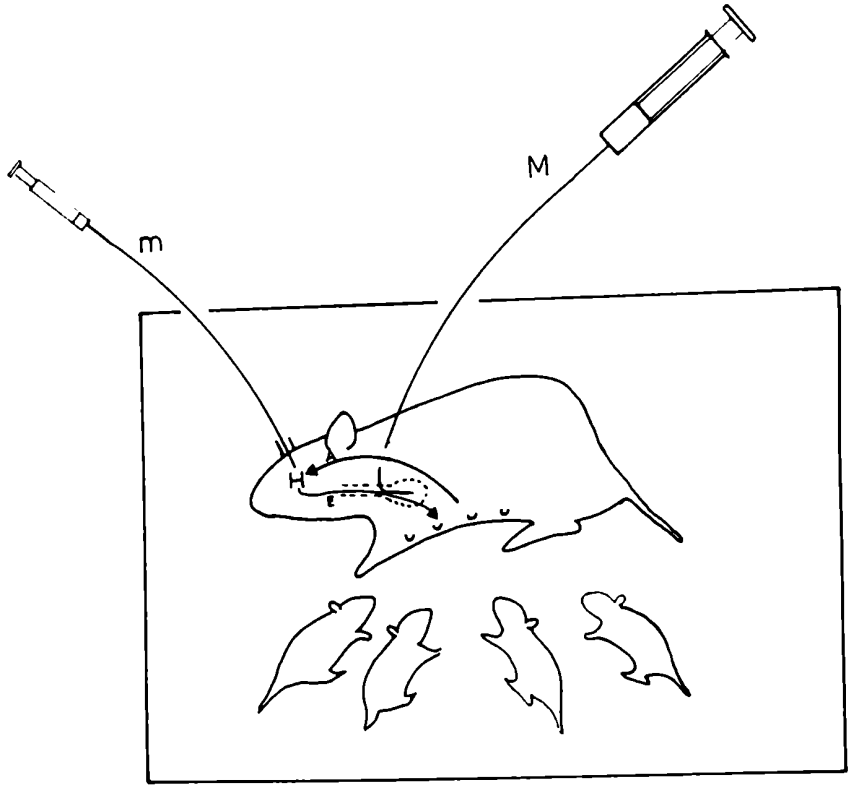

GRAFICO 4: Reflejo neuroendócrino de succión y condiciones experimentales.
La succión del pezón materno por las crías se integra en el hipotálamo (H). La aferencia es por vía nerviosa (A) y la eferencia es hormonal (E). En nuestras condiciones de trabajo, fue posible modificar las aferencias, permitiendo la succión (modelo hiperprolactinémico) o manteniendo separadas las crías de la madre (modelo con prolactinemia basal). La integración hipotalámica fue estudiada mediante la microinyección de fármacos en el tercer ventrículo cerebral (m). La respuesta se valoró cuantificando las hormonas en muestras tomadas por el cateter intrayugular (M). Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales, en ambiente tranquilo,despiertos, evitándose así los estímulos no controlables del ambiente (stress) y la interferencia de fármacos (anestesia).

8 Resultados

8.1. Estudios mediante neurofármacos

Mencionamos el alto contenido de neurotrasmisores en el hipotálamo, su distribución regionalizada en el mismo y la enorme importancia funcional que los mismos desempeñarían. Los experimentos que a continuación se detallan se realizaron, para estudiar el papel que desempeñan la histamina y el GABA hipotalámico en la regulación neuroendócrina.

8.1.1. Histamina hipotalámica

Se estudiaron los siguientes modelos experimentales

8.1.1.1. Madres en el postparto, con y sin succión

8.1.1.1.1. Valores basales

En las madres succionadas (MS) se elevan rápidamente los valores séricos de prolactina en controles inyectados con solución salina por vía intrayugular o en el III ventrículo (Gráf. 5). Hay un incremento de 12 a 18 veces sobre los valores basales ya a los 10 minutos y permanecen altos durante toda la hora que dura la experiencia. En contraste, en madres no succionadas (MNS) microinyectadas con salina, la prolactina permaneció baja durante todos los tiempos investigados (Madres no succionadas:MNS).

8.1.1.1.2. Bloqueantes H1: difenhidramina y

mepiramina

Ambas son antihistamínicos clásicos que bloquean a los receptores H1. Difenhidramina por vía general suprime la descarga prolactínica en MS (Gráf.6). A los 10 minutos de su inyección, el incremento fue de sólo 5 veces sobre los niveles basales y es significativamente menor ($p < 0.01$) que en los controles.

A los 20 minutos los valores séricos de la hormona de los animales tratados persisten aún más bajos que los inyectados con salina ($p < 0.05$), pero en las siguientes muestras las diferencias desaparecen. Cuando la difenhidramina fue microinyectada en el ventrículo cerebral, la inhibición de la descarga de prolactina fue aún más significativa y se extendió durante todo el experimento.

La mepiramina fue igualmente efectiva en bloquear parcialmente la descarga prolactínica debida a la succión (Gráf.7).

Ambos bloqueantes H1 no modificaron la prolactinemia en MNS.

8.1.1.1.3. Bloqueantes H2: metiamida

El bloqueante de los receptores H2, metiamida, microinyectada en el ventrículo no alteró la descarga de la hormona en MS (Gráf. 8). En cambio en las MNS metiamida por vía intraventricular libera abrupta y llamativamente prolactina.

En todos los tiempos estudiados los valores fueron mayores ($p < 0.001$)

en los inyectados con metiamida que en los controles. Cuando esta droga, que prácticamente no atraviesa la barrera hematoencefálica, fue administrada por vía intrayugular en MNS, no modificó los valores hormonales.

8.1.1.1.4. Histamina: microinyección intraventricular

En MNS inyectadas con histamina se observa un incremento ($p < 0.05$) de la prolactinemia a los 10 minutos (Gráf. 9).

8.1.1.1.5. Agonistas H2: 4 metilhistamina

Este derivado histamínico se caracteriza por tener una neta selectividad de estimulación de los receptores H2. Microinyectada en el ventrículo no modificó la hormona sérica en MNS (Gráf. 10); en cambio suprimió su liberación en MS surante todo el tiempo que duró la prueba.

8.1.1.2. Ratas ovariectomizadas estrogenizadas

8.1.1.2.1. Bloqueantes H2: cimetidina in vivo

Con el objeto de completar nuestros estudios se ensayó el efecto que tiene la cimetidina en hembras ovariectomizadas pretratadas 48 hs antes con 10 µg de benzoato de estradiol. La droga provocó una abrupta y significativa des-

carga hormonal (Gráf. 11). El tratamiento con atropina, 5 minutos antes o después de la administración de cimetidina, no modificó el efecto hiperprolactinémico de ésta. Tampoco actuaron la difenhidramina ni la mepiramina.

En cambio, el efecto hiperprolactinémico de la cimetidina fue prevenido por la pilocarpina, injectada antes o después de la misma. La dopamina también provocó un neto bloqueo de la acción de la cimetidina.

8.1.1.2.2. Agonistas muscarínicos y antihistamínicos

Pilocarpina reduce a un tercio la prolactinemia en ratas ovariectomizadas estrogenizadas, a los 30 minutos de injectadas (Gráf. 12). Este efecto fue prevenido por la atropina. El alcaloide solo, no modifica el nivel hormonal. Mepiramina tampoco altera la prolactinemia basal y ni ella ni la difenhidramina alteran la acción hipoprolactinémica de la pilocarpina.

8.1.1.2.3. Cimetidina in vitro

En incubaciones de corta duración, la droga a tres concentraciones diferentes, no actuó sobre la liberación de prolactina al medio por hipófisis incubadas (Gráf. 13).

8.1.2. GABA hipotalámico

8.1.2.1. Madres en el postparto, con o sin succión

8.1.2.1.1. GABA: microinyección intraventricular

En madres lactantes, la dosis mayor de GABA inyectada fue capaz de inhibir la descarga de prolactina a los 10 minutos ($p < 0.05$) en relación a los controles inyectados con salina (Gráf. 14).

Contrariamente en MNS, GABA no alteró la prolactinemia a dicha dosis (Gráf. 15).

8.1.2.1.2. Acido aminooxiacético (AAOA)

La administración de AAOA a las madres, 90 minutos antes de comenzar la succión, inhibe la descarga prolactínica a los 10 y a los 30 minutos de comenzada aquella. El tratamiento no modificó los valores pre-basales (obtenidos antes de la inyección) y basales (obtenidos antes de comenzar la succión) (Gráf. 16).

En MNS, la droga no alteró la prolactinemia (Gráf. 17).

8.1.2.2. Stress experimental en ratas machos

8.1.2.2.1. GABA exógeno

Ratas machos fueron sometidas durante 3 minutos a "stress" por vapores de eter con el objeto de incrementar la prolactinemia. Luego, la mitad de ellos fueron inyecta

dos con GABA en el tercer ventrículo y la otra mitad con salina como control (Gráf. 18). Quince minutos después de la inyección (18 minutos de comienzo de la anestesia eterea) la prolactinemia fue significativamente menor en el grupo que recibió GABA ($p < 0.05$).

8.1.2.2.2. GABA endógeno (tratamiento con ácido aminooxiacético)

El "stress" por eter incrementa rápidamente los valores prolactinémicos en machos controles inyectados con salina intraperitoneal ($p < 0.001$) (Gráf. 19). En contraste, en machos inyectados 90 minutos previos al experimento con AAOA, un neto efecto supresivo se observó, y consecuentemente no se halló diferencia significativa entre los grupos inyectados con AAOA, sometidos o no al "stress".

8.2. Destrucción experimental del hipotálamo medio basal

8.2.1. Unión de ^{3}H-estradiol en hipotálamo e hipófisis anterior

En los testigos la unión citosólica en la pituitaria fue de 59.7 ± 6.2 fmol/mg de proteína, mientras que en los experimentales con lesión medio basal, descendió a 36.9 ± 6.1 ($p < 0.025$) (Gráf. 20). La unión en hipotálamo, del esteroide marcado, es menor que en la hipófisis en ambos grupos, en coincidencia con la biblio

grafía (100, 101) y la destrucción de la eminencia media no modifica estos bajos valores.

Simultáneamente, se cuantificaron dos hormonas hipofisarias que se hallan íntimamente reguladas por el hipotálamo, pero de desigual manera. La LH cuya liberación es facilitada por el mismo y la prolactina, cuya liberación es inhibida. Como era de esperar, la destrucción de la eminencia media provoca un descenso considerable de la LH y un notable incremento de la prolactina.

8.2.2. Efecto del tiempo de lesión

Con el objeto de precisar los cambios en el receptor en función del tiempo de lesión hipotalámica, estudiamos la unión a la hora, y, 1, 7 y 21 días después de la lesión (Gráf. 21). A la hora, la unión en la hipófisis se redujo ya en un 34% y desciende aún más a las 24 hs para llegar al 20% de sus valores controles a los 7 y 21 días.

Concomitantemente, la prolactinemia asciende de 21:2 ng/ml de suero en los controles a 239 : 60 ng/ml, 300 94, 279 : 50 y 236 : 57 ng/ml de suero a la hora, 1, 7, y 21 días, respectivamente (4 ratas por punto).

8.2.3. Análisis de Scatchard

La cinética de unión del esteroide tritiado a fracciones citosólicas de ratas controles y lesionadas, fue investiga

da incubando fracciones del citosol de hipófisis provenientes de animales controles y lesionados con concentraciones crecientes de estradiol (de 760 a 7600 fmol) (Gráf. 22). El número máximo de sitios de unión disminuyó de 170 fmol/mg de proteína en los controles a 79 en los experimentales. Las constantes de asociación (Ka) en ambos grupos se hallan en el mismo rango (1.72×10^{8} M^{-1} en controles y 3.58×10^{8} M^{-1} en lesionadas); la diferencia en la pendiente no es significativa. Esto indicaría que la diferencia en la unión específica entre los grupos se debería a cambios en el número máximo de sitios de unión, mas que a modificaciones en la afinidad del receptor. Todos los animales de este estudio eran hiperprolactinémicos y tenían valores de LH menores de 1 ng/ml.

8.2.4. Captación in vivo de ^{3}H-estradiol en el hipotálamo, otras áreas neurales e hipófisis.

En animales controles, la mayor captación del esteroide inyectado fue en la hipófisis, seguida por el hipotálamo; las restantes áreas neurales contenían menor radioactividad (Tabla I). La captación disminuye significativamente en los animales experimentales tanto en el hipotálamo como en la hipófisis. En el área preóptica, septum, amigdala, hipocampo, y corteza cerebral no se observaron cambios.

8.2.5. Síntesis de proteínas hipotalámicas e hipofisarias

Se estudió la incorporación de ^{3}H-glicina a proteínas

totales hipotalámicas e hipofisarias (Tabla II). La síntesis era mayor en la hipófisis que en hipotálamo en ambos grupos; no se observaron diferencias entre controles y experimentales en ninguna de las regiones estudiadas.

8.2.6. Efecto de la bromoergocriptina en animales con destrucción del hipotálamo medio basal

El tratamiento de animales con lesión de la eminencia media, con bromoergocriptina, a razón de dos dosis diarias de 1.5 mg/Kg cada una y durante 8 días, incrementa la unión del esteroide tritiado a la glándula, al mismo tiempo que reduce la prolactinemia (Gráf. 23).

8.2.7. Efecto de la bromoergocriptina en animales con la unidad hipotálamo hipofisaria intacta

En animales con una relación normal hipotálamo hipofisaria se efectuó un tratamiento con bromocriptina de iguales características que en el punto previo. En estas ratas con hipotálamo intacto, la elevación de la unión del esteroide a la glándula no alcanza significación estadística. La prolactinemia es igualmente baja en los dos grupos (Gráf. 24). Aparentemente el efecto de la droga es específico en los animales con lesión hipotalámica.

8.2.8. Efecto de la hiperprolactinemia por injerto de hipófisis

En esta situación experimental, se observó que el injerto glandular provoca un incremento de los niveles de prolactina en aproximadamente 5 veces sobre los controles; pero no se altera la unión de ^{3}H-estradiol en la hipófisis *in situ*. La unión en las hipófisis *in situ* de los animales hiperprolactinémicos fue de 157 ± 9 fmol/mg proteína, comparables a los valores de 163 ± 16 y 189 ± 36 fmol/mg proteína que poseen los controles representados en los gráficos 23 y 24, respectivamente (Gráf. 25).

Secundariamente, se observó, que la unión del esteroide tritiado en las glándulas transplantadas es sensiblemente menor que en la glándula *in situ*.

Además, y, a diferencia de lo que ocurre en el animal lesionado, la bromocriptina no restaura la unión del esteroide a la glándula transplantada, aunque es efectiva para reducir la prolactinemia.

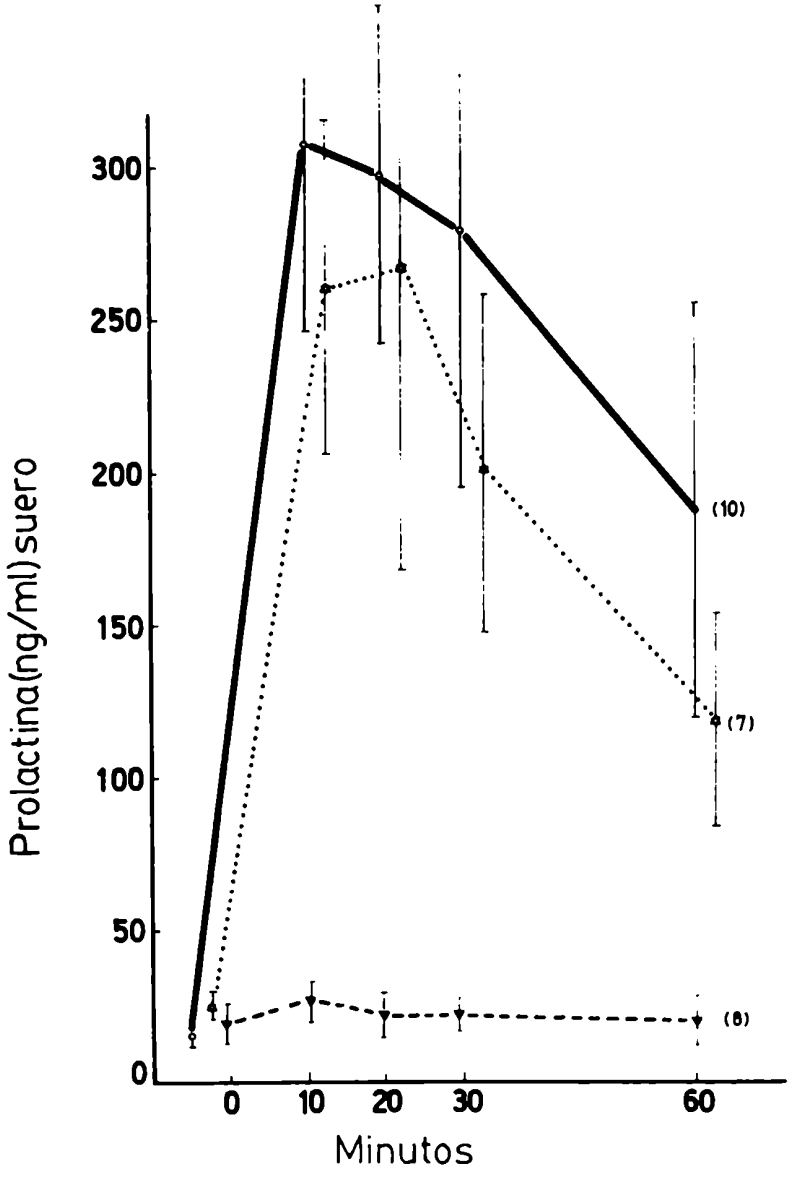

GRAFICO 5: Reflejo de succión.
La succión del pezón de las madres por las crías, desencadena un reflejo neuroendócrino con participación hipotalámica. Obsérvese la hiperprolactinemia refleja,en madres succionadas inyectadas con solución salina intrayugular (línea sólida) o en el tercer ventrículo cerebral (línea punteada). Tiempo 0: comienzo de la succión. En madres no succionadas microinyectadas con salina en el ventrículo, la hormona permanece baja (línea de guiones). En este y gráficos siguientes: entre paréntesis se indican número de animales por grupo. Las líneas verticales corresponde a un error estándar de la media.

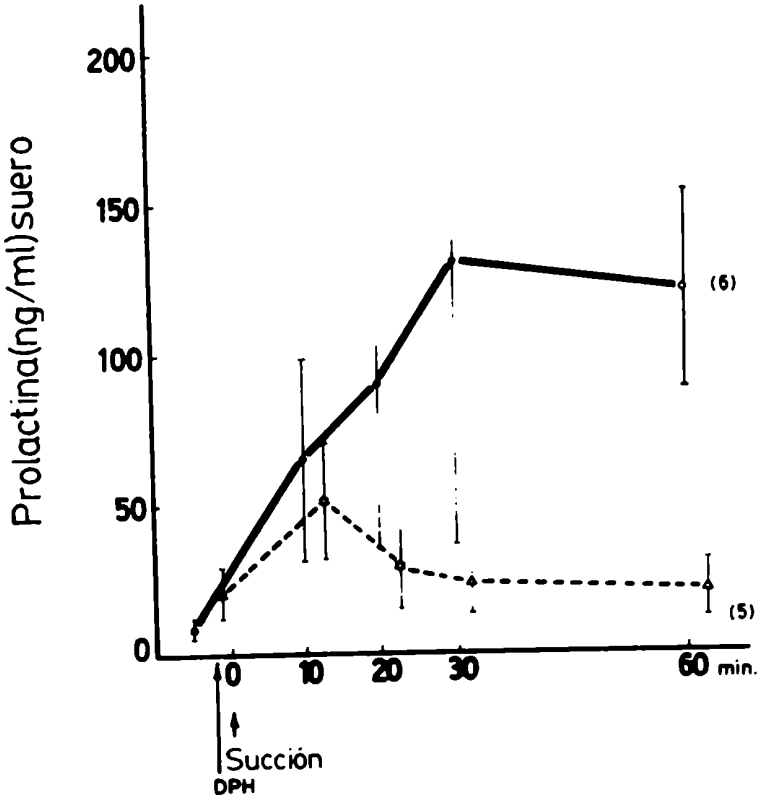

GRAFICO 6: Efecto supresivo de los bloqueantes H1; difenhidramina. Difenhidramina (DPH) inyectada por vía yugular (línea sólida) o microinyectada en el ventrículo (línea de guiones) suprime parcialmente la descarga prolactínica refleja por succión. Compárese con los controles inyectados con salina presentados precedentemente (Gráf.5).

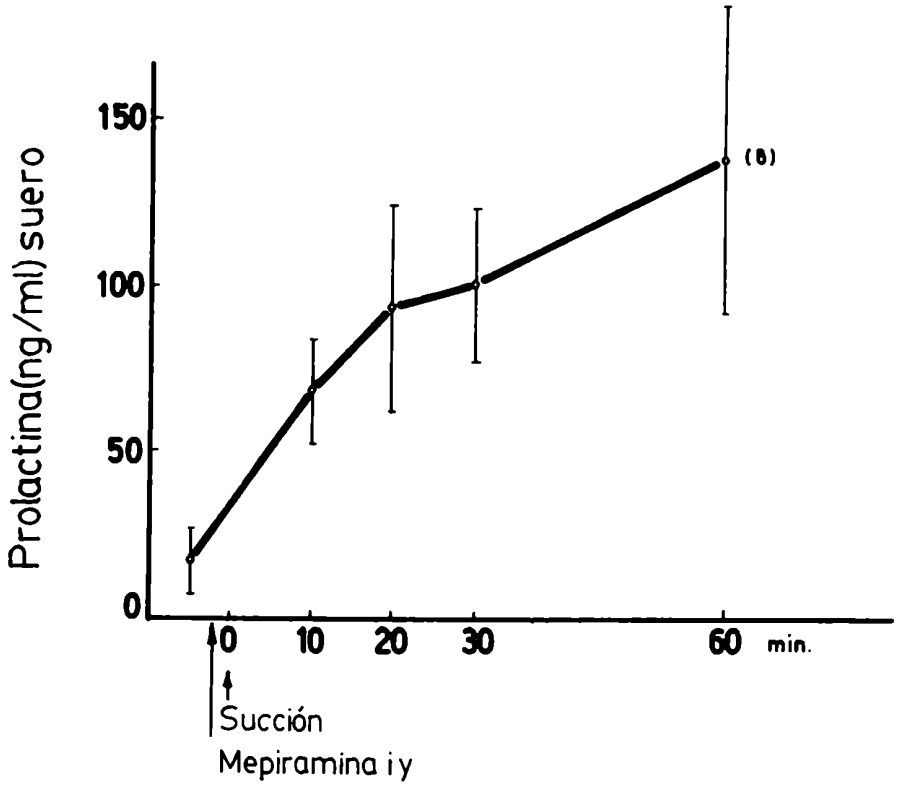

GRAFICO 7: Efecto supresivo de los bloqueantes H1; Mepiramina. Mepiramina intrayugular (iy) también produce un bloqueo parcial y significativo del reflejo de succión. Compárese con los controles en el Gráf. 5. A los 10 minutos, la elevación en los tratados con mepiramina es de un tercio del correspondiente a los inyectados con salina ($p < 0.01$); al transcurrir el tiempo el bloqueo parcial desaparece.

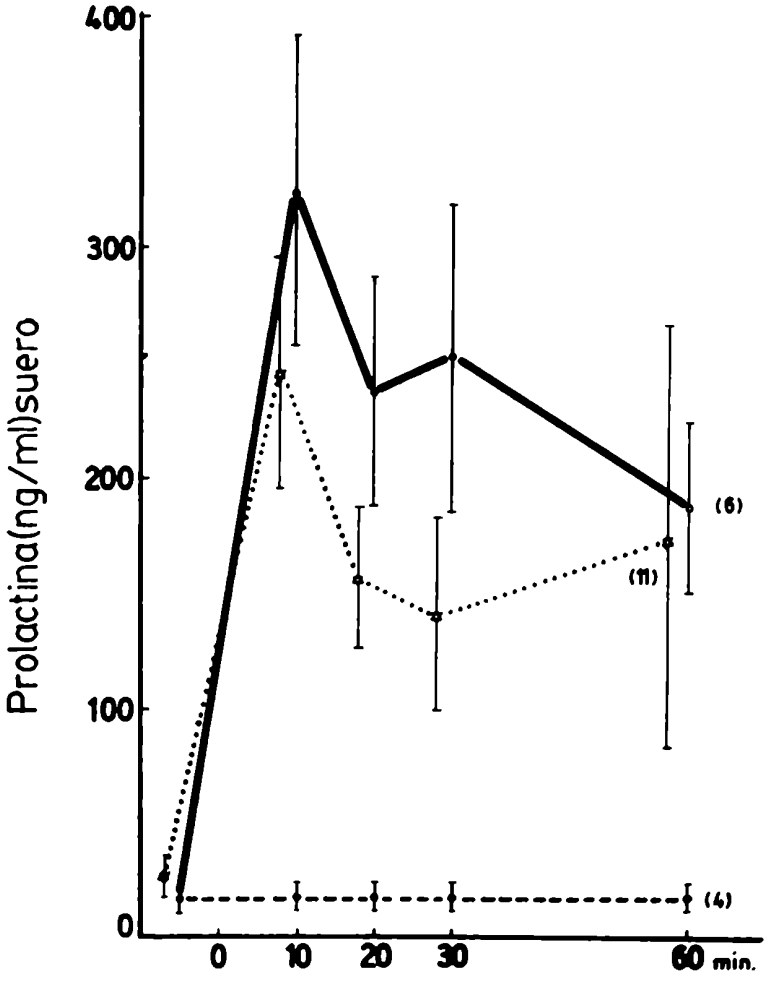

GRAFICO 8: Efecto de bloqueantes H2: metiamida.
La microinyección intraventricular de metiamida en madres no succionadas provoca un significativo incremento de la prolactinemia (línea sólida). La misma droga, que no atraviesa la barrera hematoencefálica, es inefectiva por vía general (línea de guiones). Metiamida intraventricular no altera la hiperprolactinemia de los animales succionados (línea punteada).

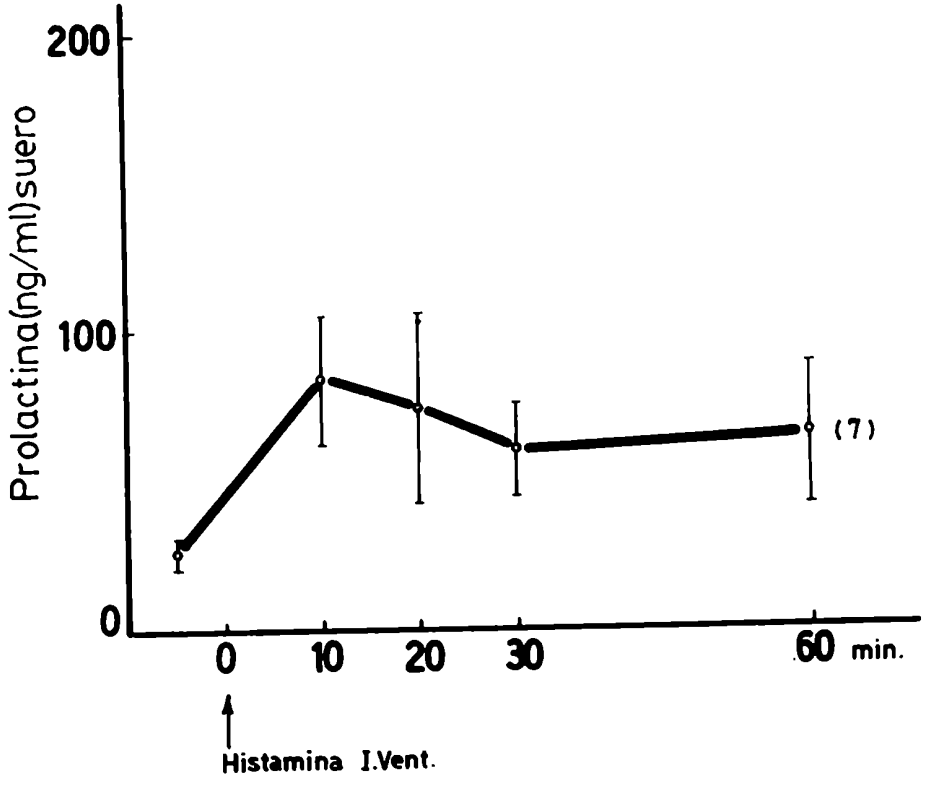

GRAFICO 9: Histamina en el tercer ventrículo cerebral.
La microinyección de histamina libera significativamente prolactina en madres no succionadas. A los 10 minutos: $p < 0.05$. Compárase con los valores contantes observados en controles no succionados microinjectados con salina y representados en Gráf. 5.

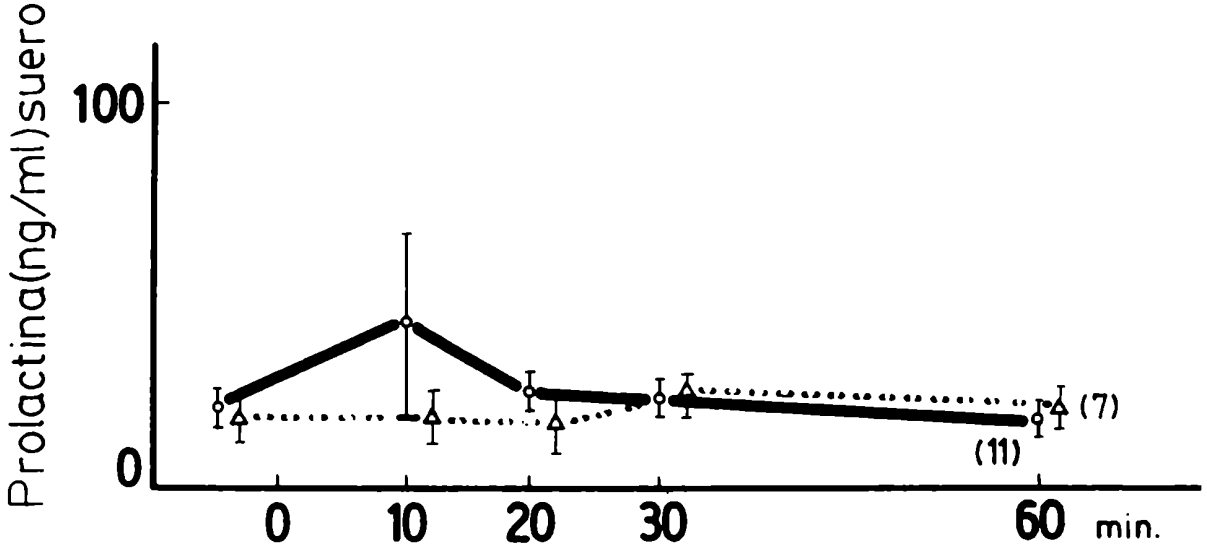

GRAFICO 10: Agonistas H2: 4 metilhistamina.
La microinyección de 4 metilhistamina en el ventrículo bloquea la descarga prolactínica refleja en madres succionadas (línea sólida). La misma droga carece de efecto en las no succionadas (línea punteada).

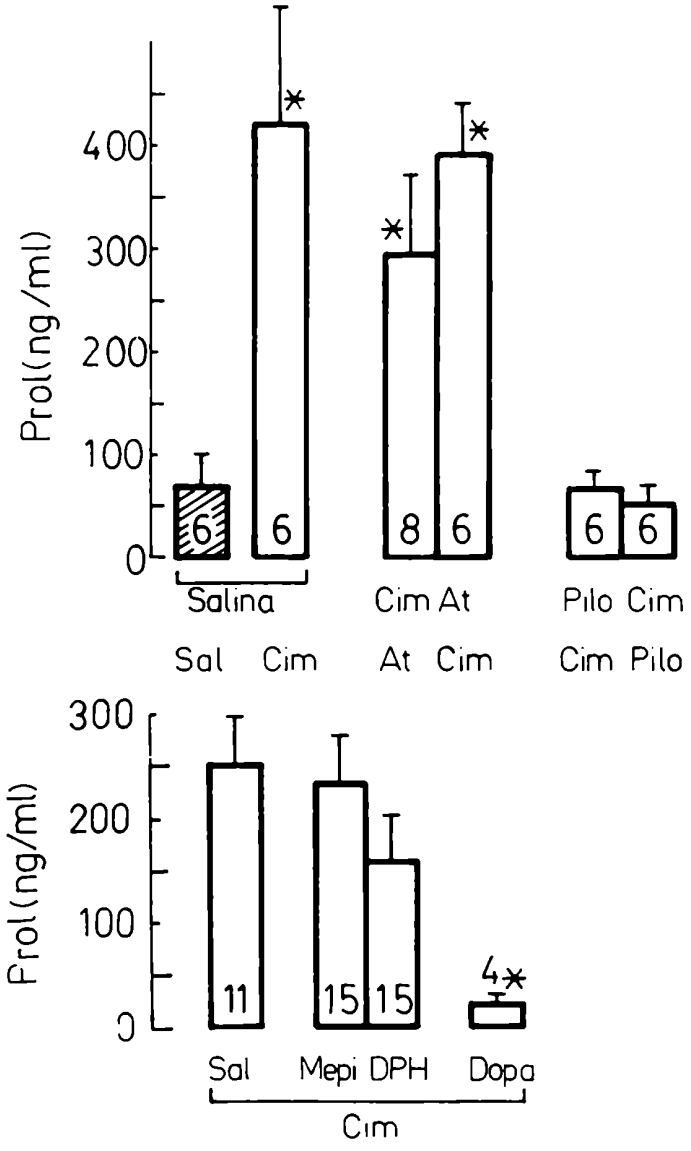

GRAFICO 11: Efecto de la cimetidina y otras drogas neurotrópicas sobre la descarga prolactínica en ratas ovariectomizadas estrogenizadas. Al pie de cada columna se indica el tratamiento farmacológico : en la línea superior se indica la primera droga injectada; en la línea inferior se menciona la segunda droga, administrada 5 minutos después de la primera.
Número de animales: en el interior de cada columna.
* $p < 0.05$ o menor
Sal: Salina Pilo: Pilocarpina Mepi: Mepiramina
DPH: Difenhidramina Dopa: Dopamina

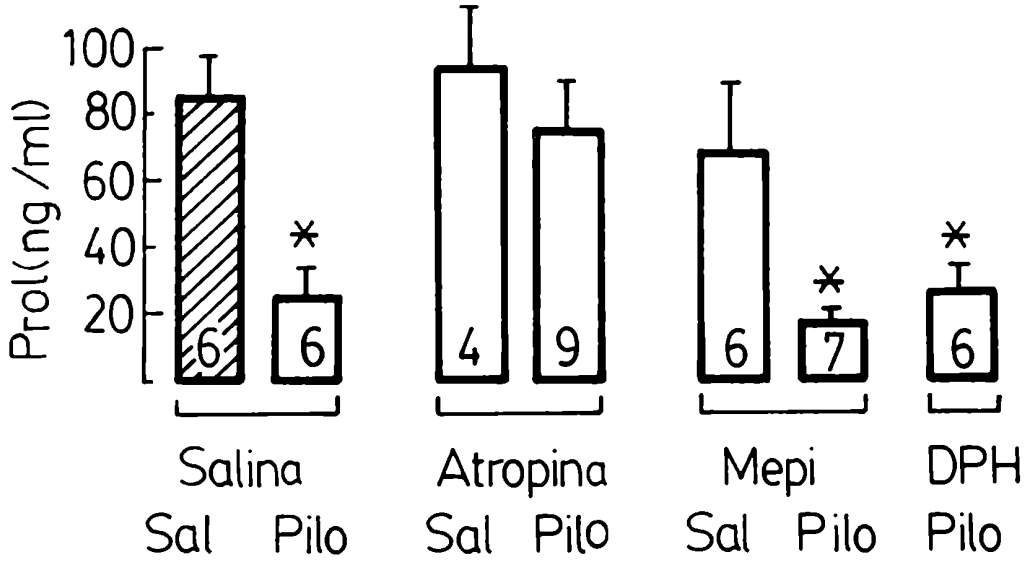

GRAFICO 12: El efecto hipoprolactinémico de la pilocarpina (Pilo) es abolido por la atropina pero no por antihistamínicos clásicos: Mepiramina (Mepi) ni Difenhidramina (DPH). Ni la atropina ni la mepiramina modifican la prolactinemia basal en ratas ovariectomizadas estrogenizadas.

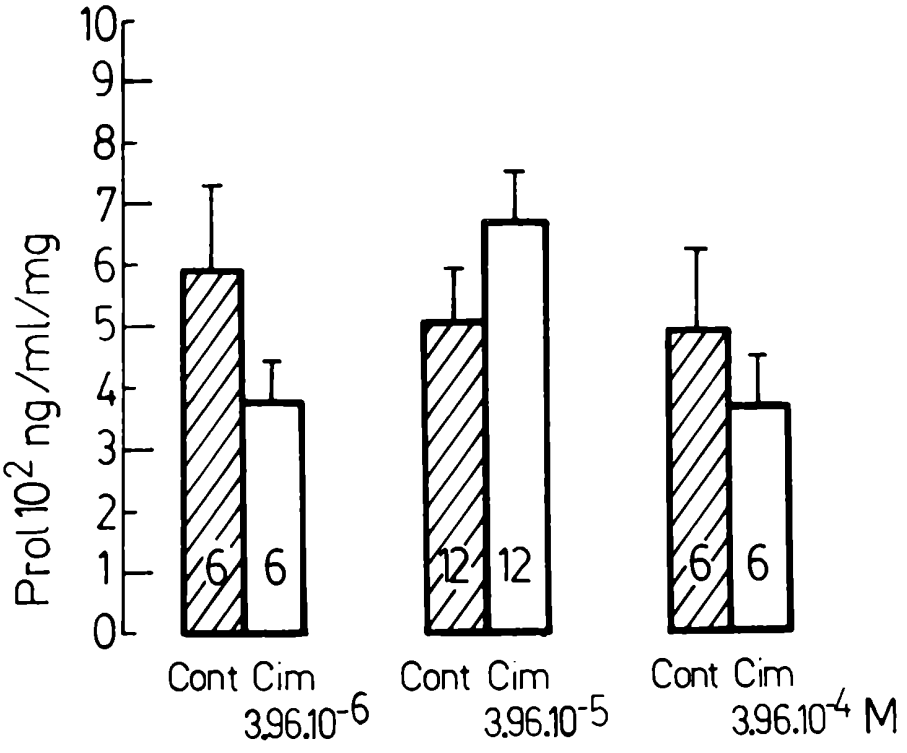

GRAFICO 13: Cimetidina in vitro. Cada glándula fue dividida en dos partes aproximadamente iguales. Una se utilizó como control (columna rayada) y la otra se incubó con cimetidina (columna abierta). Se hicieron tres experimentos, con distintas concentraciones de la droga.
La cimetidina no modificó la liberación de prolactina al medio.

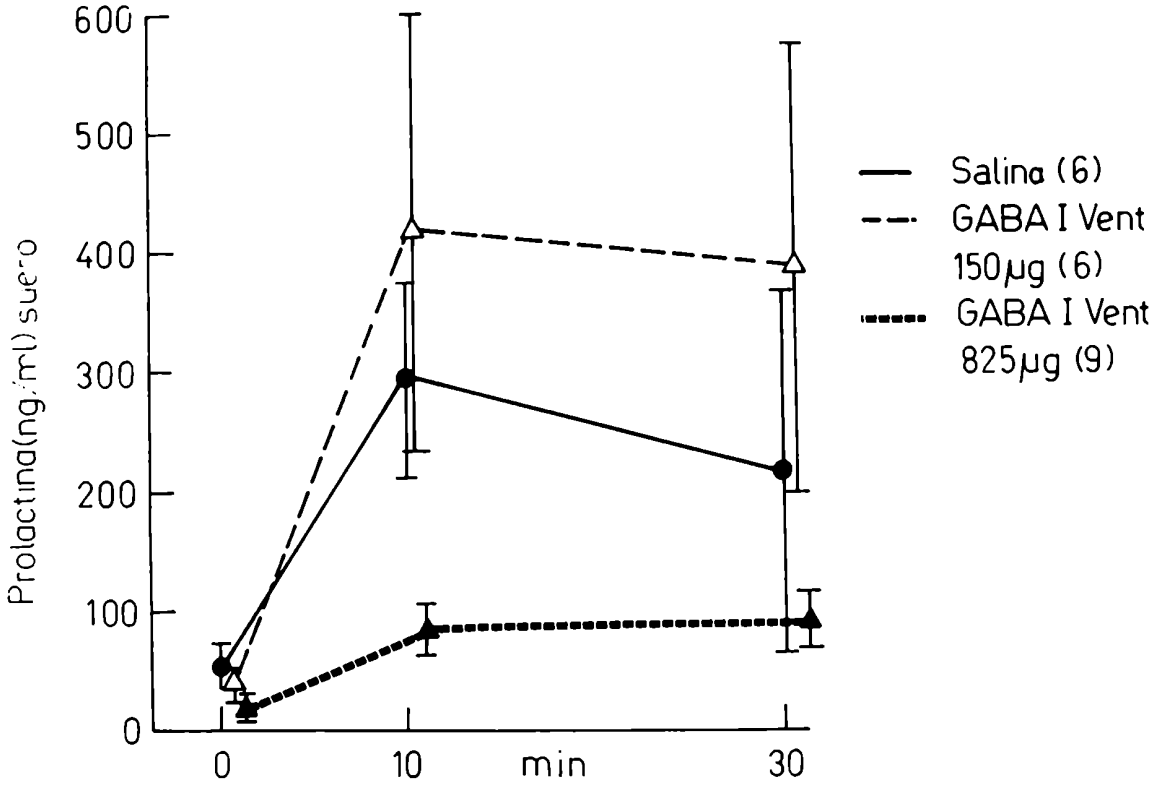

GRAFICO 14: GABA exógeno: supresión parcial de la descarga prolactínica refleja en madres succionadas.
Luego de 10 minutos de succión, la prolactinemia de las madres inyectadas con 825 µg de GABA es menor que en las controles inyectadas con solución salina ($p < 0.05$).

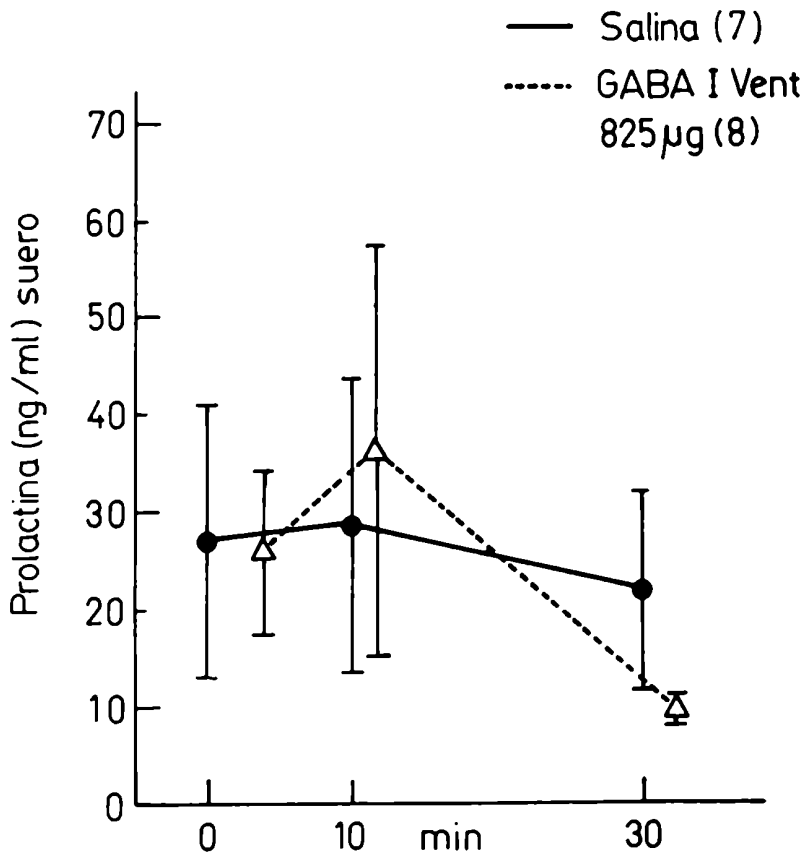

GRAFICO 15: Microinyección de GABA en MNS.
En madres no succionadas, la microinyección de salina o de GABA en el tercer ventrículo encefálico (1 vent.) no modifica los niveles hormonales.

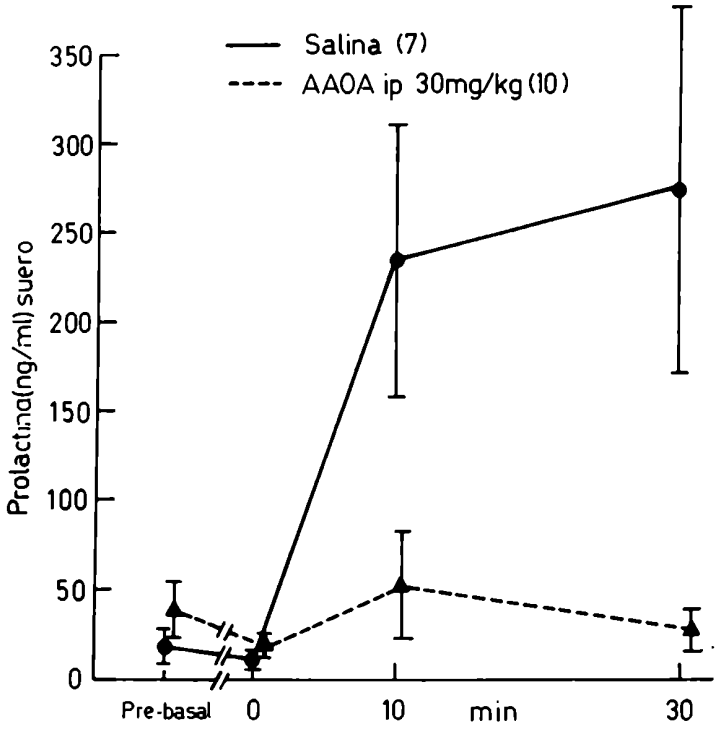

GRAFICO 16: Acido aminooxiacético: incremento del GABA endógeno. Al ácido aminooxiacético incrementa el GABA hipotalámico endógeno y provoca una neta supresión de la descarga hormonal refleja, a los 10 y 30 minutos de succión ($p < 0.05$). La droga no modifica los valores prolactinémicos prebasales y a los 0 minutos.
AAOA: ácido aminooxiacético.
ip: intraperitoneal.

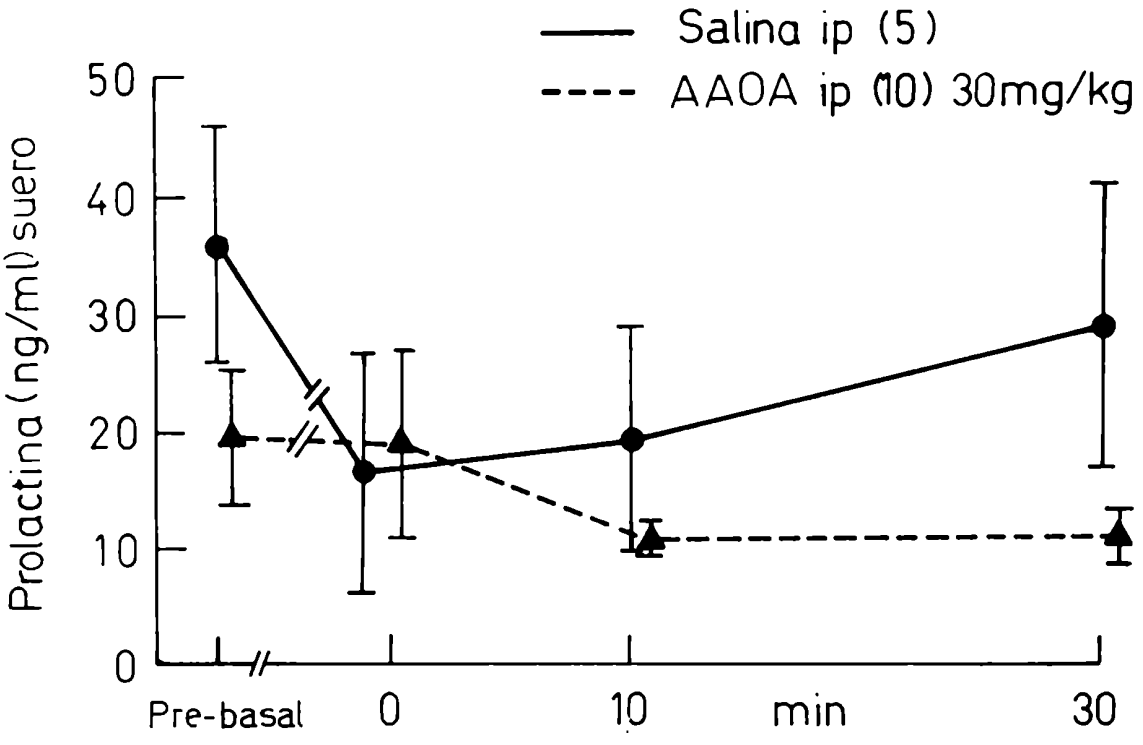

GRAFICO 17: En madres no succionadas, el ácido aminooxiacético (AAOA) por vía intraperitoneal (ip) no altera la prolactinemia.

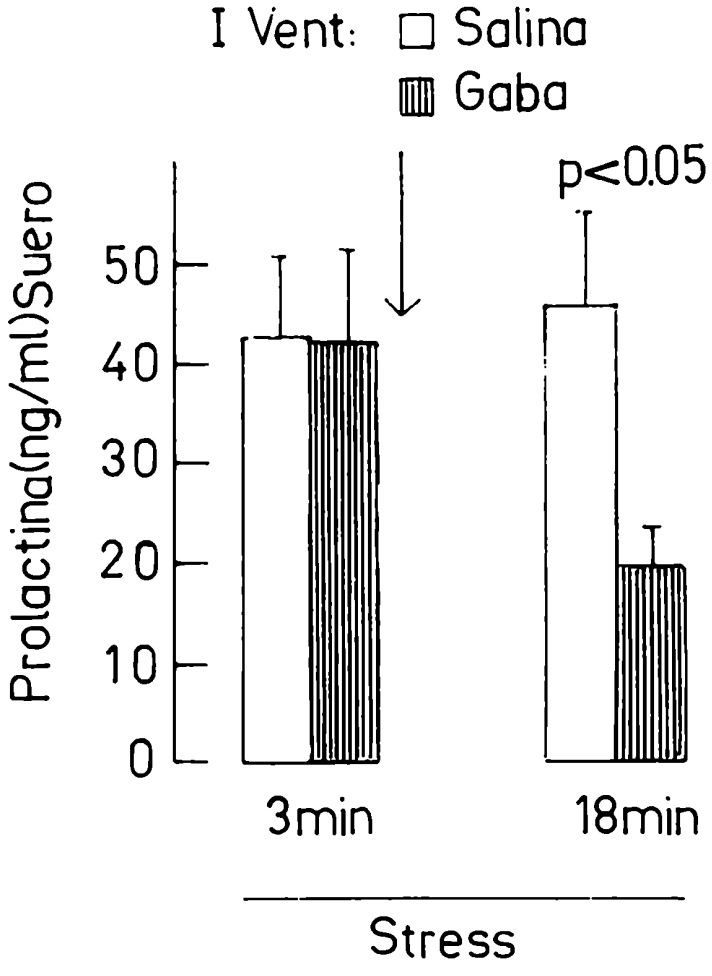

GRAFICO 18: GABA exógeno y stress experimental.
Después de tres minutos de stress por éter y antes de la inyección de salina o GABA, la hiperprolactinemia refleja es similar en ambos grupos. A los 18 minutos de comenzado el stress, es decir 15 minutos después de la microinyección de salina o GABA, la prolactinemia es menor en el grupo experimental que en el control ($p < 0.05$; 6 a 9 animales por grupo).

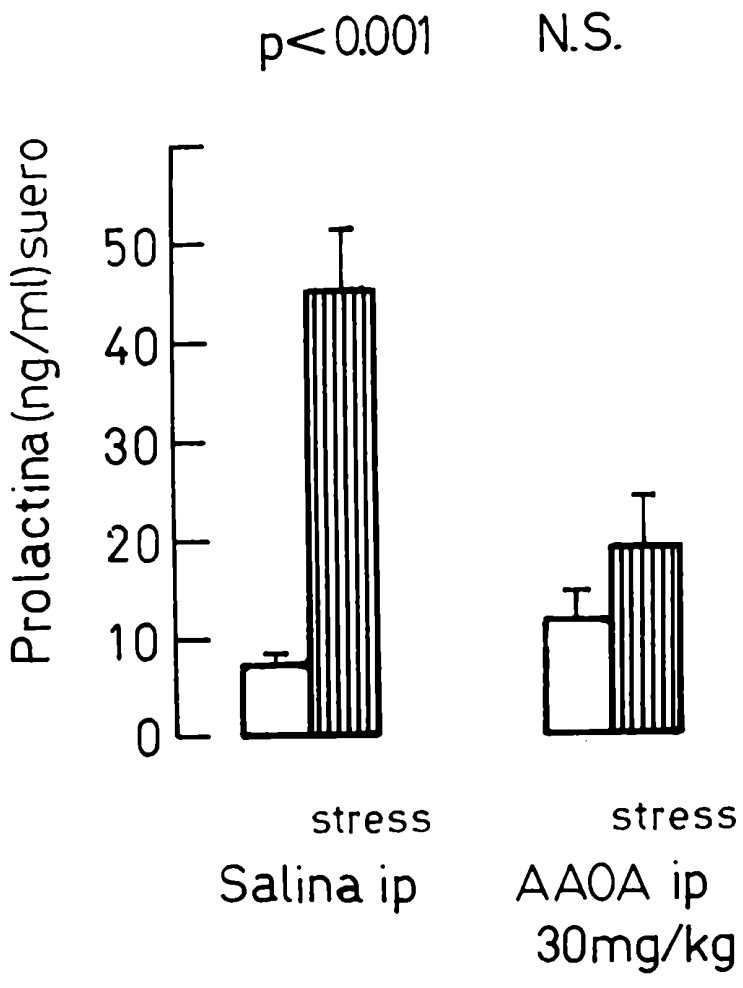

GRAFICO 19: GABA endógeno y stress experimental.
El stress por éter incrementa la prolactinemia en ratas controles pretratadas con solución salina ($p < 0.001$). En contraste, en animales inyectados con ácido aminooxiacético (AAOA), para incrementar el contenido hipotalámico de GABA, el aumento hormonal es suprimido.
N.S.: no significativo.

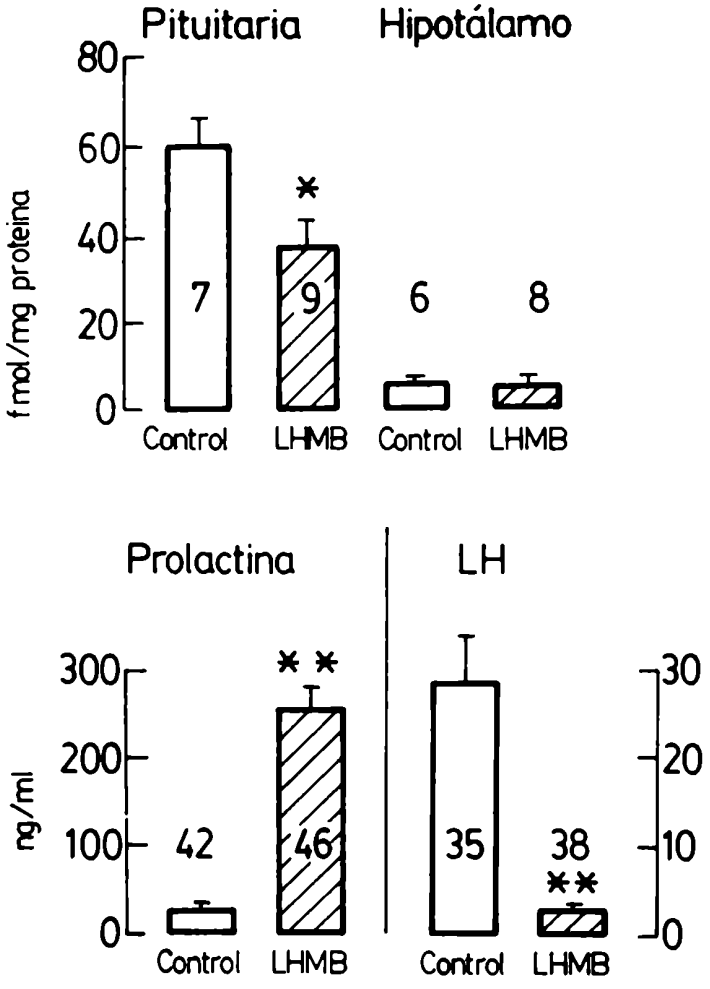

GRAFICO 20: Unión citosólica de ^{3}H estradiol en hipotálamo e hipófisis. Efecto de la lesión estereotáxica del hipotálamo medio basal.
Arriba: Unión de ^{3}H estradiol al citosol de hipófisis anterior e hipotálamo en ratas controles sometidas a operación ficticia (columnas claras) y en ratas con lesión del hipotálamo medio basal (LHMB) (columnas rayadas). Los números en el interior de las columnas indican el número de experimentos individuales, cada uno realizado con 5 controles y 5 ratas lesionadas.
Abajo: Niveles séricos de prolactina y de LH en los mismos grupos de animales. Los números dentro o sobre las columnas indican número de ratas estudiadas.
* $p < 0.025$ ** $p < 0.001$

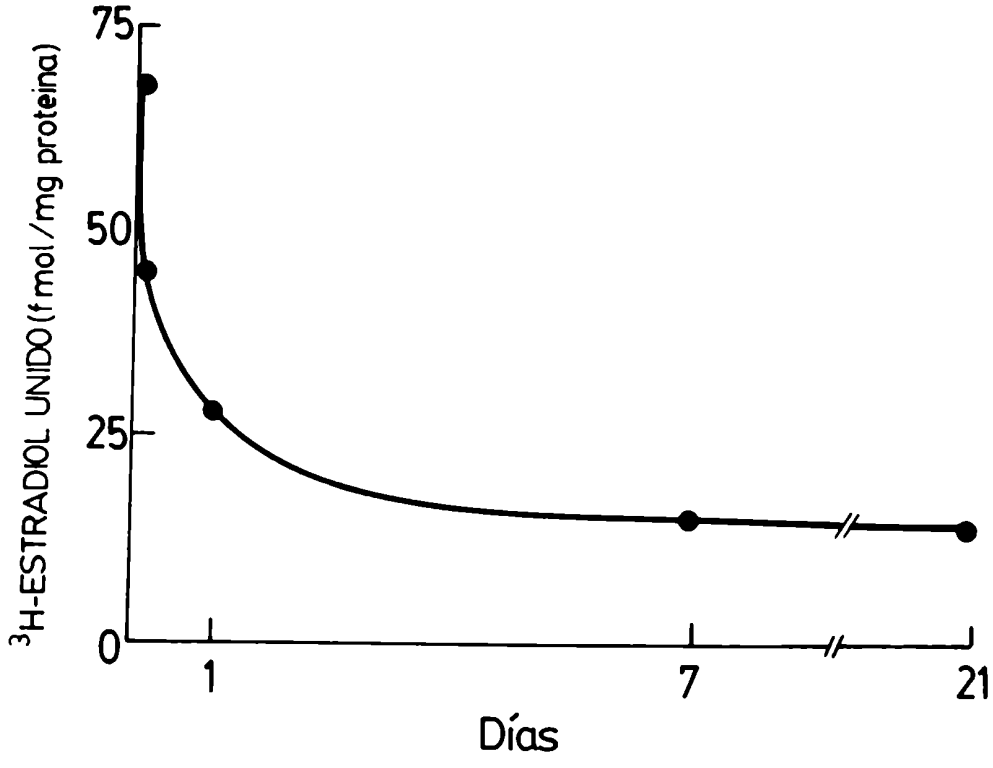

GRAFICO 21: Tiempo post-lesión hipotalámica y unión citosólica de estradiol.
La unión de ^{3}H estradiol al citosol de hipófisis anterior en ratas con hipotálamo medio basal lesionado y estudiadas 1 hora y 1, 7 y 21 días después de la operación.

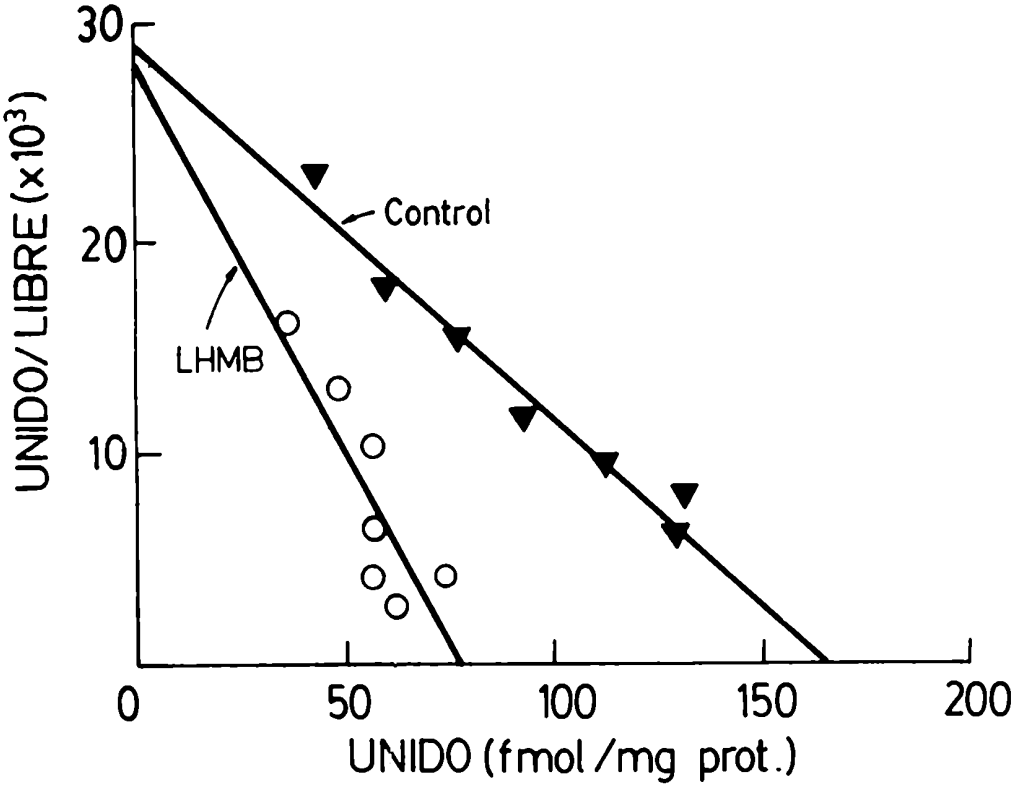

GRAFICO 22: Análisis de Scatchard de la unión de ^{3}H estradiol al citosol de anterohipófisis en ratas controles ovariectomizadas (triángulos) y en ratas con lesión de eminencia media (círculos).
En los controles, la capacidad de unión máxima fue de 170 fmol/mg de proteína, el Ka 1.72 x 10^{8} M^{-1} (para la pendiente, r= 0.97, $p < 0.001$).
En los lesionados, la capacidad de unión máxima fue de 79 fmol/mg de proteína, el Ka 3.58 x 10^{8} M^{-1} (para la pendiente, r= 0.85, $p < 0.05$).

TABLA I

Captación de ^{3}H-estradiol en diversas regiones neurales e hipófisis

Región	Control		Lesión hipotalámica	
	dpm/100 mg tejido	T/C	dpm/100 mg tejido	T/C
Hipófisis anterior	36044 ± 3597	37.1	20514 ± 1766*	22.9
Hipotálamo	3218 ± 266	3.3	1842 ± 200*	2.1
Area preóptica	2222 ± 206	2.3	1920 ± 260	2.1
Septum	1801 ± 207	1.8	1340 ± 123	1.5
Amigdala	1693 ± 236	1.7	1423 ± 141	1.6
Hipocampo	1243 ± 134	1.3	908 ± 131	1.0
Corteza cerebral	970 ± 84		894 ± 154	

T/C: Relación radioactividad tisular/radioactividad en corteza cerebral.

Resultados expresados como media: Error estándar; 6 animales, por grupo.

*Diferencia significativa con grupo control ($p < 0.01$).

TABLA II

Incorporación de ^{3}H-glicina en proteínas de hipotálamo e hipófisis en ratas control, con operación ficticia, y con lesión hipotalámica.

		Incorporación (cpm/mg proteína)	
	Número	Hipófisis anterior	Hipotálamo
Control	3	12652 ± 778	2008 ± 265
Lesión Hipotálamo Medio Basal	3	14250 ± 616	2898 ± 1051

Resultados expresados como media: Error estándar.

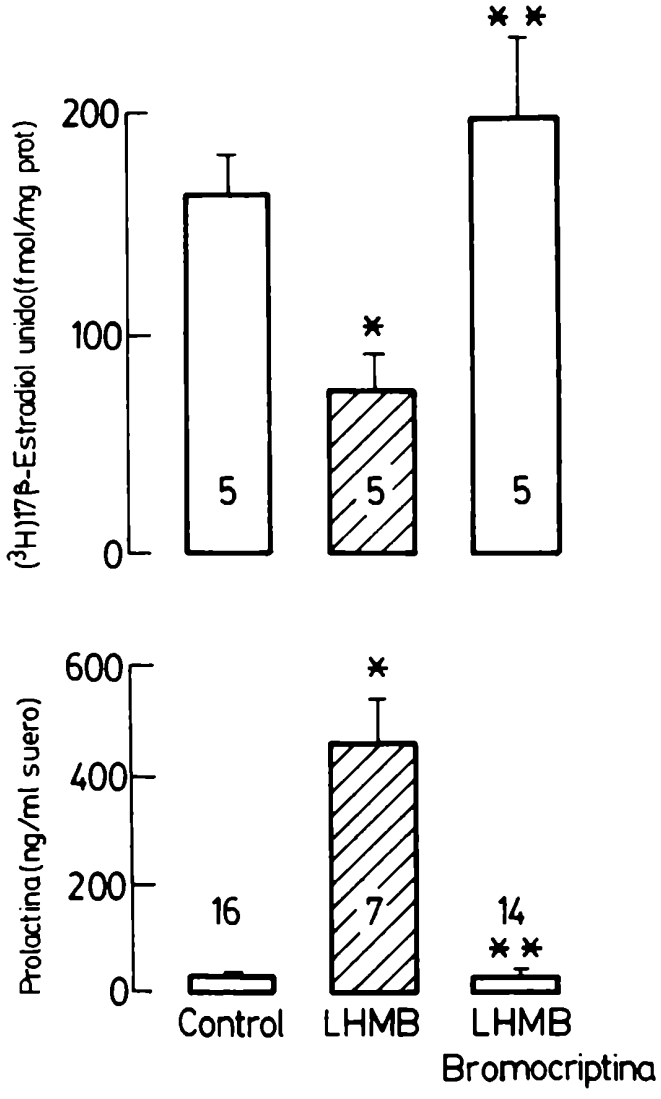

GRAFICO 23: Arriba: La unión de ^{3}H estradiol al citosol de hipófisis es menor en animales lesionados en el hipotálamo medio basal (LHMB) que en controles sometidos a operación ficticia. En animales con lesión y tratados con bromoergocriptina, desde el momento de la destrucción hasta el de obtención de la muestra, la unión del esteroide se recupera.
Abajo: Prolactina sérica en los grupos.
Los animales LHMB recibieron el vehículo de la droga únicamente.
* $p < 0.001$ vs control ** $p < 0.02$ vs LEM

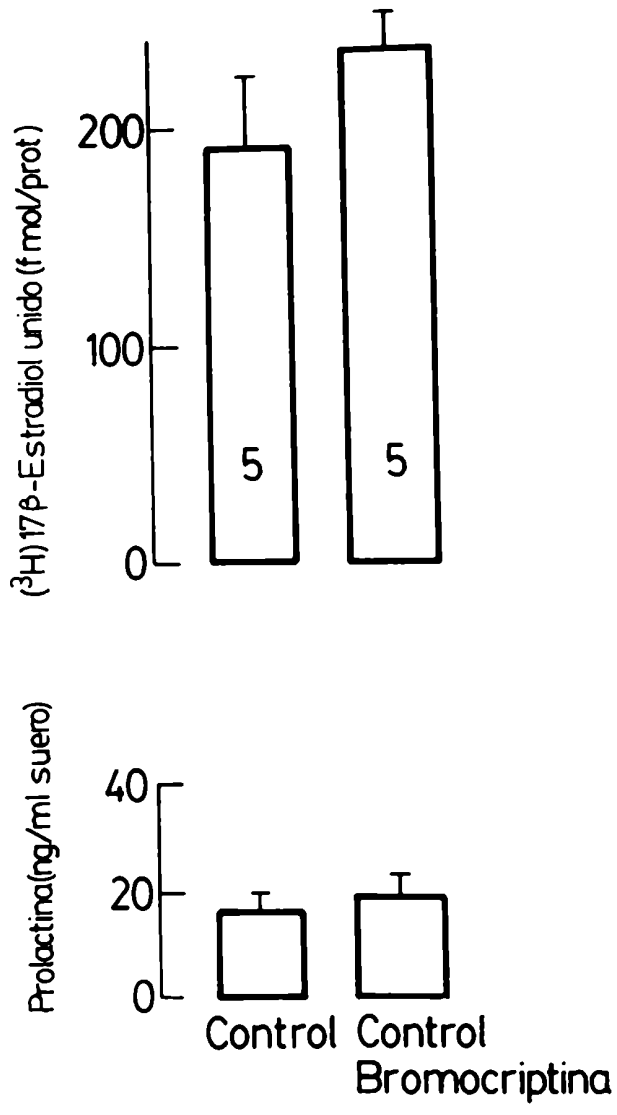

GRAFICO 24: Arriba: Unión de ^{3}H estradiol a citosol de hipófisis de animales tratados con bromocriptina o con vehículo. Abajo: Prolactinemia en los mismos grupos.

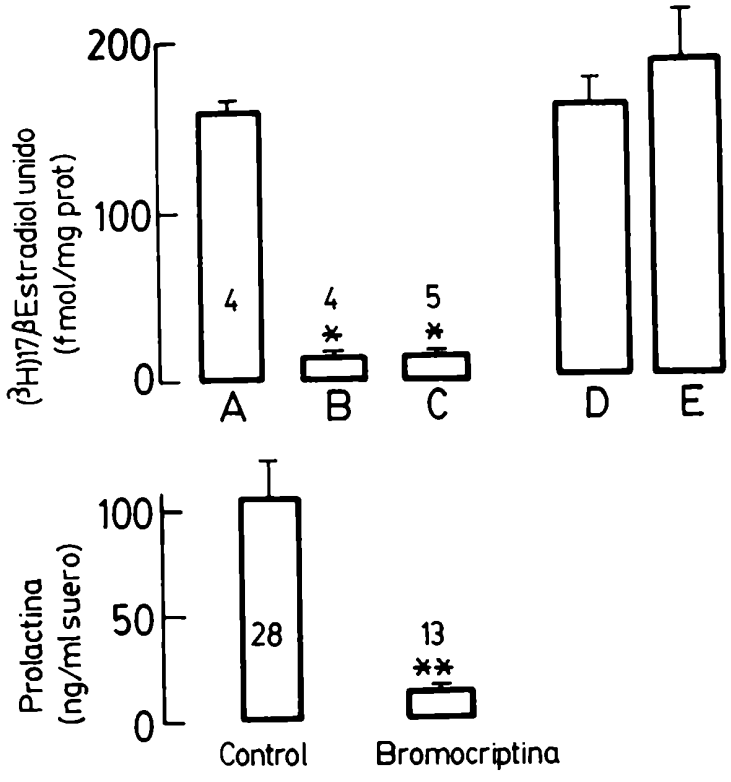

GRAFICO 25: Arriba: La unión de ^{3}H estradiol a hipófisis in situ de animales con injerto (A), en la hipófisis transplantada (B) y en hipófisis transplantada tratadas con bromocriptina (C). Compárese el valor de A con los controles de los experimentos previos D y E.
Abajo: Prolactinemia en animales transplantados con tratamiento con bromocriptina o sin él.
* $p < 0.001$ vs pituitarias in situ (A).
** $p < 0.001$

9 Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos amplían y profundizan nuestros conocimientos sobre algunas de las funciones hipotalámicas, el papel integrador de dicha área neural y sus neurotrasmisores sobre el control neural de la secreción prolactínica.

a) - Durante la succión se desencadena un reflejo neuroendócrino cuya respuesta, la hiperprolactinemia, observamos.

En MS la prolactina se eleva rápidamente en coincidencia con lo informado en la literatura (82, 92, 93). En las MNS la hormona permanece baja, no afectada por el procedimiento experimental. En estas condiciones fisiológicas de hiper e hipoprolactinemia distintas drogas fueron ensayadas.

Los bloqueantes H1, difenhidramina y mepiramina, bloquean parcialmente la descarga prolactínica. En un trabajo previo (79), se observó que la difenhidramina, a la misma dosis y vía aquí utilizada, bloquea totalmente la descarga hormonal por "stress". Esta diferencia en la acción bloqueante, incompleta o completa en la succión o el "stress" respectivamente, se explica porque el primero es un estímulo más poderoso que el segundo para liberar la hormona como fuera sugerido por Terkel y col. (93).

El bloqueante H2 metiamida, fue efectivo para descargar prolactina en madres no succionadas sólo cuando se lo inyecta en el tercer ventrículo, pero no por vía general debido a que esta droga difícilmente atraviesa la barrera hematoencefálica. Estos resultados

indicarían que el lugar de acción de la misma se halla en el sistema nervioso central. Mas aún, cimetidina, otro bloqueante de los receptores H2 empleado por vía general, libera significativamente prolactina en ratas ovariectomizadas pretratadas con estradiol.

Por lo tanto, los antagonistas a los receptores H1 y H2 mostraron en este modelo, efectos opuestos sobre la descarga hormonal. Los primeros bloquean en MS y los segundos la liberan en las MNS. El uso de los agonistas confirman estos hallazgos. Histamina intraventricular libera prolactina en madres no succionadas como lo demostráramos previamente en ratas ovariectomizadas pretratadas con estradiol (79), probablemente por un estímulo predominante sobre los receptores H1.

En cambio, 4 metilhistamina bloquea la liberación, al actuar predominantemente sobre los receptores H2.

Consecuentemente, parecería probable que los receptores H2 están relacionados con los circuitos neurales que inhiben a la hormona, pues su agonista 4 metilhistamina suprime su liberación en MS mientras que el antagonista metiamida la eleva en las MNS. Los receptores H1 se relacionarian con los circuitos hipotalámicos facilitadores de la liberación prolactínica pues los antihistamínicos clásicos inhiben la descarga hormonal en madres lactantes y en ovariectomizadas sometidas a "stress" e histamina misma pueden liberar la hormona cuando se la inyecta en el ventrículo.

Estas acciones opuestas de los receptores histaminérgicos han sido

descriptas también operativas en sinapsis ganglionares (44), pero la presente es la primera evidencia que la misma es activa en un evento neuroendócrino como el aquí estudiado. Posteriormente a estos hallazgos, fue comunicado que también existiría un mecanismo dual histamínico para otras hormonas, como la ACTH (21).

A pesar de estos efectos opuestos de los receptores H1 y H2 sobre la secreción prolactínica existiría una buena correlación funcional entre ellos,pues los antagonistas H1 y los agonistas H2 suprimen la liberación de prolactina en MS mientras que los agonistas H1 y antagonistas H2 la liberan en MNS. El hecho que farmacológicamente no se puedan modificar valores prolactinémicos más altos que los hallados en las MS ni más bajos que los basales de las MNS puede ser interpretado como que estos son valores límites, en los que los receptores H2 se hallan operando al máximo en MNS y los H1 en MS. Por supuesto que la relación de estos receptores con los factores hipotalámicos inhibidores y facilitadores de la secreción prolactínica y otros neurotrasmisores deberá ser motivo de nuevas investigaciones.

Finalmente, estos resultados indican que el área neural que interviene en el control se halla próxima al tercer ventrículo cerebral, bañada por el líquido cefaloraquídeo; muy posiblemente el hipotálamo. En efecto, difenhidramina, 4 metilhistamina e histamina fueron efectivos microinyectados en el ventrículo y metiamida sólo fue eficaz mediante esa vía de administración.

En un trabajo previo se observó que la microinjección de histamina intrapituitaricamente, o su administración por vía general, era inefectiva (79). Tampoco lo fue por acción directa sobre la glándula, en experiencias in vitro (102). Ambos grupos de evidencias confirman que el lugar de acción de la histamina es a nivel del sistema nervioso central, lo que coincide con el alto contenido de la amina hallada en el hipotálamo (31, 37, 38).

El efecto prolactino liberador ejercido por la histamina fue ampliamente confirmado en distintos laboratorios y en diferentes circunstancias experimentales. Así fue observado en ratas machos y hembras en distintos estadios endócrinos (79, 102, 103, 104, 105, 106). Más aún, también en el humano la histamina libera la hormona (107).

El mecanismo involucrado sería, en parte, por inhibición de la dopamina, probable factor inhibidor de esta hormona. En efecto, la microinjección de histamina en el ventrículo de la rata ocasiona disminución de la concentración de dopamina en la sangre portal e hiperprolactinemia (108). En esta acción central de la histamina no estarían involucradas otras sinapsis del tipo adrenérgico, colinérgico ni serotoninérgicas (103).

Además de actuar sobre la prolactina, la histamina podría modificar otras hormonas, como la luteinizante y la hormona hipotalámica liberadora de tirotrofina, pero sólo en determinadas circunstancias (109, 110). Otras hormonas no serían afectadas por la histamina; aparentemente sería una acción bastante selectiva para la prolac-

tina, ya que es ésta la hormona que más fácilmente es modificada.
La participación de la histamina hipotalámica en el control neural de la hipófisis anterior recibe confirmación adicional por la observación de que el contenido y metabolización de la misma varía con el estado endócrino. Así se modifica por la ovariectomía, tiroidectomía y distintos tipos de stress (111, 112).
La acción bloqueante de la liberación prolactínica de los antagonistas H1, difenhidramina y mepiramina en ratas lactantes, se encuentran en buena coincidencia con las observaciones efectuadas en hembras ovariectomizadas sometidas a stress por inmovilización o éter (79, 113).
La acción hiperprolactinémica de la metiamida es un hallazgo de suma importancia, pues esta acción de los bloqueantes H2 fue ampliamente confirmada en humanos. En efecto el uso de cimetidina en clínica ocasionó colateralmente, en ciertos casos, ginecomastia, galactorrea e hiperprolactinemia (114, 115, 116, 117, 118).
El efecto liberador hormonal de los bloqueantes H2 por vía intraventricular en madres, fue confirmado empleando otra droga, cimetidina, en otro modelo, la rata hembra estrogenizada y por otra vía de administración, la general, intraperitoneal. Esta acción liberadora no es bloqueada por la atropina ni por los antihistamínicos clásicos mepiramina y difenhidramina. Esto podría ser interpretado como una evidencia farmacológica de que ni sinapsis muscarínicas, ni histaminérgicas H1 se encuentran en el circuito existente desde el sitio de acción de la cimetidina y el lactotropo.

Por otro lado, la dopamina y la pilocarpina bloquean el efecto de la cimetidina, probablemente por distintos mecanismos de acción. Como se mencionó, la dopamina actúa directamente sobre el lactotropo y se la ha mencionado como el factor inhibidor de la secreción prolactínica. Las drogas colinérgicas reducen la prolactinemia actuando a nivel cerebral, probablemente activando una compleja red neuronal (32, 33, 34, 35, 120, 121). Más aún, un efecto inhibitorio fue descripto *in vitro* en cultivos de células hipofisarias tumorales (122), dejando abierta la posibilidad que, como la dopamina, ejerza una acción directa sobre el lactotropo, además de su efecto a nivel cerebral. La falta de modificación del efecto hipoprolactinémico del agonista muscarínico por acción de la mepiramina y la difenhidramina, indicaría que sinapsis histaminérgicas H1 no se emplearían en dicho circuito colinérgico inhibitorio. El hecho que la pilocarpina actúa mediante receptores colinérgicos se confirma por la contraprueba de que su acción es prevenida por la atropina. Además la falta de acción de la atropina, aisladamente, confirman previos resultados que indican que sinapsis muscarínicas no intervienen en la liberación basal de prolactina (32, 103).

Con relación al nivel de acción de las antagonistas H2, se ha postulado que es a nivel cerebral y nuestros presentes resultados, usando cimetidina *in vitro*, lo confirma.

Debe tenerse en consideración, que la cimetidina no atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica, por lo tanto su acción sería por fuera de la misma, por ejemplo, los órganos circunventricula-

res, como sería el hipotálamo (28).

En cuanto al mecanismo de acción de la cimetidina, obviamente el primero a considerarse es el de bloquear los receptores histaminérgicos H2. Sin embargo, otros mecanismos de acción secundarios podrían estar involucrados en vista de otros efectos endócrinos descriptos para la droga; por ejemplo,el de ocupar los receptores para andrógenos (123, 124). Recientemente, fue demostrado que la droga también es capaz de inhibir parcialmente el efecto liberador de prolactina que tiene la histamina en ratas machos anestesiadas con eter (105, 125). Por lo tanto es posible que la cimetidina libere la hormona en condiciones basales, pero también es capaz de bloquear parcialmente el efecto liberador del agonista, es decir la histamina. Esta interesante situación, sin embargo, no sería exclusiva de este grupo de drogas. En efecto, los antagonistas serotoninérgicos metisergida y ciproheptadina liberan prolactina cuando se lo usan solos en circunstancias basales, pero bloquean el claro efecto liberador de prolactina que tiene la serotonina, cuando se los inyecta conjuntamente (21, 113). Esto confirma que en los resultados de los estudios neuroendócrino farmacológicos debe considerarse cuidadosamente el modelo experimental considerado (28, 126).

b) - Los presentes resultados indican que la microinyección de GABA en el III ventrículo bloquea parcialmente la subida prolactínica que ocurre por la acción de la succión.El ácido aminooxiacético (AAOA),

que aumenta el GABA endógeno, evidencia una acción supresora más completa y duradera. El mecanismo de acción de ambos fármacos sería similar, ya que se ha encontrado una gran similitud en los resultados obtenidos empleando GABA o ácido aminooxiacético (127, 128, 129, 130).

En los presentes estudios ambas drogas no alteran los valores prolactinémicos en MNS. Estos efectos inhibitorios de GABA intraventricular y AAOA intraperitoneal coinciden con nuestros previos resultados en ratas ovariectomizadas pretratadas con estradiol (72) y confirmados posteriormente en otros laboratorios y en distintos modelos experimentales in vivo e in vitro (102, 131, 132, 133, 134 135).

Los presentes resultados extienden la acción inhibitoria de las drogas GABAérgicas a ratas machos normales sometidas a stress experimental. El efecto inhibitorio ha sido hallado in vitro por acción directa sobre la hipófisis (131, 132, 134). Es de destacar que este efecto in vitro se ejerce sobre una glándula denervada, cuya síntesis y liberación prolactínica se halla incrementada significativamente (69). Además, esta acción inhibitoria del GABA in vitro, requiere una concentración muy superior a la de la dopamina en similares circunstancias.

Drogas GABAérgicas como el ácido ibotónico, también son inhibitorios de la liberación prolactínica (136) y el GABA puede bloquear la descarga hormonal provocada por drogas prolactino liberadoras (102).

Si bien la enorme mayoría de las evidencias experimentales antedichas indican una acción inhibitoria del GABA, existe, en contraste, resultados en los que se indican una acción facilitadora. Así la infusión de GABA en el tercer ventrículo lateral de ratas intactas y ovariectomizadas, estimula la descarga hormonal (137); también ocurre en machos (102, 138). Por lo tanto, distintos laboratorios han hallado efectos inhibitorios y facilitatorios de la descarga prolactínica por acción del GABA. Si bien hay coincidencias en cuanto a que ambos efectos son posibles, aún no hay coincidencias en cuanto al posible mecanismo de acción dual. Se ha atribuido a la dosis empleada (133) y al sitio de acción, neural o hipofisario, de la droga (135). Por los presentes y previos resultados, tomando en cuenta los datos de la bibliografía, postulamos que el modelo experimental juega un papel fundamental.

Los efectos inhibitorios se obtienen más fácilmente en situaciones de hiperprolactinemia o cuando la secreción de la misma se halla estimulada como en las circunstancias fisiológicas y experimentales aquí estudiadas. La facilitación de la liberación de prolactina se observa más fácilmente cuando existen bajos valores iniciales de la hormona y ésta no se halla estimulada.

Posiblemente, GABA y péptidos conteniendo GABA, jueguen un papel fundamental en este control prolactínico, así como otros péptidos neurales lo ejercen sobre otras secreciones endócrinas.

Si bien otras hormonas como la gonatrofina, tirotrofina y luteini

zante pueden modificar su secreción en respuesta al amino ácido, es la prolactina la que mayores cambios muestra por la acción del GABA (139, 140).

Una evidencia importante en favor del papel del GABA en el control adenohipofisario, es que, recientemente se hallaron receptores en la glándula para el amino ácido (48) y que los mismos están regulados por el sistema nervioso central (141).

c) - La destrucción experimental del hipotálamo medio basal provoca profundos cambios en la función hipofisaria al suprimir la "vía final común" que desde el hipotálamo llega a la glándula. Impide la llegada de hormonas hipotalámicas hipofisotropas a las células anterohipofisarias; y consecuentemente, cae la liberación de todas las trofinas de la misma, excepto la prolactina cuya secreción aumenta al suprimirse el tono inhibidor neural. Además, la eminencia media, área sumamente rica en hormonas hipotalámicas y neurotrasmisoras, puede ejercer influencia sobre otras áreas nerviosas.

El efecto sobre receptores hormonales hipotalámicos y anterohipofisarios aquí descripto, es de suma importancia y originalidad. En efecto, en el hipotálamo e hipófisis existen receptores celulares hormonales (100, 101). Buen ejemplo de estas proteínas receptoras intracelulares son las presentes para el estradiol, hormona esteroidea ovárica capaz de regular la función hipotálamo hipofisaria (142). La unión del estradiol, hormona tomada como mode

lo de estos estudios, al receptor, es un paso fundamental para desencadenar sus efectos neuroendócrinos (143, 144).

Por ello, la regulación de esta unión constituiría un evento de suma importancia. La captación *in vivo* o unión *in vitro* de esta hormona por distintas áreas hipotalámicas o la hipófisis sería modificada por otras hormonas esteroideas (85, 144, 145). Sin embargo, se desconocía la participación de otros factores, además de las hormonas esteroideas, en la regulación de esta unión. Con el objeto de ampliar estos conocimientos, estudiamos la posible participación hipotalámica en la regulación de los receptores esteroideos. Para ello investigamos la captación y unión de estradiol en distintas áreas neurales e hipófisis anterior en ratas con destrucción electrolítica de la eminencia media y en animales controles sometidos a operación ficticia.

Nuestras observaciones sugieren que los receptores citosólicos para estrógenos en la hipófisis anterior se hallan bajo el control del sistema nervioso central, pues la destrucción estereotáxica de la relación normal encéfalo-hipofisaria provoca un decremento de la unión *in vitro* de esa hormona. Mas aún, una hora después de realizada la lesión experimental, la unión se halla significativamente reducida y continúa disminuyendo hasta alcanzar una meseta a los 7 días. Esto indicaría un efecto precoz y prolongado provocado por la destrucción de la eminencia media. El análisis de Scatchard indica una disminución de aproximadamente un 50% en el número de los máximo de sitios de unión en los animales lesionados, pero con una

constante de asociación de similar magnitud para ambos grupos. Sin embargo, la falta de paralelismo en las pendientes sugiere un concomitante y pequeño cambio en la afinidad de unión producida por la lesión, que se sumaría a la disminución del número de sitios activos. Estos son fenómenos específicos y no se deben a un efecto deletéreo y general provocado por la lesión ya que la síntesis proteica fue similar en ambos grupos.

La captación de estradiol *in vivo* por la hipófisis anterior confirma los resultados obtenidos en experiencias *in vitro*; o sea que la destrucción hipotalámica disminuye la retención de estradiol. En el hipotálamo, no hubo diferencia en la unión,en los estudios realizados *in vitro*; pero *in vivo*, la captación hipotalámica es menor en los lesionados. Esta discrepancia puede explicarse de diversas maneras. Primeramente la lesión puede provocar cambios *in vivo* variando, por ejemplo, el aporte circulatorio hipotalámico que obviamente no se reproducen *in vitro*. Mientras que la captación de estradiol en hipófisis es un proceso saturable, como lo exponemos en "Material y Métodos" y en buena coincidencia con trabajos previos (85), la captación hipotalámica no es completamente saturable (60% en nuestras condiciones de trabajo y de un 48-57% en la de McEwen y Pfaff) (85) y por lo tanto, la contribución de la captación inespecífica es importante en el hipotálamo y debe considerarse al comparar los resultados. Cambios en pequeñas áreas hipotalámicas podrían no observarse cuando se considera al hipotálamo globalmente. El mecanismo por el cual el hipotálamo controla a los receptores

esteroideos hipofisarios está aún en el terreno de las hipótesis ya que las presentes son las primeras evidencias de dicha regulación. La destrucción experimental de la eminencia media elimina el sitio de síntesis y/o de tránsito de las hormonas hipotalámicas y también de neurotrasmisores; consecuentemente desaparece el efecto trófico de este área neural sobre las células adenohipofisarias. Precisamente, estas células glandulares son capaces de retener estradiol, fundamentalmente aquellas acidófilas secretoras de prolactina (146). Otra posible interpretación de nuestros resultados es que los cambios endócrinos en el animal lesionado son los responsables de la reducción de la unión del estradiol. Ya a la hora de producida la lesión todos los animales lesionados presentaban hiperprolactinemia, y la misma persistía a los 21 días, lo que coincide plenamente con el informe de otros laboratorios (147). La LH se halla baja, luego de 1 día de lesión, pero no a la hora de producida la misma (147, 148). Por lo tanto, parece no haber paralelismo entre la unión de estradiol y los niveles séricos de LH; en cambio la disminución de la unión parece relacionarse más cercanamente con la constante hiperprolactinemia observada. La prolactina ejerce efectos de retroalimentación a nivel neural y glandular (49). Precisamente, el hipotálamo y la hipófisis, poseen receptores para prolactina (149, 150). Un posible mecanismo de acción hormonal a nivel neural y glandular podría ser la regulación de los receptores de estradiol, como parecen indicarlo los presentes resultados. Este sería un mecanismo de autocontrol

hipotálamo hipofisario, al limitar la prolactina su propia síntesis y liberación por bloqueo del efecto facilitador del estradiol sobre dichas funciones.

Nuevas evidencias experimentales parecen apoyar la hipótesis de que es la dopamina la principal responsable, como se deduce en nuestros experimentos con bromocriptina. La misma fue seleccionada como agonista dopaminérgico, capaz de actuar sobre receptores en el lactotropo, e inhibir la descarga hormonal (151, 152).

La bromocriptina restaura la unión de estradiol a la hipófisis, al elevar la unión en animales lesionados, en 2.6 veces, llevándolos al mismo nivel que los controles. Paralelamente, reduce significativamente la prolactinemia.

En animales controles, sin lesión, el tratamiento con bromocriptina no modifica la unión del esteroide ni la prolactinemia.

Por lo tanto, es posible que la bromocriptina no pueda elevar aún más el número de receptores que normalmente posee la glándula. Para que se evidencie el efecto de la bromocriptina es necesario que el número de receptores se halle disminuido, como ocurre en animales lesionados, y en los que la droga actuaría como terapia de reemplazo.

El experimento utilizando ratas hiperprolactinémicas por injerto hipofisario, fue importante para descartar como principal responsable a una retroalimentación de la hormona sobre los receptores hipofisarios. En efecto los altos niveles de prolactina en los animales injertados pero con el hipotálamo íntegro, no va acompa-

ñado por cambios de la unión de ^{3}H-estradiol en la glándula. Como una observación marginal, es interesante que la unión de ^{3}H-estradiol en la hipófisis trasplantada es muy baja, significativamente menor que la de la hipófisis *in situ*. Además, y a diferencia de lo que ocurre en los animales con lesión medio basal, el tratamiento con bromocriptina no restituye la unión del esteroide a la glándula trasplantada. La droga pudo llegar al lactotropo, ya que descendió la prolactinemia, pero no modificó la unión del esteroide. Estos hallazgos podrían explicarse por la coexistencia de otras diferencias entre ambos modelos. La rata lesionada tiene prolactinemias más altas, una mayor síntesis de prolactina y bajos niveles de las otras hormonas hipofisarias. Las ratas con injerto tienen una hiperprolactinemia menor que la anterior, la síntesis de prolactina está disminuida y se conservan las hormonas secretadas por la hipófisis *in situ* (69, 94, 95, 96).

Por estos estudios se postula, que, cuando se previene la llegada de dopamina al lactotropo por lesión del hipotálamo medio basal se reducen los receptores para estradiol hipofisarios en paralelismo con la hiperprolactinemia. La terapia sustitutiva con bromocriptina normaliza ambas modificaciones. Además, hemos observado que las glándulas de animales lesionados tienen una mayor capacidad para unir ^{3}H-dihidroergocriptina que los normales, a la vez que presentan una hipersensibilidad a la acción hipoprolactinémica de la dopamina (152). Estos serían factores adicionales que deben ser

tenidos en cuenta al formular la hipótesis sobre las mencionadas observaciones.

El hecho que un neurotrasmisor, la dopamina, puede regular la unión de un esteroide a su receptor hipofisario es reciente y abre nuevas posibilidades en los estudios sobre mecanismos de regulación neuroendócrinos.

10 Resumen

La primera parte de la obra se dedica a los antecedentes y actualización del tema que nos ocupa: el control neuroendócrino de la secreción prolactínica. Luego de efectuar una reseña anátomo-funcional del hipotálamo, nos ocupamos de sus hormonas y neurotrasmisores. Luego, consideramos distintos aspectos fisiológicos y bioquímicos de la prolactina y la importancia de su estudio.

La segunda parte se halla referida, específicamente, a nuestra tarea experimental. Contiene los objetivos perseguidos, la metodología empleada y los resultados obtenidos. Finalmente, se efectúa la discusión de los resultados y las conclusiones a las que se llega.

Suscintamente, estas son:

- Sinapsis histaminérgicas y sus receptores H1 y H2, juegan un papel de importancia en el control neural de la secreción prolactínica.
- Otro neurotrasmisor, el ácido gamma aminobutírico presente en la unidad hipotálamo hipofisaria, también participa en dicha regulación.
- Se postula que el encéfalo es capaz de regular a los receptores anterohipofisarios, iniciándose así, un nuevo capítulo en el estudio de los mecanismos de regulación neuroendócrina.

11. BIBLIOGRAFIA

1:- Clark, W.E. Le Gross: The hypothalamus, morphological, functional, clinical and surgical aspects. Oliver & Boyd, Londres, 1938.

2:- De Groot, J.: The rat forebrain in stereotaxic coordinates. North Holland, Amsterdam, 1959.

3:- Bjorklund, A.; Flak, A.B.; Nobin, A.; Stenevi, V.: Organization of the dopamine and noradrenaline innervation of the median eminence-pituitary region in the rat. En Neurosecretion. The final neuroendocrine pathway. Knowles, F. Wollrath L. (Editores) Springer. N.York, pág. 209, 1973.

4:- Raisman, G.: Neural conexions of the hypothalamus. Brit. Med. Bull., 22: 197, 1966.

5:- Knige, K.M.; Scott, E.E.; Weindle, A. (Editores): Median eminence, structure and function. Karger, Basel, 1972.

6:- Green, J.D.: The histology of the hypophysial stalk and median eminence in man with special reference to blood vessels, nerve fibers and a peculiar neurovascular zone in this region. Anat. Record, 100: 273, 1948.

7:- Daniel, P.M.: The blood supply of the hypothalamus and pituitary gland. Brit. Med. Bull., 22: 202, 1966.

8:- Houssay, B.A.; Biasotti, A.; Sammartino, R.: Modifications fonct ionnellas de l'hypophyse aprés les lésions infundibulo-tubériemes chez le crapaud. Compte. Rend. Soc. Biol., 120: 725, 1935.

9:- Szentagothi, B.; Flerkó, B.; Mess, B.; Halasz, B.: Hypothalamic control of the anterior pituirary. Akademic Kiadó, Budapest, 1968.

10:- Bergland, R.M.; Page, R.B.: Pituitary-brain vascular relations: a new paradigm. Science, 204: 18, 1979.

11:- Greep, R.O.: En: Sex and Internal Secretion (Ed.Young, W.C.). 1, Williams & Wilkins, Baltimore, pág. 240, 1961.

12:- Libertun, C.: Regulación neuroendócrina de la reproducción. En: Fisiología Humana (Ed.Houssay, B.A.) 5a. Edición. El Ateneo, Buenos Aires, pág. 600, 1980.

13:- Harris, G.W.:Sex hormone, brain development and brain function. Endocrinology. 75: 627, 1964.

14:- Labrie, F.; Borgeat, P.; Drouin, J.; Beaulieu, M.; Lagacé, L.; Ferland, L.; Raymond, V.: Mecanism of action of hypothalamic hormones in the adenohypophysis. Ann. Rev. Physiol., 41: 555, 1979.

15:- Reichlin, S.; Saperstein, R.; Jackson, I.M.D.; Boyd, A.E.; Pate, Y.: Hypothalamic hormones. Ann. Rev. Physiol., 38: 389, 1976.

16:- Guillemin, R.: The expanding significance of hypothalamic peptides, or, is endocrinology a branch of neuroendocrinology? Rec. Prog. Hormone Res., 33: 1, 1977.

17:- Schally, A.V.; Arimura, A.; Kastin, A.J.: Hypothalamic regulatory hormones. Science, 179: 341, 1973.

18:- Vale, W.; Rivier, C.; Brown, M.: Regulatory peptides of the hypothalamus. Ann. Rev. Physiol., 39: 473, 1977.

19:- Libertun, C.: Radioinmunoanálisis de glicoproteínas, proteínas y péptidos. En: Radioinmunoanálisis. Ed. López Ed., Buenos Aires, pág. 109, 1980.

20:- Joseph, S.A.; Scott, D.E.; Vaala, S.S.; Knigge, K.M.; Krobisch Dudley, G.: Localization and content of thirotrophine releasing factor (TRF) in median eminence of the hypothalamus. Acta Endocrinol., 74: 215, 1973.

21:- Weiner, R.I.; Ganong, W.F.: Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. Physiol. Rev., 58: 905, 1978.

22:- Elde, R.;Mokfelt T.: Localization of hypophysiotropic peptides and other biologically active peptides within the brain. Ann. Rev. Physiol., 41: 587, 1979.

23:- Moss, R.L.: Actions of the hypothalamic-hypophysiotropic hormones on the brain. Ann. Rev. Physiol., 41: 617, 1979.

24:- Wurtman, R.J.: En: The Neurosciences, 2nd. Study Prog. Rockefeller University Press, N.York, pág. 530, 1971.

25:- Krulich, L.: Central neurotransmitters and the secretion of prolactin, GH, LH and TSH. Ann. Rev. Physiol., 41: 603, 1979.

26:- McCann, S.M.; Ojeda, S.R.; Libertun, C.; Harms, P.G.; Krulich, L.: Drug induced alterations in gonadotropin and prolactin release in the rat. En: Narcotic and the Hypothalamus. Zimmerman, E., R. George Eds. Raven Press, N.York, pág. 121, 1974.

27:- Tuomisoto, J.: Neuropharmacological intervention on the pituitary-hypothalamic relationship. Ann. Clinical Res., 10: 120, 1978.

28:- Libertun, C.; Arakelian, M.C.; Larrea, G.A.; Gorriño, L.R.; Becú, D.: Neurotrasmisores, neurohormonas y prolactina. Acta Physiol. Latinoam. 30: 275, 1980.

29:- Moore, R.Y.; Bloom, F.E.: Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of the dopamine systems. Ann. Rev. Neurosci., 1: 129, 1978.

30:- Moore, R.Y.; Bloom, F.E.: Central catecholamine neuron system: Anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. Ann. Rev. Neurosci., 2: 113, 1979.

31:- Palkovits, M.: Effects of surgical deafferentation on the transmitter and hormone content of the hypothalamus. Neuroendocrinology, 29: 140, 1979.

32:- Libertun, C.; McCann, S.M.: Blockade of the release of gonadotrophins and prolactin by subcutaneous or intraventricular injection of atropine in male and female rats. Endocrinology, 92: 1714, 1973.

33:- Libertun, C., McCann, S.M.: Further evidence for cholinergic control of gonadotrophin and prolactin secretion. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 147: 498, 1974.

34:- Libertun, C.; McCann, S.M.: Blockade of the postorchidectomy increase in gonadotrophins by implants of atropine into the hypothalamus. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 152: 143, 1976.

35:- Libertun, C.; Timiras, P.S.; Kragt, C.L.: Sexual differences in the hypothalamic cholinergic system before and after puberty: Inductory effect of testosterone. Neuroendocrinology, 12: 73, 1973.

36:- Brownstein, M.J.; Palkovits, M.; Tappaz, M.L.; Saavedra, J.M.; Kizer, J.S.: Effect of surgical isolation of the hypothalamus on its neurotransmitter content. Brain Res., 117: 287, 1976.

37:- Brownstein, M.J.; Saavedra, J.M.; Palkovits, M.; Axelrod, J.: Histamine content of hypothalamic nuclei of the rat. Brain Res., 77: 151, 1974.

38:- Pollard, H.; Bischoff, S.; Llorens Cortes, C.; Schwartz, J.C.: Histidine decarboxilase and histamine in discret nuclei of rat hypothalamus and the evidence for mast cells in the Median Eminence. Brain Res., 118: 509, 1976.

39:- Snyder, S.H.; Glowinsky, J.; Axelrod, J.: The physiologic disposition of the ^{3}H histamine in the rat brain. J.Pharmacol. Exp. Ther. 153: 8, 1966.

40:- Snyder, S.H.: Perspective in neuroendocrinology. En: Snyder, S.H. (Ed.), Oxford Univ. Press, New York, pág. 43, 1972.

41:- Ash, A.S.F.; Schild, H.O.: Receptors mediating some actions of histamine. Brit. J. Pharmacol., 27: 427, 1966.

42:- Black, J.W.; Duncan, W.A.M.; Durand, C.J.; Ganellin, C.R.; Parsons, E.M.: Definition and antagonism of histamine H_2-receptors. Nature, 236: 385, 1972.

43:- Baudry, M.; Martres, M.P.; Schwartz, J.C.: H_1 and H_2 receptors in the histamine induced accumulation of cyclic AMP in guinea pig brain slices. Nature, 253: 362, 1975.

44:- Brimble, M.J.; Wallis, D.I.: Histamine H_1 and H_2 receptors at a ganglionic synapse. Nature, 246: 156, 1973.

45:- Costa, E.; Dichiara, G.; Gessa, G.L. (Eds.): GABA and benzodiazepine receptors. Raven Press, New York, 1981.

46:- Roberts, E., Chase, T.N., Tower, D.B., (Eds.): GABA in nervous system function. Raven Press, New York, 1976.

47:- Enna, S.J.; Kuhar, J.; Snyder, S.: Regional distribution of postsynaptic receptor binding for gamma-aminobutiric acid(GABA) in monkey brain. Brain Res., 93: 168, 1975.

48:- Grandison, L.; Guidotti, A.: δ aminobutiric acid receptor function in rat anterior pituitary: Evidence for control of prolactin release. Endocrinology, 195: 754, 1979.

49:- Meites, J.; Lu, K.H.; Wuttke, W.; Welsch, C.H.; Nagasawa, H.; Quadri, S.K.: Recent studies on function and control of prolactin secretion in rats. Rec. Progr. Hormone Res., 28: 471, 1972.

50:- MacLeod, R.M.: Regulation of prolactin secretion. En: Frontiers in Neuroendocrinology. Martini, L., W.F.Ganong Eds., vol. 4, Raven Press N.York, pág. 169, 1976.

51:- Libertun, C.: Prolactina. En: Radioinmunoanálisis, C.Libertun, Ed.López Ed., Buenos Aires, pág. 179, 1980.

52:- Horrobin, D.M.: Prolactin. Effects and clinical significance. vol. 6, Eden Press, Montreal, 1978.

53:- Bohnet, H.C.; Mc Neilly, A.S.: Prolactin assessment of its role in the human female. Horm. Metab. Res., 11: 533, 1979.

54:- Scacchi, P.: Exploración de la secreción de prolactina. En: Radioinmunoanálisis, C. Libertun, Ed. López Ed., Buenos Aires, pág. 184, 1980.

55:- Del Pozo, E.; Lancranjan, I.: Clinical use of drugs modyfing the release of anterior pituitary hormones. En: Frontiers in Neuroendocrinology. Ganong, W.F., L.Martini, Eds. 5a. Ed.Raven Press, N.York, pág. 207, 1978.

56:- Farquhar, M.G.; Rinehart, J.F.: Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats. Endocrinology, 54: 516, 1954.

57:- Zambrano, D.; Deis, R.P.: The adenohypophysis of female rats after hypothalamic oestradiol implants: An electron microscopic study. J. Endocrinol. 47: 101, 1970.

58:- von Lawzewitsch, I.; Dickmann, G.H.; Amezua, L., et al: Cytological and ultrastructural characterization of the human pituitary. Acta Anat. (Basel), 81: 286, 1972.

59:- De Nicola, A.F.; von Lawzewitsch, I.; Kaplan, S.E.; Libertun, C.: Biochemical and ultrastructural studies on estrogen-induced pituitary tumors in F344 rats.

60:- Li, C.H.; Dixon, J.S.; Lo, T.B.; Pankov, Y.A.; Schmid, K.D.: Amino-acid sequence of ovine lactogenic hormone. Nature, 224: 695, 1969.

61:- Kwa, H.G.; Verhofstad, F.: Radioinmunoassay of rat prolactin. Biochem. Biophys. Acta, 133: 186, 1967.

62:- Ellis, S.; Grindeland, R.E.; Nuenke, J.M.; Callahan, P.X.: Purification and properties of rat prolactin. Endocrinology, 85: 886, 1969.

63:- Friesen, H.; Guyda, H.; Hwang, P.:En: Methods in investigative and diagnostic endocrinology. (Eds. S.A.Berson y R.S. Yalow), North Holland, Amsterdam, pág. 599, 1973.

64:- Lewis, U.J.; Singh, R.N.P.; Seavey, B.K.: En: Prolactin and Carcinogenesis (Eds. A.R.Bayns y K. Griffiths) Alpha Omega Alpha, Cardiff, pág. 4, 1972.

65:- Niall, H.D.: En: Prolactin and Carcinogenesis (Eds. A.R. Bayns y K. Griffiths) Alpha Omega Alpha, Cardiff, pág. 13, 1972.

66:- Nicoll, C.S.: En: Methods in investigative and diagnostic endocrinology,(Eds.S.A. Berson y R.S. Yalow), North Holland, Amsterdam, pág. 570, 1973.

67:- Jacobs, L.S.: En: Methods of hormone radioimmunoassay (Eds. B.M. Jaffe y H.R. Behrman), Academic Press, New York, pág. 87, 1974.

68:- Charreau, E.H.; Attramadal, A.; Torjesen, P.A.; Calandra, R.; Purvis, K.; Hansson, V.: Prolactin binding in the rat testis: specific receptors in interstitial cells. Molecular and Cellular Endocrinol. 7: 1, 1977.

69:- Libertun, C.; Kaplan, S.E.; De Nicola, A.F.: Progesterone negative feed back on prolactin secretion: Importance of the brain control and of estradiol. Neuroendocrinology, 28: 64, 1979.

70:- Hayashida, T.: En: Methods in investigative and diagnostic endocrinology (Eds. S.A. Berson y R.S. Yalow), North Holland, Amsterdam, pág. 577, 1973.

71:- Clausen, J.: Immunochemical techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules, North Holland, Publ. Co., Amsterdam, 1972.

72:- Pasteels, J.L.; Gausset, P.; Danguy A.; Ectors, F.: En: Prolactin and carcinogenesis (Eds. A.R.Bayns y K. Griffiths), Alpha Omega Alpha, Cardiff, pág. 128, 1972.

73:- Bryant, G.D.; Greenwood, F.C.: En: Methods in investigative and diagnostic endocrinology, (Eds. S.A. Berson y R.S. Yalow), North Holland, Amsterdam, pág. 591, 1973.

74:- Niswender, G.D.; Chen, C.L.; Midgley, A.R.; Meites, J.; Ellis, S.: Radioinmunoassay of rat prolactin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 130: 793, 1969.

75:- Gay, V.L.; Midgley, A.R. Jr.; Niswender, G.D.: Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation. Fed. Proc. 29: 1880, 1970.

76:- Mc Cann, S.M.; Cooper, K.; Harms, P.G.; Libertun, C.; Negro-Vilar, A.; Ojeda, S.R.; Orias, R.; Moss, R.L.; Fawcett, C.P.; Krulich, L.: Control of gonadotrophin and prolactin secretion by hypothalamic releasing and inhibiting hormone. Rec. Studies of Hypothalamic Function. (Inter Symp. Calgary), Karger Basel, pág. 80, 1974.

77:- Harms, P.G.; Ojeda, S.R.: A rapid and sample procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. J. Applied Physiol., 36: 391, 1974.

78:- Libertun, C.; Cooper, K.J.; Fawcett, C.P.; Mc Cann, S.M.: Effects of ovariectomy and steroid treatment on hypophyseal sensitivity to purified LH- releasing factor (LRF). Endocrinology, 94: 518, 1974.

79:- Libertun, C.; Mc Cann, S.M.: The possible role of histamine in the control of prolactin and gonadotrophin release. Neuroendocrinology, 20: 110, 1976.

80:- Arakelian, M.C.; Libertun, C.: H_1 and H_2 histamine receptor participation in the brain control of prolactin secretion in lactating rats. Endocrinology, 100: 890, 1977.

81:- Ojeda, S.R.; Krulich, L.; Mc Cann, S.M.: Effect of introventricular injection of ciclic AMP on plasma prolactin and LH levels of ovariectomized estrogen-treated rats. Neuroendocrinology, 16: 342, 1974.

82:- Meites, J.; Clemens, J.A.: Hypothalamic control of prolactin secretion.Vitam Hormones, 30: 166, 1972.

83:- Everett, J.W.: Luteotrophic function of autografts of the rat hypophysis. Endocrinology, 54: 685, 1954.

84:- Libertun, C.: Hipotálamo y función sexual. Tesis doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, 1969.

85:- McEwen, B.S.; Pfaff, D.W.: Factors influencing sex hormone uptake by rat brain regions. I.Effects of neonatal treatment, hypophysectomy and competing steroid on estradiol uptake. Brain Res., 21: 1, 1970.

86:- Coles, N.W.; Johnston, R.M.; Quastel, J.H.: The effects of alkylating agent or the incorporation of glycine -1-^{14}C into tissue proteins in vitro. Cancer Res., 20: 1523, 1960.

87:- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.

88:- Ginsburg, M.; Greenstein, B.D.; MacLusky, N.J.; Morris, I.D.; Thomas, P.J.: An improved method for the study of high affinity steroid binding-oestradiol binding in brain and pituitary. Steroids, 23: 773, 1974.

89:- Fridman, O.; Foglia, V.G.; De Nicola, A.F.: Reduction in ^{3}H - corticosterone binding to cytoplasmic receptors in the brain of diabetic rats. J.Steroid Biochem., 9: 609, 1978.

90:- Niswender, G.D.; Midgley A.R.; Monroe, S.E.; Reichert, L.E.: Radioinmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH- ^{131}I. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 128: 807, 1968.

91:- Kalra, P.S.; Fawcett, C.P.; Krulich, L.; Mc Cann, S.M.: The effects of gonadal steroids on plasma gonadotrophins and prolactin in the rat. Endocrinology, 92: 1256, 1973.

92:- Berde, B. (Editor): Handbuck der experimentellen Pharmakologic experimentellen Pharmacologic - Handbook of Experimental Pharmakologic. voll XXIII. Neurohypophysial hormones and similar polypeptides. Ed. B.Berde, Springer, Verlag-Berlin, Heidelberg, New York, 1968.

93:- Terkel, J.; Blake, C.A.; Sawyer, C.H.: Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. Endocrinology, 91: 49, 1972.

94:- Chen, C.L.; Amenomori, Y.; Lu, K.H.; Voogt, J.L.; Meites, J.: Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions. Neuroendocrinology, 6: 220, 1970.

95:- Zanini, A.; Giannattasio, G.; de Camilli, P.; Panerai, A.E.; Müller, E.E.; Meldolesi, J.: Studies on rat pituitary homografts. I. In vitro biosynthesis and release of growth hormone and prolactin. Endocrinology, 104: 226, 1979.

96:- Mc Cann, S.M.; Dhariwal, A.P.S.: Hypothalamic releasing factors and the neurovascular link between the brain and the anterior pituitary. En Martini, L. y Ganong W.F. (eds.), Neuroendocrinology. Academic Press, New York, pág. 261, 1966.

97:- Brimblecombe, R.W.; Duncan, W.A.M.; Durant, G.J.; Emmett, J.C.; Ganellin, C.R.; Parsons, M.E.: Cimetidine - a non thiourea H_2-receptor antagonist. J. Int. Med. Res. 3: 86, 1975.

98:- Turnbull, M.J.; Slater, P.: Further studies on homocarnosine induced hypothermia. Life Science, 9: 83, 1970.

99:- Snedecor, G.W.; Cochran, W.G.: Statistical Methods. 6a. Edición. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1967.

100:- Eisenfeld, A.J.: ^{3}H-Estradiol: In vitro binding to macromelecules from the rat hypothalamus, anterior pituitary and uterus. Endocrinology, 86: 1313, 1970.

101:- Vreeburg, J.T.M.; Schretlen, P.J.M.; Baum, M.J.: Specific, high-affinity binding of 17β-estradiol in cytosols from several brain regions and pituitary of intact and castrated adult male rats. Endocrinology, 97: 969, 1975.

102:- Rivier, C.; Vale, W.: Effects of γ aminobutiric acid and histamine on prolactin secretion in the rat. Endocrinology, 101: 506, 1977.

103:- Donoso, A.O.: Induction of prolactin and luteinizing hormone release by histamine in male and female rats and the influence of brain transmitter antagonists. J. Endocrinol. 76: 193, 1978.

104:- Donoso, A.O.; Banzan, A.M.: Accute effects of histamine on plasma prolactin and luteinizing hormone levels in male rats. J. Neural Transmission, 39: 95, 1976.

105:- Reynolds, L.R.; Rubel, A.M. Nikitovitch Wiener, M.B.: Cimetidine inhibits the histamine induced prolactin release in male rats. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 163: 322, 1980.

106:- Fuxe, K.; Perez de la Mora, M.; Agnati, L.; Eneroth, P.; Gustafsson, J.A.; Strett, P.; Ogren, S.O.: Possible involvement of central aminergic, histaminergic, cholinergic and GABAergic mechanisms in the central control of gonadotrophin secretion. A pharmacological analysis. Acta Endocrinol. 85: (Supl. 212), 15, 1977.

107:- Pentiroli, A.E.; Pozza, G.: Histamine stimulates prolactin release in normal men. Acta Endocrinol. 88: 23, 1978.

108:- Gibbs, D.M.; Plotsky, P.M.; de Greef, W.J.; Neill, J.D.: Effect of histamine and acetylcholine on hypophyseal stalk plasma

dopamine and peripheral plasma prolactin levels. Life Sci. 24: 2063, 1979.

109:- Donoso, A.O.; Banzan, A.M.: Failure of histamine to induce the release of luteinizing hormone in castrated rats primed with sex steroids. J. Endocrinol. 78: 447, 1978.

110:- Joseph-Bravo, P.; Charli, J.L.; Palacios, J.M.; Kordon, C.: Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immuno reactive thyrotrophin releasing hormone from the rat medio basal hypothalamus. Endocrinology, 104: 801, 1979.

111:- Taylor, K.M.; Snyder, S.M.: Brain histamine: rapid apparent turnover altered by restraint and cold stress. Science, 172: 1037, 1971.

112:- Björklund, A.; Hakanson, R.; Nobin, A.; Sjölurg, N O.: Increase in rabbit hypothalamic histidine decarboxylase activity after oophorectomy and thyroidectomy. Experientia, 28: 1232, 1972.

113:- Goodman, G.; Lawson, D.M.; Gala, R.R.: The effect of neurotrans mitter receptor antagonist on the ether induced prolactin release in ovariectomized estrogen treated rats. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 153: 225, 1976.

114:- Carlson, H.E.; Ippoliti, A.W.: Cimetidine, and H_2 antihistamine, stimulates prolactin secretion in man. J.Clin. Endocrinol. Metab. 45: 367, 1977.

115:- Bateston, M.C.; Browning, M.C.K.; Macommachie, A.: Galactorrea with cimetidine. Lancet, 2: 247, 1977.

116:- Lo Cascio, V.; Angelini, G.; Galyanini, G.; Bovo, P.; Ferrari, M.;

Vaona, B.; Cominacini, L.; Cavallini, G.: Metergoline inhibition of cimetidine-induced hyperprolactinemia. Horm. Metab. Res., 12: 130, 1980.

117:- Pontiroli, A.E.; Pellicciotta, G.; Alberetto, M.; De Pasqua, A.; Girardi, A.M.; Pozza, G.: Cimetidine and L Dopa in the control of prolactin secretion in man. Horm. Metab. Res., 11: 257, 1979.

118:- Burland, W.L.; Geadle, R.I.; Lee, R.M.; Rowley-Jones, D.; Groom, G.V.: Prolactin response to cimetidine. Br. J. clin. Pharmacol. 7: 19, 1979.

119:- Barber, S.G.; Hoare, A.M.: Cimetidine effects on prolactin release and production. Horm. Metab. Res. 11: 220, 1979.

120:- Grandison, L., Meites, J.: Evidence for adrenergic mediation of cholinergic inhibition of prolactin release. Endocrinology, 99: 775, 1976.

121:- Grandison, L.; Gelato, M.; Meites, J.: Inhibition of prolactin secretion by cholinergic drugs. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 145: 1236, 1974.

122:- Bang, S.; Gautvik, K.M.: Noradrenaline and pilocarpine inhibit prolactin (PRL) production in cultured rat pituitary tumour cells. Acta physiol. scand. 98: (Suppl. 440), 154, 1976, (abstract).

123:- Gräf, K.J.; Kleist, D.: Different effects of two histamine H_2-receptors antagonists on prolactin secretion in man. Acta Endocrinol. 94: (Suppl. 234), 4, 1980.

124:- Funder, J.W.; Mercer, J.E.: Cimetidine, a histamine H_2 receptor antagonist, occupies androgen receptors. J.Clin. Endocrinol. Metab. 48: 189, 1979.

125:- Donoso, A.O.; Banzan, A.M.: H_1 and H_2 histamine receptor antagonists and induced release of prolactin in male rats. Neuroendocrinology, 30: 11, 1980.

126:- Libertun, C.; Arakelian, M.C.; Larrea, G.A.; Foglia, V.G.: Inhibition of prolactin secretion by GABA in female and male rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161: 28, 1979.

127:- Libertun, C.; Mc Cann, S.M.: The effect of aminooxyacetic acid and other amino acids on plasma prolactin in the rat. Int. Res. Communication Sys., 4: 374, 1976.

128:- Grandison, L.: Anterior pituitary GABA receptors and their regulation of prolactin secretion. En GABA and benzodiazepine receptors Costa, E.; Di Chiara, G.; Gessa, G.L., Editores, Raven Press, N. York, pág. 219, 1981.

129:- Biswas, B.; Carlsson, A.: The effect of intracerebroventricularly administered GABA on brain monoamine metabolism. Arch. Pharmacol., 299: 41, 1977.

130:- Biswas, B.; Carlsson, A.: The effect of intraperitoneally administered GABA on brain monoamine metabolism. Arch. Pharmacol. 299: 47, 1977.

131:- Schally, A.V.; Redding, T.W.; Arimura, A.; Dupont, A.; Linthicum, G.L.: Isolation of gamma amino butyric acid from pig hypothalamic and demonstration of its prolactin release inhibitin (PIF) activity *in vivo* e *in vitro*. Endocrinology, 100: 681, 1977.

132:- Hall, T.; Mioduszewski, R.; Campbell, G.A.; Grandison, L.; Meites, J.: Effects of gamma-aminobutyric acid on prolactin release from rat pituitaries incubated in vitro. ICRS J. Med. Sci. 5: 122, 1977.

133:- Vijayan, E.; Mc Cann, S.M.: The effect of intraventricular injection of γ aminobutyric acid (GABA) on prolactin and gonadotrophin release in conscious female rats. Brain Res., 155: 35, 1978.

134:- Lamberts, S.W.J.; Mc Leod, R.M.: Studies on the mechanism of the GABA-mediated inhibition of prolactin secretion. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 158: 10, 1978.

135:- Locatelli, V.; Cocchi, D.; Frigerio, C.; Belti, R.; Larsen, P.K.; Racagni, G.; Muller, E.E.: Dual γ aminobutyric acid control of prolactin secretion in the rat. Endocrinology, 105: 778, 1979.

136:- Fuxe, M.; Perez de la Mora, M.; Agneti, L.; Eneroth, P.; Gustafesen, J.A.; Skett, P.; Ogren, S.D.: Possible involvement of control aminergic, histaminergic, colinergic and GABAergic mechanism in the central control of gonadotrophin secretion. A pharmacological analysees. Acta Endocrinol. 85: (Suppl. 212), 15, 1977 (abstract).

137:- Mioduszewski, R.; Grandison, L.; Meites, J.: Stimulation of prolactin release in rats by GABA. Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 151: 44, 1976.

138:- Pass, K.A.; Ondo, J.G.: The effects of γ aminobutyric acid on prolactin and gonadoprophin secretion in the unanesthetized rats. Endocrinology, 100: 1437, 1977.

139:- Cocchi, D.; Casanueva, F.; Locatelli, V.; Apud, J.; Martínez Campos, A.; Civati, C.; Racagni, G.; Muller, E.E.: GABAergic mechanism in the control of Prl and GH release. En "GABA and benzodiazepine receptors". Eds. E.Costa, G.Di Chiara, y G.L. Gessa, Raven Press, N. York, pág. 247, 1981.

140:- Ondo, J.G.: Gamma-aminobutyric acid effect on pituitary gonadotrophin secretion. Science, 186: 738, 1974.

141:- Fiszer de Plazas, Sara; de Novara, Alba M.; Libertun, Carlos: GABA receptors in the anterior pituitary increase after medial basal hypothalamus destruction. Intern. Res. Communication SyS, Medical Sci. 9: 571, 1981.

142:- Fink, G.: Feedback actions of target hormones on hypothalamus and pituitary with special reference to gonadal steroids. Ann. Rev. Physiol., 41: 571, 1979.

143:- Korach, K.S.; Muldoon, T.G.: Characterization of the interaction between 17 β-estradiol and its cytosplasmic receptor in the rat anterior pituitary gland. Biochemistry, 13: 1932, 1974.

144:- Lisk, R.D.; Reuter, L.A.: Progesterone treatment increases pituitary oestradiol retention in the ovariectomized normal rat but not in the male nor in the androgen, or estrogen, steril ized female. Acta Endocrinol., 84: 268, 1977.

145:- Cidlowskim J.A.; Muldoon, T.G.: The dynamics of intracellular estrogen receptor regulation as influenced by 17 β-estradiol. Biol. Reprod. 18: 234, 1978.

146:- Stumpf, W.E. : Cellular and subcellular ^{3}H estradiol localiza tion in the pituitary by autoradiography. Z.Zellforsch. 92: 23, 1968.

147:- Bishop, W.L.; Fawcett, C.P.; Krulich, L.; Mc Cann, S.M.: Acute and chronic effects of hypothalamic lesions on the release of FSH, LH and prolactin in intact and castrated rats. Endocrinology, 91: 643, 1972.

148:- Weisenberg, L.S.; De Nicola, A.F.; Arakelian, M.C.; Libertun, C.: Effect of median eminence lesion on ^{3}H estradiol binding in the anterior pituitary and hypothalamus. Endocrinology, 105: 1152, 1979.

149:- Frantz, W.L.; Payne, P.; Dombrosky, O.: Binding of ovine ^{125}I-prolactin to cultured anterior pituitary tumour cells and normal cells. Nature, 255: 636, 1975.

150:- Winters, S.J.; Loriaux, D.L.: Suppression of plasma luteinizing hormone by prolactin in the male rats. Endocrinology, 102: 864, 1978.

151:- Fuxe, K.; Fredholm, B.B.; Ogren, S.O.; Agnati, L.F.; Hökfelt, T.; Gustafsson, J.A.: Pharmacological and biochemical evidence for the dopamine agonistic effect of bromocriptine. Acta Endocrinol. 88: 27, 1978.

152:- Libertun, C.; Larrea, G.A.; Vacas, M.I.; Cardinali, D.P.: ^{3}H dihydroergocryptine binding in anterior pituitary and prolactin secretion: Further evidence of brain regulation of adenohypophyseal receptors. Endocrinology, 107: 1905, 1980.