

Tesis de Posgrado

Acción de la insulina y prolactina sobre la regulación endócrina de la función reproductiva

Ladenheim, Ruth Graciela

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Ladenheim, Ruth Graciela. (1985). Acción de la insulina y prolactina sobre la regulación endócrina de la función reproductiva. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1899_Ladenheim.pdf

Cita tipo Chicago:

Ladenheim, Ruth Graciela. "Acción de la insulina y prolactina sobre la regulación endócrina de la función reproductiva". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1899_Ladenheim.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis 1899

ej. 1

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ACCION DE LA INSULINA Y PROLACTINA
SOBRE LA REGULACION ENDOCRINA DE
LA FUNCION REPRODUCTIVA**

Autor: Ruth Graciela Ladenheim

Directora: Dra. Marta Tesone

**INSTITUTO DE BIOLOGIA
Y MEDICINA EXPERIMENTAL**

Tesis presentada para optar al título
de Doctor en Ciencias Químicas.

1985

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ACCION DE LA INSULINA Y PROLACTINA
SOBRE LA REGULACION ENDOCRINA DE
LA FUNCION REPRODUCTIVA**

Autor: Ruth Graciela Ladenheim

Directora: Dra. Marta Tesone

**INSTITUTO DE BIOLOGIA
Y MEDICINA EXPERIMENTAL**

Tesis presentada para optar al título
de Doctor en Ciencias Químicas.

- 1899 -

1985

A mis padres.

A Hilda y Débora.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Tesone, por haberme brindado sus valiosas enseñanzas, su incondicional dedicación y su incesante estímulo, y, sobre todo por haber sabido compartir tanto los pequeños como los grandes esfuerzos que permitieron la concreción de esta tesis.

Al Dr. Eduardo H. Charreau, por sus aportes críticos y su actitud docente ejemplar.

Al Dr. J. Lino Barañao y al Lic. Tomás A. Santa Coloma, por la valiosa discusión de los resultados y por su constante disposición a la colaboración.

A las Lic. Violeta A. Chiauzzi, Victoria Lux y Dra. Damasia Becú, por la colaboración en las determinaciones radioinmunológicas.

A la Sra Ana Rosa de la Cámara por su asistencia técnica.

A la Dra María Teresa Iñón, por las enseñanzas y colaboración en las determinaciones de fosfodiesterasa.

A los Dres Juan Carlos Calvo, Ernesto Podestá y Carlos Libertun, por sus útiles consejos y críticas.

Al grupo de docentes de Química Biológica I (FCEN UBA) que con su apoyo y estímulo contribuyeron a mi entrada al laboratorio: Dra. Marta Tesone, Dr. Juan Carlos Calvo, Lic. Omar P. Pignataro y Lic, Lucrecia Piñeiro. A mis

restantes compañeros de laboratorio: Dr. J. Lino Barañao, Lic. Violeta A. Chiauzzi, Ana Rosa de la Cámara, Lic. Juan Pablo Radicella, Lic. Tomás A. Santa Coloma, y también a Lic. Gustavo Sagarra y Lic. Jorge Muschietti, por el clima de cordialidad en el trata cotidiano.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) que hizo posible la realización de este trabajo, mediante las becas de Iniciación y Perfeccionamiento.

A la Dra. María Tomio, mi consejera de estudios por la correcta orientación brindada.

A las bibliotecarias Lic. María di Vistro, María Laura Tisano y María Cristina Vega, por la colaboración bibliográfica.

Al personal administrativo, de limpieza y del criadero, en especial a Juan José Cieslak por su ayuda en el manipuleo de los animales.

A las Dras. María Ana de Larminat e Isabel A. Lüthy, por sus generosos y útiles consejos y gran calidez humana.

A la Lic. Adriana Ruth Dawidowsky y Lic. Marcelo de las Heras, por su amistad.

A mis padres y mis hermanas por su gran ayuda y apoyo para la realización de este trabajo.

A Bernardo Pedroncini, mi esposo, por su dedicación a la confección de gráficos y compaginación de la bibliografía, con el mismo afán que pondría para la realización de la más bella de las esculturas.

ABREVIATURAS

ABP	Proteína ligadora de andrógeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ACTH	Hormona adreno-córtico-trofina
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	3' - 5'- AMP cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina - trifosfato
B	Hormona unida
B-LH	Actividad biológica de LH
Br	Bromocriptina
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Control
Ci	Curie
Co A	Coenzima A
cpm	Cuentas por minuto
D	Diabético
DE 50	Dosis efectiva 50
DEAE	Diethylaminoetanol
DES	Dietilestilbestrol
DHT	Dihidrotosterona
DNasa	Desoxirribonucleasa
DTT	Ditiotreitol
DS	Desviación Standard

	Estradiol
Eb	Benzoato de estradiol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ES	Error standard
	Hormona libre
FAD	Flavina- adenina dinucleótido
fmol	fentomol
FSH	Hormona folículo estimulante
	Hormona de crecimiento
GH	Hormona de crecimiento
GMFc	Guanosina monofosfato cíclico
GnRH	Hormona liberadora de LH y FSH
³ H	Tritio
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HDL	Lipoproteína de alta densidad
hLH	Hormona luteinizante humana
HMB	Hipotálamo medio basal
hPL	Hormona lactógeno-placentaria humana
hs	horas
HSD	Hidroxisteroide dehidrogenasa
I	Tratado con Insulina
IBYME	Instituto de Biología y Medicina Experimental
IGF	Factor de crecimiento similar a la Ins
I - LH	LH determinada por RIA
Ins	Insulina
ip	Intraperitoneal
iv	Intravenoso

Ka	Constante de asociación
Kd	Constante de disociación
Km	Constante de Michaelis- Menten
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
M	Molar
M: 199	Medio 199
min	minutos
MIX	Metil-isobutil- xantina
mU	Miliunidad
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADP ⁺	NAD -fosfato oxidada
NADPH	NAD -fosfato reducida
ng	nanogramos
NIH	National Institute of Health
nM	nanomolar
NMPc	Nucleótido monofosfato cíclico
OMI	Inhibidor de la maduración del ovocito
o-Prl	Prolactina ovina
ovx	ovaricotomizadas
P	Progesterona
PBS	Buffer fosfato salino

PDE	Fosfodiesterasa
PDE - AMPc	PDE dependiente de AMPc
PDE - GMPc	" " " GMPc
PG	picogramo
pM	picomolar
pmol	picomol
PMSG	gonadotropina de suero de yegua preñada
Prl	Prolactina
p/v	peso en volumen
Q	Número total de sitios
RER	Retículo endoplasmático rugoso
rGH	GH de rata
RIA	Radioinmunoensayo
rpm	revoluciones por minuto
RNasa	ribonucleasa
S	Sulpiride
sc:	subcutáneo
SCC	Enzima de ruptura de la cadena lateral
SDS	Dodecil- sulfato de sodio
SOI	Síndrome de ovario poliquístico
STR	Estrepto zotocina
T	Testosterona
TCA	Acido tricloroacético
TRH	Hormona liberadora de TSH
Tris	Tri (hidroxi-metil)- amino- metano
TSH	Tirotrofina

u	micrón
uCi	micro-Curie
ug	microgramos
UI	Unidades Internacionales
ul	microlitros
uM	micromolar

INDICE

	Página
1.- INTRODUCCION GENERAL	1
2.- OVARIO	4
2.1 <u>Estructura</u>	
2.2 El folículo ovárico	5
2.2.1 Folículo primordial	6
2.2.2 Folículo preantral	6
2.2.3 Folículo antral	8
2.2.4 Folículo preovulatorio	13
2.3 <u>Ovulación</u>	13
2.4 <u>El cuerpo lúteo</u>	16
2.4.1 Mantenimiento del cuerpo lúteo en la rata	19
a) Papel de la LH y Prl	19
b) Papel del estradiol	21
2.4.2 Biosíntesis de progesterona	22
2.4.3 Regulación de la biosíntesis de progesterona	25
3.- EJE HIPOTALAMO HIPOFISARIO	28
3.1 <u>Regulación de la secreción de LH</u>	29
3.2 <u>Regulación de la secreción de Prl</u>	34
4.- OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION	38
5.- MATERIALES Y METODOS	39
Químicos	39
A. <u>Animales y tratamientos</u>	41
A.1 Animales	41
A.2 Obtención de ratas superovuladas	41
A.3 Ovariectomía	41
A.4 Tratamiento con 17 estradiol	42
A.5 Inducción de la diabetes por estreptozotocina	42
A.6 Evaluación del estado diabético	43
A.7 Obtención de estados hiper e hipoprolactinémicos	44

	Página
A.8 Test de LHRH	45
A.9 Test de TRH	45
A.10 Obtención de hipófisis e hipotálamo	45
A.11 Determinación de los distintos estadios del ciclo estral	46
B.- <u>Células luteales</u>	46
B.1 Aislamiento de células luteales	46
B.2 Incubación de células luteales aisladas	47
B.3 Fraccionamiento subcelular de células luteales	48
C.- <u>Obtención de hormonas radioactivas</u>	48
C.1 Marcación de hormonas proteicas	48
C.2 Marcación de insulina	50
C.3 Determinación de la máxima capacidad de unión	50
C.4 Cálculo de la actividad específica por autodesplazamiento	51
D.- <u>Determinación de receptores de hormonas proteicas</u>	52
D.1 Receptores de LH/hCG en ovario y células luteales aisladas	52
D.2 Receptores para FSH y Frl en ovario	52
D.3 Receptores de Ins en células luteales	54
D.4 Cálculos	55
E.- <u>Determinación de receptores de hormonas esteroides</u>	55
E.1 Medición de receptores citoplasmáticos y nucleares de estradiol	55
F.- <u>Actividad de fosfodiesterasa</u>	57
F.1 Incubación de células luteales con Ins. Preparación de las fracciones particulada y citosólica	57
F.2 Purificación de la PDE de células luteales	58
F.3 Determinación de la actividad de PDE	58

	Página
G.-	<u>Determinaciones hormonales</u> 59
G.1	Determinación de progesterona 59
G.2	Progesterona sérica 60
G.3	Progesterona del medio de incubación 61
G.4	Determinación de AMPc 61
G.4.1	Aislamiento de la proteína quinasa de adrenal bovina 61
G.4.2	Ensayo para la determinación de AMPc 62
G.5	Radioinmunoensayos de hormonas proteicas 62
G.6	Bioensayo de la LH sérica 64
G.6.1	Extracción de la LH de suero de rata 65
H.-	<u>Otros métodos</u> 66
A.-	INSULINA 67
	<u>Introducción</u> 67
A.1	Estructura 67
A.2	Acción de la insulina sobre sus tejidos efectores 68
A.3	Receptor de insulina 69
A.4	Mecanismo de acción 71
A.5	Acción de Ins sobre tejidos gonadales 75
A.6	Diabetes y función reproductiva 77
A.6.1.	Estudio de la diabetes en animales de experimentación 79
A.6.1.1.	La diabetes por estreptozotocina como modelo experimental 82
A.7	Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos 83

	Página
<u>Resultados</u>	88
A.I. Alteraciones ováricas en ratas diabéticas por estreptozotocina.	88
A.II. Acción "in vitro" de la Ins sobre células luteales. Receptores de Ins.	99
A.III. Alteraciones en el eje hipotálamo-hipofisario en ratas diabéticas por estreptozotocina.	120
<u>Discusión</u>	139
A.I. Alteraciones ováricas en ratas diabéticas por estreptozotocina.	139
A.II. Acción de la Ins sobre células luteales. Receptores de Ins.	144
A.III. Alteraciones en el eje hipotálamo-hipofisario en ratas diabéticas por STR.	152
B. PROLACTINA	161
<u>Introducción</u>	161
B.1. Síntesis, estructura y secreción hipofisaria de la Prl.	161
B.2. Acción de la Prl.	162
B.2.1. Acción de la Prl sobre el ovario.	164
B.3. Receptores de Prl.	166
B.3.1. Receptores de Prl en ovario.	168
<u>Resultados.</u>	170
<u>Discusión.</u>	179
CONCLUSIONES.	183
BIBLIOGRAFIA.	186

1 - I N T R O D U C C I O N

En el curso del desarrollo filogenético el número de células comprendidas en el cuerpo de los organismos aumenta así como las células especializadas en diferentes direcciones para producir tejidos, órganos y sistemas de órganos (1).

Como consecuencia de estos progresos, la integración de partes divergentes del cuerpo en un organismo unificado, se convirtió en una necesidad y en un problema de creciente importancia. El crecimiento en el tiempo y en el espacio tuvieron que ser regulados y los mecanismos funcionales tuvieron que establecerse para permitir al organismo ajustarse a condiciones constantemente cambiantes del medio ambiente. Desde el punto de vista evolutivo se emplearon dos modos de abordar este problema en los animales:

- a) La diferenciación de células nerviosas para la transmisión de los impulsos a grandes velocidades y con precisión máxima.
- b) La liberación de mensajeros químicos liberados a los líquidos de los conductos sanguíneos y de los tejidos.

El sistema nervioso permite que se realicen ajustes específicos de un modo muy rápido pero que no resulta adecuado para la regulación de los procesos que deben durar tiempos prolongados.

La serie de mecanismos que se han presentado en la evolución de los sistemas de coordinación parece ser la siguiente:

células nerviosas (neurotransmisores) → células neurosecretoras (neurohormonas) → glándulas endócrinas (hormonas).

No existe ya duda de que muchos procesos vitales tanto en invertebrados como en vertebrados, son controlados por complejos neurosecretorios, básicamente de un diseño similar. Los estímulos que se reciben e integran en el sistema nervioso central pasan a las células neurosecretoras, que responden liberando neurohormonas a la circulación. Estos mensajeros químicos, de manera distinta a los neurotransmisores, pueden producir ajustes relativamente prolongados actuando sobre las glándulas endócrinas y otros tejidos que le sirven de blanco. Entre los vertebrados superiores, particularmente en los mamíferos, los centros neurosecretorios se han concentrado en una zona pequeña del diencéfalo ventral: el hipotálamo. Dicha zona regula la actividad de la glándula pituitaria (hipófisis), órgano clave en la modulación de una serie de funciones vitales del organismo, una de las cuales es la reproducción.

Existen grandes variaciones en las formas de la actividad procreadora en diferentes especies.

En los vertebrados, el ciclo reproductivo es controlado por la hipófisis y las hormonas gonadales presentes en la sangre. La producción de estas hormonas y por lo tanto, la alteración rítmica de la receptividad sexual, es establecida por algún reloj biológico inherente, que asegura una forma

relativamente constante de actividad para cualquier especie.

Las hormonas circulantes actúan no sólo para inducir un desarrollo anatómicamente completo de los órganos de la reproducción, sino también sobre el sistema nervioso para asegurar una variación de conducta que vaya de acuerdo con los órganos genitales completamente desarrollados. El óptimo desarrollo del sistema reproductivo contribuye a la supervivencia de la especie (cuya continuidad se asegura en la descendencia), y no del individuo. Como muchos procesos fisiológicos, estos fenómenos comprenden un gran conjunto de fuerzas equilibradas y deben ser explicadas en base al funcionamiento del organismo en su totalidad.

En los mamíferos los órganos, componentes esenciales que determinan la fisiología reproductiva residen en el eje hipotálamo - hipófiso - gonadal (hipotálamo - hipófiso - ovárico en la hembra).

En los capítulos siguientes se describirán someramente los aspectos bioquímicos fundamentales de cada uno de los componentes del eje hipotálamo - hipófiso - ovárico, que determina la fisiología reproductiva de la rata hembra adulta.

O V A R I O

El ovario juega un papel fundamental para la normal función reproductiva en los mamíferos.

a) Como contenedor y proveedor de células germinales maduras (ovocitos) capaces de ser fertilizadas.

b) Como sincronizador del proceso de maduración de los ovocitos con los eventos del ciclo sexual reproductivo de la hembra, a través de un mecanismo de emisión-recepción de señales hormonales.

2.1 Estructura

Los ovarios de los mamíferos son órganos pares aproximadamente iguales en tamaño. Se encuentran en la cavidad pelviana, suspendidos mediante un mesenterio (meso ovario) que es un repliegue de la hoja posterior del ligamento ancho por donde pasan sus vasos sanguíneos linfáticos y nervios. La superficie del ovario está cubierta por un epitelio cúbico y monoestratificado. Más hacia el interior se distingue el estroma cortical rico en fibras colágenas (túnica albugínea) y por dentro de esta capa se hallan sumergidos los folículos y demás estructuras derivadas de ellos. En la zona superficial se encuentran también

algunas fibras musculares lisas. El estroma medular corresponde a un tejido conectivo laxo por el cual transcurren y se ramifican los vasos que penetran por el hilio e irrigan el órgano.

2.2 Folículo ovárico

El folículo ovárico es la unidad básica funcional del ovario y consiste en una capa exterior celular (células de la teca y de la granulosa) que rodea al complejo ovocito-células del cumulus. La maduración de los folículos ováricos y su transformación a cuerpos lúteos está regulada por un grupo específico de hormonas. Los diversos compartimientos foliculares interactúan de forma integrada para secretar esteroides sexuales (estrógenos y progestágenos) y para producir un óvulo fertilizable, en respuesta a la secreción cíclica de gonadotrofinas hipofisarias.

Aunque las trofinas hipofisarias (LH, FSH y Prl) son las principales reguladoras del desarrollo folicular, no todos los folículos de un ovario responden durante un ciclo dado. Por otra parte, sólo un número limitado de folículos seleccionados ovulan durante la vida de la hembra mientras que la mayoría entran en atresia. Las etapas de crecimiento de un folículo ovulatorio son: a) folículo primordial; b) folículo pre-antral; c) folículo antral; d) folículo de Graaf pre-ovulatorio.

Luego de la ovulación, las células de la granulosa

sufren cambios profundos en su capacidad de respuesta hormonal y en su capacidad para producir esteroides. Estas células luteinizadas constituyen el mayor componente del cuerpo lúteo y son la principal fuente de progestágenos ováricos.

2.2.1 Folículo primordial

Consiste en un ovocito detenido en el estadio de diplotene de la profase meiótica, rodeado por una única capa de células cuboidales de la granulosa. Este pequeño folículo (que mide 150 u de diámetro aproximadamente) reside dentro del ovario hasta que alguna señal dispara su crecimiento.

La iniciación del crecimiento del folículo es un proceso independiente de la influencia de las gonadotrofinas y continuo, (no se interrumpe ni siquiera durante la preñez o luego de la hipofisectomía (2,3) y puede iniciarse en cualquier día del ciclo (4)). Los folículos inactivos comienzan a crecer a una velocidad aparentemente proporcional al número de folículos remanentes, que decrece con la edad (3,5). Hasta el presente se desconoce cuál es el estímulo para la iniciación del crecimiento folicular.

2.2.2 Folículo pre-antral o primario

Una vez iniciado el crecimiento, el ovocito se agranda

y el folículo ingresa en el estadio pre-antral (o primario), en el que aparece una membrana glicoproteica, la zona pelúcida, rodeando al ovocito. Las células de la granulosa proliferan en varias capas y se comienza a organizar la capa de células de la teca a partir del estroma.

Las células de la granulosa del folículo pre-antral sintetizan principalmente estrógenos (6, 7, 8). La enzima aromataza actúa convirtiendo andrógenos a estrógenos y aparece como el factor limitante de la producción estrogénica del ovario. La aromatización se induce o activa a través de la acción de FSH (6) que actúa a través de receptores específicos estimulando la aromatización de cantidades limitadas de andrógenos y generando su propio micro-ambiente estrogénico (8, 9). La producción de estrógenos en respuesta a FSH, está limitada por el contenido de receptores de FSH. Esta hormona aumenta la concentración de su propio receptor "in vivo" e "in vitro" (10). Por otra parte la FSH se combina con los estrógenos para ejercer una acción mitogénica sobre las células de la granulosa y estimular su proliferación (11). Los estrógenos junto con la FSH promueven una rápida acumulación de receptores de FSH, consecuencia de un aumento en el número de células de la granulosa y de un cambio en la densidad de receptores por célula (10, 12).

Los andrógenos son producidos por las células de la teca e intersticiales del ovario y juegan un papel muy importante

en el desarrollo folicular. Han sido descritos receptores específicos para andrógenos en el citoplasma de células de la granulosa (13). Además de servir como sustrato para la aromatización inducida por FSH, los andrógenos también estimulan por sí mismos la actividad de aromatasa (14, 15).

En ausencia de gonadotrofinas, los andrógenos estimulan la atresia folicular (16). Este proceso involucra la necrosis de las células de la granulosa y la muerte del óvulo. Las acciones contrapuestas de los andrógenos y estrógenos pueden deberse a la disminución de los receptores de estradiol inducida por los andrógenos (17, 18). Por lo tanto el destino del folículo pre-antral depende de un delicado equilibrio entre ambos esteroides. A bajas concentraciones, los andrógenos estimulan su propia aromatización. A niveles mayores, la limitada capacidad de aromatización se satura y el folículo se vuelve androgénico y finalmente atrésico.

2.2.3 Folículo antral

Fluido Folicular:

Los estrógenos sinérgicamente con la FSH inducen un aumento en la producción de fluido folicular que inicialmente se acumula en los espacios intracelulares de las células de la granulosa hasta juntarse para formar una cavidad, a medida que el

folículo hace su transición gradual al estadio antral. El fluido folicular deriva también en parte del plasma (19). Las células de la granulosa están laxamente empaquetadas y unidas a través de uniones estrechas que permiten el libre pasaje de materiales a través del interior del folículo. Estas uniones juegan un papel importante coordinando la estimulación hormonal de la función de las células de la granulosa durante el desarrollo folicular. El acceso al interior del ovocito se realiza a través del cúmulus de células de la granulosa que lo rodean. Es claro el significado adaptativo del fluido folicular: provee el acceso de las gonadotrofinas a los receptores celulares mientras que ofrece un área local para cualquier amplificación de señales. Por lo tanto, en el ovario, folículos contiguos pueden estar en distintos estadios de crecimiento, mientras que todas las células de un folículo dado se nutren en el mismo entorno endócrino.

Células de la granulosa: Varios estudios han demostrado que las células de la granulosa de un folículo dado se ubican de forma estratificada y que sus estados de diferenciación no son uniformes. Se puede distinguir por lo menos tres poblaciones: las murales son aquellas situadas cerca de la membrana basal y son normalmente las más activas en varios parámetros funcionales. Las antrales son las más cercanas a la cavidad antral y las células del cúmulus se encuentran rodeando al ovocito. Las células murales son probablemente las más activas en cuanto a síntesis

de esteroides, ya que poseen altos niveles de 3β - hidroxiesteroide deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y citocromo P-450 (20-22). La ausencia de citocromo P-450 en las células del cúmulus indica probablemente la ausencia de la actividad de aromatasa en ellas (21).

Esteroidogénesis folicular. La hipótesis de dos células-dos gonadotrofinas.

De acuerdo a este modelo la LH estimula la biosíntesis de andrógenos (androstenediona y testosterona) a partir de colesterol en el compartimiento de la teca interna (23). Los andrógenos difunden a través de la lámina basal para convertirse en estrógenos en las células de la granulosa o bien se secretan a la vena ovárica. Las células de la granulosa, en contraste con las de la teca, contienen muy bajos niveles de las enzimas 17- α hidroxilasa y 17-20 desmolasa que median la conversión de progestágenos a andrógenos (24, 25). La deficiencia de estas enzimas en la granulosa hace necesaria la participación conjunta de ambos compartimientos celulares para una síntesis óptima de andrógenos y estrógenos. Por otra parte, las células de la granulosa producen progesterona como respuesta a gonadotrofinas y es posible que la progesterona difunda hacia las células tecales para servir como sustrato para la biosíntesis de andrógenos.

Las células de la teca producen principalmente androstenediona lo que hace necesaria la participación de la 17 β hidroxisteroide deshidrogenasa de las células granulosas para la biosíntesis del estradiol (24).

La interacción local (o paracrina) entre los compartimientos de la granulosa y la teca, con la concomitante aceleración de la producción estrogénica, no parece ser totalmente funcional hasta el desarrollo antral tardío.

Selección y mantenimiento de los folículos dominantes.

La interacción entre estrógenos y FSH, tan crucial en el mantenimiento del crecimiento y maduración del folículo, juega también un papel fundamental en la selección de los folículos destinados a ovular. Mientras que los estrógenos influyen positivamente sobre la acción de FSH en el folículo en maduración ejercen un feedback negativo, sobre la liberación de FSH a nivel hipotálamo-hipofisario disminuyendo los niveles sistémicos (26) e intrafoliculares de FSH (27). Esto impediría la maduración de otros folículos (28) e iniciaría en ellos una secuencia de eventos promoviendo la conversión a un microambiente androgénico que induce la atresia folicular irreversiblemente. La selección de uno (primates) o varios folículos como dominantes está asegurada una vez que éste/estos producen estrógenos en cantidades significativamente mayores que sus folículos vecinos. Los folí-

culos dominantes desarrollan, gracias a la alta producción de estrógenos, una altísima capacidad de respuesta a la FSH debido a la enorme proliferación de células de la granulosa. Por otra parte este proceso está acompañado por un desarrollo avanzado de la vasculatura tecal que ofrece una distribución preferencial de la FSH al folículo que posee la mayor cantidad de receptores de FSH. Contrariamente los folículos destinados a entrar en atresia no son capaces de producir suficientes estrógenos como para contrarrestar los efectos adversos de la supresión de FSH (29, 30).

La FSH junto con la acción sinérgica de los estrógenos induce el desarrollo de receptores de LH, Prl y EGF en células de la granulosa (31, 32, 33, 34, 35). Los estrógenos provenientes de los folículos dominantes, actúan a nivel central estimulando el pico ovulatorio de LH y localmente promoviendo la inducción del receptor de LH. La inducción de los receptores de LH está asociada con la aparición de microvellosidades (donde se ubican los receptores) en las células de la granulosa (36). La FSH ejerce su acción a través de AMPc como segundo mensajero que a su vez activa una proteína kinasa-AMPc dependiente tipo II (37). También ha sido descripta la intervención del sistema calcio-calmodulina en la estimulación por FSH de la biosíntesis de progestágenos (38).

2.2.4 Folículo preovulatorio

Las células de la granulosa del folículo preovulatorio crecen y adquieren inclusiones lipídicas (la FSH induce los receptores de la lipoproteínas en la membrana (39)) mientras que las de la teca se vuelven vacuoladas y aumentan la vascularización.

El pico de LH (y el de Prl en la rata) proporciona el estímulo ovulatorio y simultáneamente fija el destino de los folículos remanentes. Promueve, junto con un pico preovulatorio de Prl en la rata, la luteinización de las células de la granulosa actuando a través de la unión a su receptor e induce la producción de progesterona. La progesterona afecta el feedback positivo del estradiol en forma dependiente de la dosis y del tiempo. Por otra parte la progesterona es en parte responsable de la inducción del pico de FSH, la cual reinduce la mitosis de las células de la granulosa. Esta acción combinada serviría para coordinar el estímulo ovulatorio con la madurez del folículo preovulatorio (40).

2.3 Ovulación

El pico ovulatorio de LH inicia la reasunción de la meiosis del ovocito y la luteinización de las células de la granulosa. Estas acciones parecen ser mediadas por el AMPc (41). Los

niveles crecientes de AMPc son paralelos al aumento de producción de progesterona de las células de la granulosa.

El inhibidor de la maduración del ovocito (OMI) es un compuesto no esteroideo secretado por las células de la granulosa y aparentemente responsable del detenimiento en el desarrollo de los ovocitos (29). Los ovocitos reasumen la meiosis espontáneamente una vez separados de las células de la granulosa. Inversamente, el co-cultivo con células de la granulosa o el agregado de fluido folicular previene la maduración del ovocito (29). El pico de LH causaría una ruptura en la conexión entre el cúmulo y el ovocito impidiendo al OMI llegar al ovocito o bien ejercería su efecto inhibiendo la producción de OMI.

Se ha descrito asimismo un inhibidor de la luteinización (LI) presente en folículos pequeños mientras que los folículos grandes contendrían un estimulador de la luteinización (LS) (19). Estos factores no han sido aislados, aunque no serían esteroideos.

Con el pico de LH los niveles de progesterona continúan en aumento hasta la ovulación. La existencia de receptores de progesterona ováricos ha sido demostrada con un progestágeno sintético (R-5020) y confirma la hipótesis de una acción directa de la progesterona sobre las células de la granulosa (42).

La progesterona podría ser responsable de los cambios en las propiedades elásticas de la pared folicular que explican

el rápido aumento en el volumen de fluido folicular previo a la ovulación. Ha sido sugerido que la LH, actuando a través de la estimulación de AMPc y/o progesterona podría aumentar la actividad de enzimas proteolíticas que digieren el colágeno de la pared folicular aumentando su distensibilidad. Se ha descrito la presencia de activador de plasminógeno en fluido folicular que actúa produciendo plasmina a partir de plasminógeno. La plasmina, una enzima proteolítica, disminuye la resistencia de la pared del folículo. La FSH principalmente, aunque también la LH, estimula la liberación del activador de plasminógeno (29).

Las prostaglandinas de la serie E y F son también importantes productos secretorios de las células de la granulosa. Su contenido aumenta en el fluido folicular antes de la ovulación por la acción de las gonadotrofinas vía AMPc (29). Actúan en la inducción de la ruptura folicular posiblemente a través de la movilización de enzimas lisosomales que digieren la pared folicular (29). Las prostaglandinas inducidas por LH también podrían estimular células de músculo liso presentes en la pared folicular, provocando la expulsión del óvulo.

El contenido de proteoglicanos (oleosacáridos unidos covalentemente a un centro proteico) presentes en el fluido folicular (29) aumenta con el crecimiento del antro (estimulado por FSH vía AMPc) y luego disminuye antes de la ovulación, disminuyendo la viscosidad de fluido (43). Este proceso podría estar

mediado por plasmina (44). La FSH también estimula la producción de ácido hialurónico por el complejo cúmulus-ovocito (45, 46). Esto produce una expansión del cúmulus que permite que el complejo ovocito-cúmulus flote libremente en el fluido antral justo antes de la ruptura folicular.

Las posibles funciones de la FSH serían: estimulación de la liberación del activador del plasminógeno, mucificación de las células del cúmulus e inducción de receptores de LH, necesarios para la luteinización de las células de la granulosa.

2.4 El cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo es en realidad un folículo ovárico en el cual la rápida regresión, que es el destino de todos los folículos postovulatorios, se encuentra temporariamente detenida. Se forma durante el período de ovulación mediante una transformación (luteinización) de las células que rodean la cavidad del folículo. Este proceso afecta las células de la granulosa en todas las especies; en algunas, un proceso similar puede también afectar las células de la teca interna, aunque éstas constituyen una muy pequeña proporción del cuerpo lúteo (47).

La formación de un cuerpo lúteo y la secreción de P constituyen la función última de las etapas de diferenciación de las células de la granulosa de los folículos no atrésicos y en madu

ración. Estas etapas de diferenciación son esenciales, ya que las células provenientes de folículos pequeños y medianos no se luteinizan espontáneamente en cultivo, contrariamente a las provenientes de los folículos grandes que hayan estado sometidos a un pico de LH "in vivo", las cuales resultan en una capacidad máxima de conversión de la testosterona en estrógenos (48).

La luteinización involucra un enorme crecimiento de la célula con un gran aumento del cociente núcleo/citoplasma y la formación de una pared celular bien neta. Se desarrolla una extensiva red capilar que abarca todas las células, prolifera marcadamente el retículo endoplasmático y pasa de ser predominantemente rugoso a ser predominantemente liso. Las mitocondrias se transforman de redondas y pequeñas con crestas lameliformes a más grandes y de formas más variadas con crestas tubulares. Aumenta el desarrollo del aparato de Golgi y aparecen numerosas gotas lipídicas (49, 50, 51).

El cambio principal es un aumento sorprendente de la secreción de F acompañado de una relativa o completa pérdida (según la especie) de la capacidad de secreción de andrógenos y estrógenos (52). También se ha descrito una disminución de la producción de prostaglandinas, que son producidas en grandes cantidades por el folículo preovulatorio (53, 54, 55).

El cuerpo lúteo parecería pertenecer al mismo tipo de glándulas endócrinas que la corteza adrenal y la tiroides, es

decir, la capacidad del cuerpo lúteo de secretar P depende en general de hormonas tróficas de la pituitaria. Sin embargo la diferencia con dichas glándulas radica en la diversidad en las distintas especies en cuanto a la dependencia hormonal. En algunas especies la LH es la hormona trófica, en otras la Prl y en otras una combinación de ambas (47). Es sorprendente el contraste entre esta diversidad de la regulación de la actividad del cuerpo lúteo con la relativa uniformidad de la regulación del folículo. Por otro lado, también a diferencia de otras glándulas endócrinas la actividad del cuerpo lúteo es esencialmente no oscilatoria, es decir, es un sistema efímero o de un único ciclo. Consta de tres períodos de acuerdo al perfil de secreción de P: una fase ascendente, una fase constante y una fase de regresión. Esta condición es universal e indica que existe un sistema común de regulación de los cuerpos lúteos de todos los mamíferos que causa su caducidad. Considerando las características de relativa autonomía de la secreción de P, capacidad de respuesta a la acción luteolítica de las prostaglandinas y la capacidad de sintetizar las mismas se evidencia que por lo general la P tiende a posponer la capacidad de síntesis de las prostaglandinas. En base de esto se puede hipotetizar que el cuerpo lúteo es una glándula efímera debido a que el sistema básico que regula su actividad consiste de dos procesos opuestos mutuamente (47).

En la rata, el cuerpo lúteo del ciclo estral dura tres días y se mantiene aun en ratas hipofisectomizadas (56). El cuerpo lúteo de la preñez en la rata dura tanto como ésta (57). El uso de animales pseudopreñados para el estudio de diversos aspectos del funcionamiento del cuerpo lúteo es muy generalizado.

La pseudopreñez puede inducirse por estimulación cervical o por cópula con un macho vasectomizado (92). La superovulación por administración de gonadotrofinas induce un estado de pseudopreñez en el cual el ovario se compone de un altísimo porcentaje de células luteales. Dichas células poseen características histológicas y similitud de respuesta a las células luteales del ciclo o de la preñez temprana. Este sistema fue descrito por primera vez por Rowlands y col. (59) y fue evaluado y hallado adecuado para su implementación experimental (60) y para realizar estudios acerca de efectos esteroideogénicos agudos (61).

2.4.1 Mantenimiento del cuerpo lúteo en la rata.

a) Papel de la LH y la Prl

La LH controla la secreción y la síntesis de P a través del sistema adenilato ciclasa (61, 62, 63). Esta activación enzimática cataliza la formación de AMPc luego de la estimulación de las gonadotrofinas a través de la interacción hormona-

receptor (64). El AMPc puede imitar las acciones luteinizantes y esteroidogénicas de la LH en el cuerpo lúteo, indicando el papel del nucleótido como mediador intracelular de la LH (64, 65) más aún, la activación de la adenilato ciclasa resultante de la estimulación por LH, fluctúa de manera idéntica a la secreción de P en el cuerpo lúteo (66), lo cual refuerza el concepto de mediación por el sistema adenilato-ciclasa-AMPc en la acción de la LH a nivel ovárico.

La LH ejerce un rol trófico importante sobre el cuerpo lúteo estimulando la esteroidogénesis en diversas especies además de la rata (67) (primates (68), conejo (69), animales domésticos (70), etc). Esta hormona es esencial para el mantenimiento del comienzo de la gestación (71). De todos modos, en ciertas especies, niveles plasmáticos de LH muy elevados inducen la regresión del cuerpo lúteo (72 - 74).

Por otro lado la LH no es la única hormona luteotrófica. La secreción de P depende de la Prl desde el segundo día después de la ovulación en la rata (75, 76) y durante los primeros días el cuerpo lúteo no necesita de la LH para mantener la secreción de P. Alrededor de los días 8 y 9 de gestación, el útero y la Prl modulan la dependencia del cuerpo lúteo de la LH (71, 77), pudiendo el útero adelantarla y la Prl retrasarla (77). La Prl induce los receptores de LH en ratas hipofisectomizadas e intactas (78, 79) y tiene también efectos luteolíf

ticos (80) probablemente a través del control de la sensibilidad del cuerpo lúteo a la acción luteolítica de la $PGF_{2\alpha}$ (81).

La luteotrofina decidual, producida por el útero de la rata preñada, posee características fisiológicas y bioquímicas similares a la Prl. Esta luteotrofina mantiene los niveles circulantes de β en ausencia de Prl (82), mantiene los receptores de estradiol y LH en células luteales (83), sinergiza con el estradiol lúteo para la estimulación de la síntesis de P (84) y regula la adenilato ciclasa sensible a LH (85).

b) Papel del estradiol

El estradiol, así como la LH y la Prl, puede ejercer efectos luteotróficos o luteolíticos según las condiciones experimentales utilizadas. Los estrógenos son secretados por las células luteales de: rata (86), cerdo (87), mono Rhesus (88), humano (89) y juegan un papel importante en el mantenimiento del cuerpo lúteo de diversas especies (69, 90, 91). Sin embargo, todavía es oscuro el panorama acerca del mecanismo de acción del E en el cuerpo lúteo de la rata (92). La síntesis de P por las células luteales está íntimamente ligada a la acción de los estrógenos en el conejo (93) y en el ciclo menstrual humano (68) mientras que son requeridos para la implantación del huevo en el hurón (94). Contrariamente, en el mono Rhesus el estradiol tiene un efecto luteolítico en la última fase del ciclo menstrual (95).

2.4.2. Biosíntesis de progesterona

Las células luteales contienen todas las enzimas necesarias para la biosíntesis "de novo" de P_4 a través del camino biosintético colesterol-pregnenolona. Asimismo se ha establecido la presencia de todas las enzimas involucradas en la síntesis "de novo" del colesterol, incluyendo la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-Co A reductasa), que es la limitante de dicho camino biosintético (96). Sin embargo, como el cuerpo lúteo secreta grandes cantidades de progestágenos (3,5 mg/día en el ovario superovulado) debe depender del aporte exógeno de colesterol para utilizarlo como sustrato (97). Esto ha sido efectivamente demostrado "in vivo" (98, 99, 96) e "in vitro" (96, 100).

El colesterol proviene en general de las lipoproteínas plasmáticas (en la rata fundamentalmente HDL) que penetran a la célula a través de receptores específicos que son modulados por las hormonas tróficas (LH, Frl). Estas lipoproteínas son endocitadas (101) y las vesículas endocíticas se funden con lisosomas que hidrolizan las partículas de lipoproteína a aminoácidos y colesterol. Este mecanismo ha sido comprobado para las LDL. Sin embargo para las HDL no parece ser necesario un catabolismo completo previo a la utilización del colesterol (100). La colesterol-ester hidrolasa citosólica sería la encargada de liberar el colesterol y este proceso sería más rápido que la inter-

mediación del sistema lisosomal (100). El aumento de colesterol libre intracelular suprime la actividad de la HMG-Co A reductasa. Por otro lado el colesterol activa la acil-Co A: colesterol-acil transferasa, la cual reesterifica el colesterol. Los ésteres de colesterol se almacenan en gotas lipídicas en la célula y pueden ser hidrolizados a colesterol libre, luego de la activación de la colesterol esterasa. Esta enzima es controlada por diferentes hormonas (102, 103). El metabolismo del colesterol en células luteales está por lo tanto compartimentalizado. El colesterol proveniente de las lipoproteínas debe pasar a través de vesículas y lisosomas antes de llegar a la mitocondria, donde debe atravesar la membrana para ser metabolizado a pregnenolona en la membrana interna mitocondrial, o bien debe llegar al retículo endoplasmático, donde se esterifica para almacenarse en las gotas lipídicas. Como la célula luteal sintetiza grandes cantidades de progestágenos, requiere un modo de facilitar la traslocación y el procesamiento del sustrato. En este sentido se ha demostrado la importancia del citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos) en estas células (104-106).

El paso limitante en la biosíntesis de P es la ruptura de la cadena lateral del colesterol a pregnenolona. Esta reacción está mediada por la enzima de ruptura de la cadena lateral (SCC) que se encuentra en la membrana interna mitocondrial (107). Este sistema consta de tres componentes: citocromo P-450_{SCC} una flavoproteína que contiene FAD (luteodoxina reductasa) y una

proteína que contiene azufre e hierro (luteodoxina). La reacción consume tres moles de NADPH y O_2 por mol de colesterol metabolizado a pregnenolona (100). La regulación hormonal de esta enzima puede afectar por lo menos a tres pasos de la reacción: 1) la transferencia del colesterol a la mitocondria y el acceso intramitocondrial del colesterol a la SCC (108); 2) la formación de complejos entre fosfolípidos (como la cardiolipina) y el citocromo P-450 y la disponibilidad de fosfolípidos (109); 3) la modulación de los niveles del citocromo P-450 (110, 111). La actividad de la SCC se inhibe con drogas específicas como la aminoglutetimida (112).

La pregnenolona se convierte en P por un complejo de dos enzimas, 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) y Δ^5 , Δ^4 -isomerasa. La isomerasa se encuentra en exceso por lo cual la enzima regulatoria es la 3β -HSD. Aunque la mayor parte de esta enzima se localiza en la fracción microsomal, algunos estudios han descrito su presencia en la mitocondria (113, 114). La conversión de pregnenolona a P es irreversible y constituye asimismo uno de los pasos regulatorios de la biosíntesis de P.

La principal ruta del catabolismo de la P es la mediada por la enzima 20α -HSD (20 α -HSD) la cual convierte reversiblemente la P a su metabolito 20α -hidroxiprogesterona (20α -OH-P). Este metabolito no es capaz de mantener la preñez o las respuestas de la decidua. La enzima 20α -HSD

se encuentra en altas concentraciones en el cuerpo lúteo durante la luteólisis (115, 116).

2.4.3. Regulación de la biosíntesis de progesterona

La LH es la hormona que inicialmente desencadena el "programa" de diferenciación o luteinización, de modo de aumentar la capacidad esteroidogénica de la célula (aumenta los receptores de lipoproteínas, modula la SCC, etc.). Otras hormonas (Prl, estradiol) ejercen un efecto permisivo como para producir y mantener la capacidad esteroidogénica máxima (100).

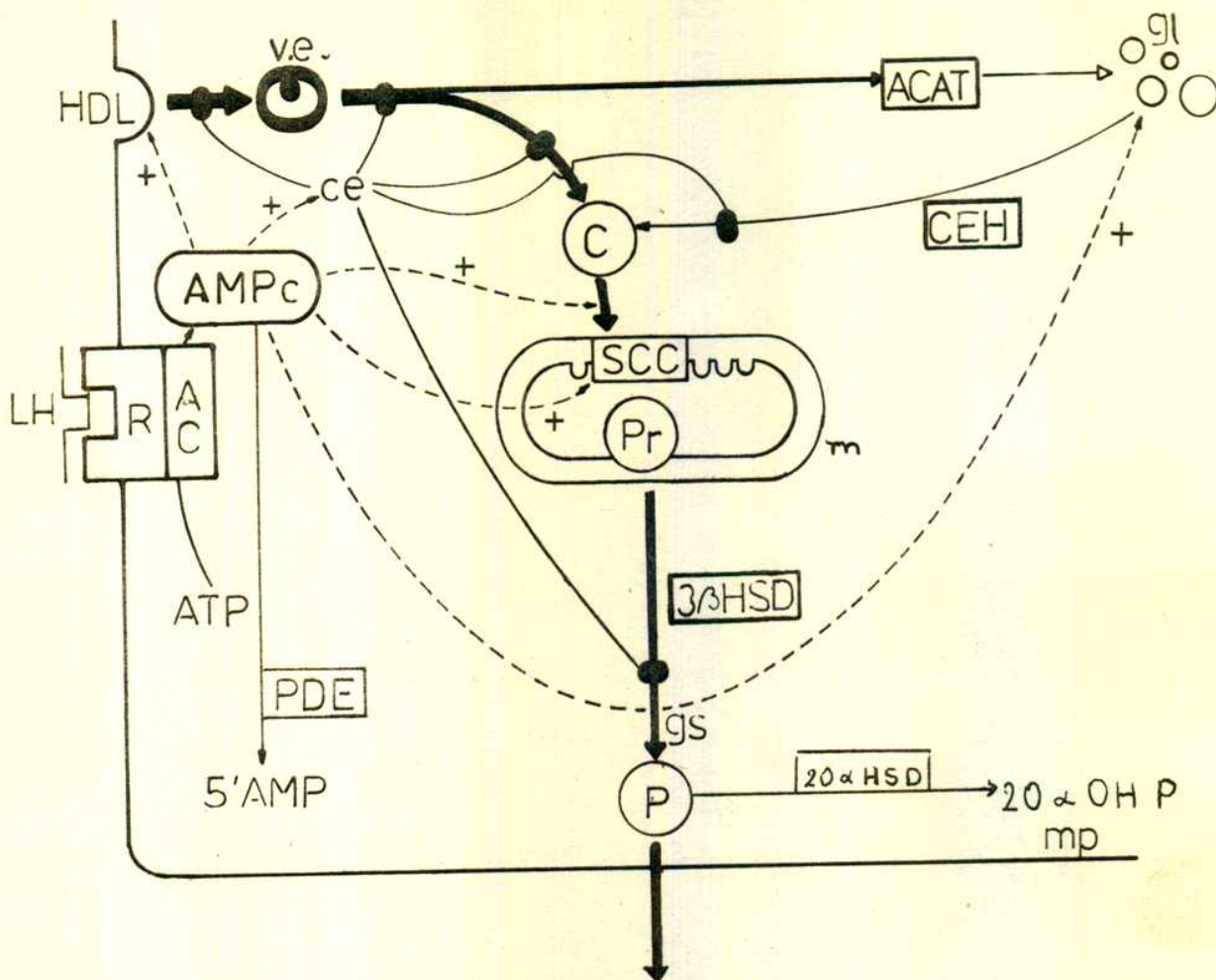
Las hormonas capaces de elevar los niveles de AMPc intracelular producen un estímulo secretorio agudo, que induce una mayor utilización del colesterol endógeno y promueve su movimiento hacia el sistema SCC. El efecto esteroidogénico de la LH/hCG sobre el cuerpo lúteo ha sido demostrado "in vivo" (117) e "in vitro" (118). Este efecto está acompañado por cambios en la actividad de las enzimas esteroidogénicas, estimulando la HMG-Co A reductasa, la colesterol esterasa y los receptores de lipoproteínas para incrementar la provisión de sustrato (102, 103).

La LH estimula la producción de AMPc incrementando la actividad la adenilato ciclase (119) aunque sin afectar la actividad de fosfodiesterasa (PDE) (120). La estimulación la adenilato ciclase puede resultar de la activación de una pro-

teasa de membrana (121) y se ha descrito la intervención de los microfilamentos (122) y el ión calcio (123) en dicha activación. Los aumentos del AMPc resultan en una activación de una proteína quinasa dependiente de AMPc (124) que a su vez produce un aumento de fosforilación y de la esteroidogénesis (125).

Aún no está completamente dilucidado el papel de la LH en la regulación del metabolismo de fosfolípidos en ovario (126). Aunque la LH modifica el metabolismo de fosfoinosítidos en cuerpo lúteo (127) la hormona no altera el ácido fosfatídico (128). Strauss y col. han propuesto que la síntesis de lípidos fosforilados estimulada por LH podría modificar la composición fosfolipídica de la membrana mitocondrial afectando la movilidad del colesterol hacia el citocromo P-450_{SCC} o bien reduciendo el Km de la SCC (129).

Se ha descrito un mecanismo de control autócrino en células luteales, en el cual la P, el producto esteroidogénico de las células, ejerce un efecto de retroalimentación positiva ultracorta. De este modo la P estimularía su propia secreción (47).



REGULACION POR LH DE LA BIOSINTESIS DE P

Enzimas (recuadradas):

AC: adenilato ciclasa, ACAT: colesterol-aciltransferasa, CEH:colesterol-ester-hidrolasa. (Las restantes figuras en las abreviaturas).

ve: vesícula endocítica, ce: citoesqueleto, gl:gotas lipídicas, m:mitochondria, gs: gránulos secretorios, mp: membrana plasmática.

Esteroides: C: colesterol, Pr: pregnenolona, P: progesterona, 20α -OHP: 20α -hidroxiprogesterona.

La LH (o hCG) a través de la unión a un receptor de membrana activa la enzima adenilato ciclasa y el AMPc producido(vía activación de proteínas quinasa dependientes de AMPc) activa los procesos indicados por las flechas punteadas con signos +.

3. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISARIO

La adaptación a los diversos cambios fisiológicos asociados a la función sexual y reproductiva está determinada por una interrelación recíproca, estimuladora e inhibitoria entre el ovario a través de la secreción de esteroides y el eje hipotálamo hipofisario, mediante la secreción de gonadotrofinas (LH, FSH) y otras hormonas como la Prl. Estas hormonas se sintetizan en la adenohipófisis o hipófisis anterior. Esta glándula recibe y emite señales hormonales a través de la circulación periférica y del sistema porta-hipofisario que la comunica con el hipotálamo. Los vasos porta-hipofisarios forman parte del vínculo neurovascular mediante el cual el hipotálamo y sus neurohormonas mediadoras controlan la secreción de trofinas hipofisarias. Las neurohormonas, sintetizadas en determinados núcleos hipotalámicos, son transportadas hasta la eminencia media donde a través de las vesículas neurosecretorias, son vertidas a la circulación porta-hipofisaria. Asimismo hay un flujo en sentido inverso, de la hipófisis al hipotálamo a través del cual actúan las hormonas hipofisarias para regular la síntesis de las hormonas neurosecretorias y también existen conexiones con el líquido cefalorraquídeo mediante los tanicitos de la eminencia media.

A su vez existe un mecanismo de control supraneurosecretorio, es decir factores sintetizados por otras neuronas capaces de modular la síntesis y liberación de las hormonas neurosecretorias (por ejemplo los péptidos opioides en la secreción de Prl h-LH).

3.1 Regulación de la secreción de LH

La LHRH (o GnRH) es un decapeptido hipotalámico estimulador de la secreción de LH y FSH. Ambas hormonas tienen, sin embargo, un patrón de secreción independiente. La inhibina (sintetizada por el folículo) disminuye la secreción de FSH y es uno de los mecanismos responsables de la disociación en la secreción de ambas hormonas.

La secreción de LH en la rata se produce de dos maneras diferentes (185). La secreción basal está caracterizada por descargas tónicas cuya frecuencia y amplitud puede variar considerablemente de acuerdo a las diferentes fases del ciclo estral en ratas hembras. En el animal adulto la secreción periódica de LH se interrumpe en la tarde del proestro por pulsos rápidos y de gran amplitud constituyendo el pico preovulatorio de LH que dura 4-6 horas.

La LHRH es aparentemente la señal neural primaria involucrada en la activación de la liberación de LH de las células

gonadotropas hipofisarias. Se sintetiza en el área retroquias
mática, núcleo arcuato lateral y en algunas regiones del hipó-
tálamo medio basal (HMB). Sin embargo las zonas responsables
del pico ovulatorio de LH son diferentes y aún no están comple-
tamente caracterizadas. La LHRH también se libera como descar-
gas tónicas al sistema porta-hipofisario para llegar a la hipó-
fisis anterior. La periodicidad de la descarga de LHRH, los
efectos complejos de retroalimentación o "feedback" de los es-
teroides gonadales y la influencia de los opioides supraneuro-
secretorios determinan las dos modalidades de la secreción de
LH.

Secreción de LH durante el ciclo estral y castración

Los niveles más bajos de LH plasmática de todo el ciclo
ocurren en el estro debido a una menor frecuencia de la libera-
ción pulsátil. En el diestro I los niveles de LH se elevan por
un marcado incremento en amplitud y frecuencia de los pulsos de
LH y luego (diestro II y mañana del proestro) la frecuencia se
mantiene constante y la amplitud decrece produciendo niveles
promedio de LH sanguíneos menores que en diestro I pero mayores
que en estro. Estos cambios se encuentran aparentemente corre-
lacionados con los patrones de secreción de LHRH.

La secreción del pico preovulatorio de LH de la tarde
del proestro también es pulsátil y la frecuencia de los pulsos

es la mayor de todo el ciclo. Es posible que todo el pico pre-ovulatorio resulte de cambios en la cantidad y frecuencia de pulsos de LHRH.

El tercer modo de secreción de LH formado por pulsos a intervalos regulares de 20-30 min. y de alta amplitud se observa en ratas ovariectomizadas (ovx). Este modo de secreción se adquiere luego de 24 horas de castración en diestro I aunque en otros estudios la hipersecreción de LH aparece luego de 2-4 días luego de la ovariectomía. Hasta 8 días luego de la castración la cantidad de LH liberada en cada pulso se mantiene constante aunque hay un aumento de la frecuencia de los pulsos de LH responsable del aumento continuo de los valores promedio en sangre. Durante los 21 días subsiguientes se estabiliza la frecuencia de descarga y aumenta la amplitud. No hay evidencias directas de un aumento en la liberación de LHRH luego de la castración, aunque algunos estudios describen mayores concentraciones de LHRH en la sangre portal y una secreción tónica similar a la observada en ratas en diestro I. Sin embargo la hipersecreción de LHRH no parece ser el único evento responsable del aumento de la secreción de LH post-castración.

Regulación por esteroides de la secreción de LH

El sitio principal de acción de E y F en el control de la secreción tónica de LH estaría a nivel hipofisario. Mientras

el esteroide dominante es P la respuesta hipofisaria a LHRH exógena decrece gradualmente para luego incrementarse con el aumento de la secreción de E. Se ha observado que durante estos cambios cíclicos en la sensibilidad hipofisaria a la LHRH provocados por un entorno dominante de P o E, la LHRH se libera tónicamente de manera similar a la de ratas ovx. Estos estudios indican que la acción directa de los esteroides ováricos a nivel hipofisario es el modo predominante de regulación de la secreción tónica de LH.

La administración de estrógenos reduce rápidamente la liberación de LH en ratas ovx debido principalmente a una disminución en la amplitud de los pulsos de LH. La administración de P sólo es efectiva en combinación con E. La acción sinérgica de ambos esteroides afirma el concepto de que los cambios en los niveles sanguíneos de E y P dentro del rango fisiológico producen los patrones de frecuencias y amplitud de los pulsos de LH característicos de cada día del ciclo.

El HMB aparece como componente neural esencial mediador del "feedback" negativo de los esteroides ováricos sobre la liberación de LH.

Se ha demostrado que el pico de LH preovulatorio es producido por una descarga abrupta de LHRH de los terminales nerviosos de la eminencia media (EM). La descarga de LH en la rata ocurre siempre durante un período crítico y discreto: entre las

1400-1600 horas del proestro. El "reloj neural" que determina el momento de la descarga parece situarse dentro de la unidad HMB-área preóptica media y está sujeto a modulación esteroidea y por fotoperíodos. El E es la señal ovárica primaria responsable del pico preovulatorio. En ratas ovx la administración de esta hormona induce a partir de la tarde del día siguiente, picos de LH. La acción de los estrógenos en la inducción del pico de LH parece ser en dos etapas. La primera (relacionada con inducción de la síntesis de LHRH) se inicia por el aumento lento en los niveles circulantes de estradiol durante diestro II. La segunda corresponde a la elevación rápida entre el diestro II tardío y la mañana del proestro y serviría como señal para la activación del disparo neural (21.00-24.00 hs. diestro II). La presencia continua de altos niveles de E posteriormente (luego de las 3.00 hs. del proestro) parece aumentar la respuesta hipofisaria a LHRH y los "pools" intracelulares liberables de LH.

La P es necesaria en el medio estrogénico para: a) contribuir a aumentar la síntesis o liberación de LHRH previa al pico de LH; b) amplificar la magnitud y duración del pico de LH y c) promover la secreción del pico de FSH. La P está también asociada con el disparo neural ya que se observa un aumento de F a las 14.00 hs. del proestro, antes de que comience la liberación de LH y que la P administrada previamente adelanta el pico de LH. Sin embargo, a mayores concentraciones la P

inhibe la ovulación suprimiendo la expresión de la señal neuronal de liberación diaria de LH, aparte de la inhibición local que ejerce sobre la secreción de estrógenos. Es probable que la P actúe normalmente de esta manera durante el ciclo entre la tarde del proestro y el estro y entre diestro I y II donde sus niveles están marcadamente elevados (185).

3.2 Regulación de la Secreción de Prolactina

La secreción de Prl por la hipófisis de los mamíferos (células lactotropas), contrariamente a lo que sucede con otras hormonas hipofisarias, se encuentra bajo la influencia predominantemente inhibitoria del sistema nervioso central. Esta atenuación de la secreción de la hormona se ejerce mediante el flujo constante de dopamina proveniente de las neuronas túberoinfundibulares del hipotálamo (175). El rol inhibitorio dopaminérgico en mamíferos es el sistema de control dominante de la secreción de Prl. Sin embargo existen asimismo otros sistemas de control, estimulatorios e inhibitorios.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es asimismo otro factor hipotalámico inhibitorio liberado a la sangre portal, aunque su efecto es de menor magnitud que el de la dopamina. La Prl atenúa su propia secreción a través de mecanismos dopaminérgicos, constituyendo un efecto de feedback corto. Ha sido sugerida

una inhibición de la secreción de Prl por acción de la hormona sobre la misma célula prolactínica.

Se han descripto numerosos factores estimulatorios de la liberación de Prl. El sistema serotoninérgico es particularmente importante por su relación con la liberación de Prl inducida por el estímulo de la lactación.

La TRH (hormona liberadora de tirotrófina) es un triptérido hipotalámico que también se comporta como factor liberador de Prl. Existen dos componentes para la liberación de Prl, uno de los cuales es liberado rápidamente luego de su síntesis y otro de bajo turnover. Se ha demostrado que la TRH actúa liberando este último pool de Prl y aparentemente están involucrados diferentes tipos celulares. Un tipo celular no es sensible a TRH y libera la Prl recientemente sintetizada a gran velocidad. La segunda sub-población de lactótrofos responde a la TRH con la liberación de Prl almacenada anteriormente (pool de bajo turnover) (321). El mecanismo de acción de la TRH involucra, entre otros eventos bioquímicos, el aumento del contenido del Ca^{++} intracelular y aparentemente como consecuencia de ello, se produce un aumento de AMPc (186). Además de inducir la rápida liberación de Prl, la TRH estimula más lentamente la síntesis de la hormona, a través de la inducción de la acumulación del ARNm correspondiente (58). Durante la lactación y durante el pico de Prl del proestro se produce un aumento de la sensibilidad hipofisaria al estímulo de la TRH, sugiriendo

un rol de la TRH como estimulante fisiológico. Por otro lado, se ha demostrado un aumento en la liberación del tripéptido durante el proestro y durante la lactación (325). Sin embargo este es un tema aún sujeto a grandes controversias (323, 324).

Los estrógenos, específicamente el 17β estradiol, son importantes factores moduladores del control de la secreción de Prl. Este efecto tiene lugar a nivel hipofisario e hipotalámico (175) y produce un aumento de la secreción de la hormona. La acción estrogénica a nivel hipofisario involucra el aumento de la biosíntesis de Prl (326, 327) y se ha descrito la acumulación del ARN mensajero de la Prl inducido por E (328). Se ha demostrado que el E regula la expresión del gen de la Prl a nivel de su transcripción por un mecanismo independiente de síntesis proteica (329, 330). Por otro lado el tratamiento con E disminuye la sensibilidad hipofisaria a la dopamina mientras que aumenta la capacidad de respuesta a la TRH (331).

Los estrógenos son, por lo tanto, responsables de los aumentos de Prl circulante detectados en mujeres durante la fase folicular y durante el embarazo.

Los péptidos opioides (encefalinas, β endorfina, etc.) estimulan la liberación de Prl, a través de una atenuación de la inhibición dopaminérgica, a nivel supraneurosecretorio, aunque se ha postulado también una acción de los opioides a nivel hipofisario. Estos péptidos serían los responsables del tono

prolactínico normal. El efecto de los estrógenos a nivel hipotalámico se manifiesta a través de una disminución de la dopamina liberada a la sangre portal y se ejerce al menos en parte a través de un bloqueo de la acción de los péptidos opioides (175).

Por otro lado la progesterona (175), los glucocorticoides y la hormona tiroidea (58) actúan inhibiendo la secreción de prol.

OBJETIVO DE LA PRESENTE INVESTIGACION

Este trabajo intenta dilucidar algunos de los mecanismos moleculares que intervienen en la compleja red de señales bioquímicas que determinan la fisiología del sistema reproductivo de la rata hembra.

Se estudiará la acción de dos hormonas peptídicas: A) insulina y B) prolactina.

A) En el estudio de la acción de la insulina se emplearán dos estrategias experimentales: a) estudios con animales diabéticos por estreptozotocina. Mediante este modelo se intentará explicar algunas de las alteraciones bioquímicas responsables de las fallas reproductivas asociadas al estado diabético. b) Otro enfoque comprende estudios "in vitro" acerca del papel de la Ins en el normal funcionamiento de la célula luteal.

B) Se evaluará la acción de la Prl como hormona reguladora de la función luteal. Los modelos experimentales a utilizar serán ratas hiper o hipoprolactinémicas (obtenidas por administración de drogas antagonistas o agonistas dopaminérgicos) e incubaciones de células luteales con Prl para el estudio de la acción directa de esta hormona sobre la esteroidogénesis luteal.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O SQUIMICOS

(^{125}I)-INA, [1,2,6,7- ^3H (N)] progesterona (98,3 Ci/mmol), [2,8- ^3H] adenosina - 3',5'- fosfato cíclico (^3H -AMPc) (34,6 Ci/mmol), [8- ^3H] guanosina -3',5'-fosfato cíclico (^3H -GMPc) (17,2 Ci/mmol), 17- β (2-4-6-7-(^3H)) - estradiol, (98 Ci/mmol) fueron obtenidos de New England Nuclear(Boston, Mass., USA). La pureza de los esteroides radiactivos, controlada por cromatografía en capa delgada, fue siempre mayor del 98%.

Las soluciones de [^3H] -E se prepararon diluyendo en etanol absoluto.

Los esteroides no radiactivos, tris, BSA (fracción V), ADN, EDTA, sacarosa, DTT, PMSF, nucleótidos cíclicos no radiactivos, 5' nucleotidasa de veneno de serpiente (King Cobra), tripsina, fosfolipasa C, cicloheximida, actinomicina D, se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St Louis, Mo, USA).

LHRH de Peninsula Labs (San Carlos, CA, USA), MIX de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA), M 199 de Difco Laboratories (Detroit, Mich., USA), colagenasa tipo 4176 C LS II 49 A 087 (153 U/mg), la desoxi-ribonucleasa (DPFF 54 C 443, 2070 U/mg)

la ribonucleasa A (RAF 53 N523, 4800 U/mg) y el inhibidor de tripsina de brote de soja fueron de Worthington Biochemical Co (Freehold, N.Y. USA), Sepharosa-Concanavalina A y Sephadex G-75 de Pharmacia Fine Chemicals AB (Uppsala, Sweden). DEAE-celulosa (DE-52) Whatman (England) AG₁-X₄ y A6₃-X₄ de Bio Rad (Laboratories Richmond, Calif., USA). La lactoperoxidasa (grado B) y el Dextrano (T-80) son de Calbiochem. El Carbon (Norit A) de Amend Drug Chem Co.

La PMSG (Eleagol) y hCG (Endocorion), gentilmente donadas por el Dr. E. Passerón, y la TRH (Trelea) son de Elea (Buenos Aires, Argentina). La STR (lote N° 60140) ha sido donada por Laboratorios Upjohn (Kalamazoo, Mich., USA). La Ins-zinc-protamina fue de Eli Lilly Co. (Buenos Aires, Argentina). La aminoglutetimida (Elipten) de Ciba-Geigy (Buenos Aires, Argentina).

La hCG, hLH y oPrl fueron obtenidos del NIH. La hGH fue preparada y gentilmente provista por el Dr. J.M. Dellacha (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina). El EGF fue gentilmente provisto por la Dra. M.T. Téllez Iñón (Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y biología Molecular, Buenos Aires, Argentina). La Ins porcina (altamente purificada, 615-1082 B-108-I, 26,2 U/mg) fue provista por Eli Lilly Co. (Indianápolis, IN, USA).

El etanol absoluto y el eter etílico grado para análisis fueron de Merck (Argentina). Dioxano y Tolueno de Sintorgan (Argentina). Los demás compuestos químicos utilizados fueron de grado analítico.

A. ANIMALES Y TRATAMIENTOS

A.1 Animales

Se utilizaron ratas hembra (*Rattus norvegicus albinus*) variedad Wistar provenientes del criadero del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Los animales fueron mantenidos con períodos de luz artificial de 14 horas (de 6 a 20 hs.) y con temperatura controlada alrededor de los 23^o C. Recibieron una dieta balanceada (Purina) y agua "ad libitum".

A.2 Obtención de ratas superovuladas

Se indujo el estado de pseudopreñez en ratas prepúberes (25 días) o adultas mediante la inyección de PMSG (25 U.I./rata SC), seguida a las 48 hs de una dosis de hCG (50 U.I./rata SC). Los animales fueron utilizados 8 días después de la última inyección. La evaluación del estado de pseudopreñez se realizó por inspección visual de los ovarios en el momento del sacrificio y también por microscopía óptica (ver más adelante).

A.3 Ovariectomía

La ovariectomía se realizó por vía dorsal con anestesia etérea.

A.4 Tratamiento con 17- β estradiol

Se preparó la solución de benzoato de estradiol en aceite vegetal (de maíz) a una concentración de 100 ug/ml. Se administraron dosis de 10 ug/rata SC durante los días indicados en cada experimento.

A.5 Inducción de la diabetes por estreptozotocina (STR)

Se utilizaron ratas hembra de 60 días de edad (150-200 gr de peso). En algunos casos los animales fueron ovariectomizados 48 hs. antes de la inyección de STR. Las ratas fueron separadas en tres grupos experimentales:

Grupo C (control): Se les administró por vía endovenosa el vehículo correspondiente.

Grupo D (diabéticas): Se les administró una dosis de STR por la vena caudal (65 mg/kg peso i.v.). La droga se preparó en solución salina acidificada con unas gotas de ácido cítrico 0,025 M hasta ajustar el pH a 4,5, en una concentración de 32 mg/ml. Dicha droga destruye selectivamente las células beta del páncreas (130).

Grupo I (diabéticas inyectadas con insulina): Se indujo al estado diabético de forma idéntica al Grupo D. A los 15 días de la inyección de STR, se inició el tratamiento con Ins-Zn-protamina bovina. Se administraron 2 U.I./rata SC diariamente durante 15 días.

Los animales se sacrificaron 30 días después de la inyección de STR por decapitación.

A.6 Evaluación del estado diabético

Tres días después de la inyección de STR se midió la glucosa en sangre por medio de tiras reactivas Destrotix, y en orina utilizando tiras reactivas Diastix.

Los criterios utilizados para determinar el estado diabético fueron:

Hiperglucemia: En los diabéticos los valores de glucosa oscilaron entre 300-390 mg/100 ml de sangre. Los valores de los controles fueron de 90 mg/100 ml.

Glucosuria: En los diabéticos los valores de glucosa fueron mayores de 10 g/100 ml de orina.

Poliuria: El volumen urinario osciló entre 80-100 ml en 24 hs. Los valores de los controles no excedieron los 15 ml/24 hs.

También se observó polidipsia, disminución del crecimiento, hipertrofia visceral y atrofia cutánea.

En el grupo I se detectó una relativa normalización de la glucemia. También se observó un aumento del peso corporal, disminución de la poliuria y polidipsia, regresión de la hipertrofia visceral y de la atrofia cutánea.

A.7 Obtención de estados hiper e hipoprolactinémicos

Se utilizaron ratas prepúberes superovuladas. El tratamiento se comenzó un día después de la inyección de hCG. Se las dividió en 4 grupos y se les administraron las drogas en dos dosis diarias (a las 9.00 y 17.00 hs).

Grupo C (control): Se administraron dos inyecciones diarias de solución fisiológica por día.

Grupo Prl (tratados con Prl): Se utilizó o-Prl (1 mg/kg peso/día). La o-Prl se disolvió en solución fisiológica previamente ajustada con NaOH 0,1 N a pH 9.

Grupo S (tratados con Sulpiride): La Sulpiride, antagonista dopaminérgico utilizado para producir hiperprolactinemia (131) se obtuvo diluyendo ampollas comerciales de Vipral(Roemmers, Buenos Aires, Argentina) con solución fisiológica, y se administró en una dosis de 30 mg/kg peso/día.

Grupo B (tratados con Bromocriptina (Br)): La Br, agonista dopaminérgico que inhibe la liberación hipofisaria de Prl (132), se preparó disolviendo iguales cantidades de Br y ácido tartárico en etanol absoluto -solución fisiológica (30:70 vol/vol)- administrándose 3 mg/kg peso/día.

Los tratamientos se extendieron durante 7 días y los animales fueron sacrificados 2 hs después de la última inyección.

A.8 Test de LHRH

Este test se realizó en animales ovariectomizados de los grupos C, D e I, y en estos mismos grupos de animales tratados con Eb (10 ug/rata SC), 48 y 24 hs antes del experimento. Los animales se anestesiaron con embutal en una dosis de 30 mg/kg peso intraperitoneal. Se inyectó por la yugular 100ng LHRH/ 0,25 kg peso. Se tomó una muestra de sangre por vía yugular a tiempo 0 y a los 10 minutos de inyectado el LHRH. Se midió la LH sérica por radioinmunoensayo y por bioensayo.

A.9 Test de TRH

Se realizó en los animales de los grupos C, D e I. Todos los animales se inyectaron con 10 ug/rata de Eb, 48 y 24 hs antes del experimento. A la mitad de los animales de cada grupo se inyectó 4 ug/kg peso intraperitoneal de TRH disuelto en solución salina. A los 15 min se decapitaron los animales y se obtuvo el suero con el objeto de medir la Prl por radioinmunoensayo. También se estudiaron grupos control sin tratamiento con benzoato de estradiol.

A.10 Obtención de hipófisis e hipotálamo

Se disecaron las hipófisis anteriores. Los fragmentos hipotalámicos se tomaron desde 1 mm frente al quiasma óptico, hasta el borde posterior del hipotálamo; lateralmente desde el surco hipotalámico hasta 2 mm de profundidad.

A.11 Determinación de los distintos estadios del ciclo estral

Se determinaron mediante la observación de extendidos vaginales realizados diariamente. La observación fue directa (sin coloración), utilizando un microscopio biocular.

B. CELULAS LUTEALES

B.1 Aislamiento de células luteales

Para el aislamiento de células luteales se utilizó el procedimiento descrito por Conti y col. (133). Se extrajeron los ovarios y se resuspendieron en Medio 199 frío, conteniendo BSA al 0,1%. De 12 a 16 ovarios fueron finamente cortados, transferidos a un tubo de plástico de 50 ml y lavados 3 veces para remover los eritrocitos. El tejido se resuspendió en Medio 199 (1 ml/ovario), conteniendo 0,1% BSA y 2 mg de colagenasa/ml. Los tubos fueron incubados a 37° C, durante 30 minutos, bajo atmósfera de carbógeno (95% O₂ -5% CO₂). Luego de la incubación y previa decantación, se separó el sobrenadante con una jeringa plástica con tubo de polietileno. La suspensión celular se filtró a través de malla Nitex y el sedimento remanente fue resuspendido en 10 ml de Medio 199 aspirándolo 5 veces con la jeringa. Este paso fue repetido 4 veces. Los sobrenadantes combinados fueron centrifugados a 250 x g, durante 5 minutos, a 4° C. Las células fueron resuspendidas en Medio 199, y nuevamente centrifugadas. Finalmente fueron resuspendidas en la proporción de 1-2x 10⁶ células/ml. Se utilizó una cámara de conteo Levy ultraplana

para contar las células, una vez teñidas con azul de metileno. Se evaluó la viabilidad de las células con azul tripán, resultando ser siempre mayor del 90%. La efectividad del tratamiento con PMSG/hCG se verificó al obtenerse un rendimiento aproximado de 99% de células luteales en el preparado.

3.2 Incubación de células luteales aisladas

Las células obtenidas fueron incubadas por triplicado en un volumen final de 1-2 ml de Medio 199 ($1-2 \times 10^6$ células), con MLX 0,1 mM y suplementado con las hormonas a estudiar. La incubación se realizó durante 3 hs a 37° C, en un incubador Dubnoff bajo atmósfera de carbógeno y con agitación constante.

Finalizada la incubación, se centrifugó a 700 x g durante 5 minutos y se midió la progesterona producida en el sobrenadante. Para las determinaciones de AMPc total antes de centrifugar, se tomó 0,5 ml del medio de incubación. Las alícuotas se calentaron a 100° C durante 15 minutos y se guardaron a -20° C.

En algunos casos se realizaron curvas de estimulación en presencia de: aminóglutetimida (1mM), inhibidor de la enzima de ruptura de la cadena lateral del colesterol; cicloheximida (1ug/ml), inhibidor de síntesis proteica o actinomicina D (10 ug/ml), inhibidor de la síntesis de RNA.

B.3 Fraccionamiento subcelular de células luteales

En este caso, las células obtenidas por tratamiento con colagenasa fueron homogeneizadas en buffer fosfato salino (PBS) de Dulbecco: NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, CaCl₂ 0,9 mM y MgCl₂ 0,5 mM, pH 7,4.

El homogenato obtenido se centrifugó a 2-4° C en una centrífuga International B-20 a 800 xg durante 15 minutos; el sobrenadante se separó y se centrifugó a 12.000 xg durante 30 minutos y finalmente el último sobrenadante se centrifugó a 105.000 xg durante 60 minutos en una ultracentrífuga Beckman LS-50. Los diversos pellets fueron resuspendidos en PBS, y las suspensiones resultantes se utilizaron para la determinación de la unión de hormonas proteicas. Para evaluar la unión al sobrenadante de 105.000 xg (citosol) se realizó una precipitación con 12,5% de polietilenglicol.

C. OBTENCION DE HORMONAS RADIATIVAS

C.1 Marcación de hormonas proteicas (LH, hCG, FSH, r-Prl, o-Prl)

Se utilizó el método de lactoperoxidasa descrito por Thorell y Johansson (134) y modificado en nuestro laboratorio. Se utilizó ¹²⁵I- libre de portador (New England Nuclear, NEZ-033-A) como trazador.

Se agregaron en tubos Eppendorff los siguientes reactivos:

- 1) Buffer fosfato 0,5 M, pH 7,4 (10 ul)
- 2) ^{125}I Na, en NaOH 0,1 N, 50 uCi (5 ul)
- 3) Hormona a marcar, 10 ug (10 ul) (en buffer fosfato 0,5 M, pH 7,4). La Prl se disuelve a pH 8.
- 4) Lactoperoxidasa 2,7 mg/ml en buffer fosfato 0,5 M, pH 7,4 (10 ul)
- 5) H_2O_2 (Atanor, 300 volúmenes, diluida 1:10.000 en agua bidestilada) (10 ul)

Después de agitar vigorosamente durante 2 minutos, la mezcla de iodinación fue diluida con 200 ul de buffer fosfato 0,05 M, y transferida a una columna de Sephadex G-75 previamente equilibrada con el buffer de elución utilizado para los ensayos de hormonas proteicas (fosfato de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 0,1 M, ázida sódica 0,05%, BSA 0,2% pH 7,4).

Una vez separado el pico hormonal del yodo libre, las fracciones correspondientes a las hormonas se controlaron mediante ensayos de unión a receptores de tejidos efectores. Las hormonas iodinadas se fraccionaron en alícuotas de 0,2 ml que se guardaron congeladas a -70°C hasta su utilización. Las actividades específicas obtenidas fueron usualmente de 25-50 uCi/ug. La r-Prl ó o-Prl se purificaron antes de utilizarlas mediante una cromatografía en columna de poliacrilamida agarosa (ACA 54, Ultrogel), como fue descrito por Charreau y col. (135), para separar el monómero de los agre-

gados y del yodo liberado durante el congelamiento.

C.2 Marcación de insulina

Se utilizó el método ya descrito de marcación con la ~~cat~~peroxidasa, de acuerdo a Thorell y Johansson (134), con las siguientes modificaciones:

La reacción se detuvo por agregado de 200 ul de BSA 2% y 20 ug de NaHSO_3 en buffer fosfato 0,05 M pH 7,0. La mezcla se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada con buffer fosfato 50 mM, pH 7,5 con BSA 0,2% de 100 mM NaCl.

Las porciones eluidas se recolectaron en tubos de plástico conteniendo una gota de BSA 20 mg/ml (para impedir que la Ins se pegue a los tubos). El pico correspondiente a la hormona marcada se dividió en alícuotas y se guardó a -70°C .

Usualmente, se obtuvo una actividad específica de 100 uCi/ug.

C.3 Determinación de máxima capacidad de unión (MCU)

Para determinar la MCU de la ^{125}I -Ins, se utilizó hígado de rata (como tejido control). Se homogeneizó 3 g de hígado en FBS (1:4 masa/vol). Se centrifugó a 10.000 xg 20 min, el sobrenadante se recentrifugó a 105.000 xg durante 1 hora a 4°C , y se resuspendió el pellet de esta última centrfu-

gación en PBS (1:2 masa/vol). Se incubaron distintas alícuotas de la suspensión de microsomas (50-800 ug de proteína), 30 minutos a 20° C en presencia de 100.000 cpm de ¹²⁵I-Ins, y una serie paralela de tubos en presencia de Ins fría para la determinación de la unión específica (ver D).

Se construyó un gráfico de 1/(radiactividad específica unida), versus 1/(cantidad de proteína agregada). De la ordenada al origen, se calculó la fracción de ¹²⁵I-Ins que se uniría a una concentración infinita de receptor (MCU) (136).

C.4 Cálculo de la actividad específica por autodesplazamiento

Se utilizó la técnica descrita por Galvo y col. (136). Se realizaron dos series de experimentos de unión. En la primera (saturación) se equilibraron de 1 a 3 x 10⁶ células luteales, con diferentes concentraciones de Ins marcada (entre 10.000 - 10⁶ cpm) con buffer PBS durante 30 minutos a 20° C, determinándose también la unión específica (ver D).

En la segunda serie (competencia), se incubaron de 1 a 3 x 10⁶ células luteales con 100.000 cpm de ¹²⁵I-Ins, y diferentes concentraciones de Ins fría (1-5000 ng/tubo) en las mismas condiciones experimentales descritas. Teniendo en cuenta los valores de MCU obtenidos y asumiendo que la Ins fría y radiactiva se comportan de la misma manera frente al receptor, se ~~graficaron~~ graficaron para ambos experimentos (saturación y competencia) las curvas de libre/unido (F/B) versus cpm

agregadas y ng de Ins fría respectivamente. Para iguales valores de F/B, se obtiene el dato correspondiente a la actividad específica de la ^{125}I -Ins expresado en cpm/ng.

La actividad específica de la ^{125}I -Ins calculada por este método fue de aproximadamente 90 uCi/ug.

D. DETERMINACION DE RECEPTORES DE HORMONAS PROTEICAS

D.1 Receptores de LH/hCG en ovario y células luteales aisladas

Para la medición de los receptores de LH/hCG en ovario, se utilizaron ratas hembras en diestro. Una vez extraídos los ovarios se homogeneizaron en PBS (1:6 P/V) en un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA-WERK). El homogenato filtrado por Nitex se centrifugó a 12.000 xg. El precipitado obtenido se resuspendió en igual volumen de PBS y fue utilizado para el ensayo de unión de LH/hCG. Para esto se incubaron 50 ul (500 ug de proteína) de fracción de membrana, durante 2 horas a 34° C, con distintas concentraciones de ^{125}I -hCG (30.000-300.000 cpm) en un volumen de incubación de 250 ul, serie A. Una serie paralela de tubos (serie B) fue incubada con un exceso (5 ug) de hCG no radiactiva, para determinación de la unión no específica.

Finalizada la incubación, se agregaron 2 ml de PBS, centrifugando los tubos a 2000 xg, durante 20 minutos. El precipitado se lavó dos veces con 2 ml de buffer. Descartado

el sobrenadante se contó la radiactividad unida en el precipitado, en un contador Gamma Beckman modelo 4000 con una eficiencia del 66%. La unión específica se calculó restando al promedio de cpm de los tubos sin hormona fría (serie A) el promedio de cpm de los tubos correspondientes con hormona fría (serie B):

$$\text{cpm}_A - \text{cpm}_B = \text{cpm}_{\text{esp}}$$

y la desviación standard (DS):

$$\text{DS}_{\text{esp}} = \text{DS}_A^2 + \text{DS}_B^2$$

Cuando se utilizaron hembras superovuladas, los receptores para LH/hCG se determinaron en forma directa en células luteales aisladas por tratamiento con colagenasa. Se incubaron 3×10^6 células con distintas concentraciones de ^{125}I - hCG (30.000-300.000 cpm) en un volumen final de 250 ul, durante 3 horas a 34°C . La unión inespecífica se determinó de la manera antes descrita. La incubación se detuvo en la forma mencionada, determinándose la radiactividad en el precipitado.

La unión específica se expresó como fmoles de receptor/ 3×10^6 células.

D.2 Receptores para FSH y prolactina en ovario

La técnica utilizada fue similar a la descrita para la determinación de los receptores para LH/hCG en fracción de membranas de ovario.

En la determinación de receptores para prolactina, la incubación se realizó a 20° C, durante 16 horas.

D3. Receptores de insulina en células luteales

La técnica utilizada fue similar a la descripta para la determinación de los receptores para LH/hCG en células luteales.

La incubación se realizó a 20° C durante 30 minutos en Medio 199. Se incubaron 10⁶ células luteales en presencia o ausencia de 5 ug de Ins fría (series A y B), con diferentes concentraciones de ¹²⁵I-Ins (10.000 - 10⁶ cpm). La reacción se detuvo por el agregado de 2 ml de Medio 199, centrifugando los tubos a 800 xg durante 20 minutos a 4° C.

En algunos casos fue necesario realizar una purificación previa de la ¹²⁵I-Ins mediante una columna de celulosa (1x2 cm).

D.4 Cálculos

La linealización de las curvas de unión, que permite determinar la constante de afinidad K_a , o de disociación K_d , y el número de sitios de unión (Q) se realizó por el método de Scatchard (137):

$$B/F = \frac{K_a Q}{K_a + B}$$

donde:

- B: Concentración de hormona unida específicamente al receptor.
- F: Concentración de hormona libre.
- Q: Concentración de sitios receptores.
- K_a : Constante de afinidad en el equilibrio.

E. DETERMINACION DE RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES

E.1 Medición de receptores citoplasmáticos y nucleares de Estradiol

Se utilizó un método de intercambio con el objeto de determinar los sitios totales de unión (138).

Se sacrificaron los animales 1 hora después de haber recibido una inyección de benzoato de estradiol (10 ug/rata sc) o vehículo. La inyección de Eb induce la "traslocación" de los receptores al núcleo de la célula. Se removió rápidamente el hipotálamo, la hipófisis o los ovarios, según el experimento (ver A.9).

Todos los fragmentos de tejido se recolectaron rápidamente en homogeneizadores en frío y se homogeneizaron

1 - 10 en buffer A (Tris -HCl 0,01 M, pH 7,4, EDTA 1,5 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 1 mM, sacarosa 0,25 M y molibdato de sodio 20 mM).

Se obtuvo un pellet nuclear crudo centrifugando el homogenato a 800 xg por 10 minutos a 4° C. Este pellet se resuspendió y el procedimiento se repitió dos veces. El sobrenadante inicial se centrifugó a 105.000 xg por 1 hora a 4° C, para obtener la fracción citosólica. Se realizó una extracción salina del pellet nuclear agregando buffer B (Buffer A con KCl 0,4 M, pH 7,4) para solubilizar los complejos estrógeno - receptor, unidos a los núcleos. Luego de una incubación de 50 minutos a 4° C, las muestras se centrifugaron 20 minutos a 10.000 xg. Los extractos sobrenadantes resultantes se usaron para medir sitios de unión estrogénicos nucleares. Previamente a la extracción salina, se tomaron alícuotas de la fracción nuclear cruda para evaluar el contenido de ADN por el método de Burton (139).

Se tomaron alícuotas del citosol para determinar el contenido proteico por el método de Lowry (140). Se incubaron alícuotas de 100 ul de la fracción citosólica o nuclear con ³H - E (0,5 - 15 mM) a 23° C por 16 horas, para asegurar el completo intercambio entre la hormona endógena y el ligando radiactivo. Se determinó la unión inespecífica, realizando incubaciones paralelas con E, 500 veces en exceso o dietilbestrol (DES), para cada concentración de hormona

radioactiva. Se separó el libre del unido, agregando 100 μ l de buffer DC (0,5 g/l dextrano y 5 g/l de carbón en buffer A) a 0 - 4° C por 10 minutos y centrifugando a 800xg por 10 minutos. Se tomaron alícuotas de los sobrenadantes para medir la radioactividad unida en un contador de centelleo líquido Beckman LS - 100 C. Se realizó el análisis de Scatchard (137), para determinar la K_d y número de sitios de unión.

F. ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA

F.1 incubación de células luteales con Ins. Preparación de las fracciones particulada y citosólica

Se aislaron células luteales de ovarios de ratas pre-rúberes superovuladas de la forma previamente descrita. Se incubaron 3×10^6 células/ml en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de Ins (0,002 - 200 nM). Las incubaciones se realizaron durante diferentes tiempos y se detuvo la incubación por transferencia de los tubos a baño de hielo y agregado de IMSF 0,1 mM.

Luego de la incubación se lavó dos veces las células con buffer Tris-HCl 25 mM, sacarosa 0,25 M, IMSF 0,1 mM, pH 7,4 y posteriormente se homogeneizaron en un homogeneizador Ultraturrax (IKA-WERK) en el mismo buffer sin sacarosa (buffer C), con tres pulsos de 5 segundos. El homogenato se filtró a través de malla Nitex y se centrifugó a 800 x g durante 10 minutos a 4° C. La fracción sobrenadante se centrifugó en

una Ultracentrífuga Beckman LS-50 a 105.000 x g durante 60 minutos a 4° C. Se separó la fracción sobrenadante (citosol) y el pellet fue resuspendido en una cantidad apropiada de buffer de homogeneización (fracción particulada). El mismo fraccionamiento subcelular se realizó en células luteales de ratas de los grupos C, D e I superovuladas, aisladas también por tratamiento con colagenasa.

F.2 Purificación de la PDE de células luteales

La fracción citosólica de células luteales tratadas o no con Ins se purificó parcialmente a través de una columna de intercambio iónico de DEAE-celulosa (0,5 x 4,5 cm) equilibrada con buffer C. Se sembró 1 ml de citosol (2 mg/ml proteína), se lavó con 2,5 ml de buffer C y se eluyó con un gradiente discontinuo de NaCl (0,05 a 0,5 M) en el mismo buffer. Se recolectaron fracciones de 0,5 ml (4 fracciones por concentración de NaCl). La actividad de PDE se determinó en cada fracción en alícuotas de 30 ul con AMPc (Fig. A) o GMFc (Fig. B) como sustrato.

F.3 Determinación de la actividad de PDE

La actividad enzimática fue determinada mediante el método descrito por Thompson y Appleman (141) con las modificaciones introducidas por Londesborough (142). La actividad de PDE-AMPc y PDE-GMFc fue medida en mezclas de reacción que

contenían: buffer Tris-HCl 40 mM, pH 8,0, MgCl₂ 5 mM, [³H]- AMPc o [³P] - GMpc 1 uM (600 cpm/pmol) y preparación enzimática en un volumen final de 0,1 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30° C durante 5 a 20 minutos.

La reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 0,5-1 minuto. Luego se incubó nuevamente con el agregado de 0,040 ml de 5' nucleotidasa de veneno de serpiente (Pinn Cobra) 2mg/ml en buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Esta segunda reacción se detuvo por agregado de 0,050 ml de una solución conteniendo EDTA 50 mM y adenosina o guanosina 5 mM.

A continuación se agregó 1,0 ml de una suspensión de resina AG₁ - X₄ (200 - 400 mesh) al 30% V/V en agua y etanol 30% cuando el AMPc fue sustrato o 0,5 ml de una suspensión de resina AG₃ - X₄ (200 - 400 mesh) al 50% V/V en agua cuando el GMpc fue sustrato (142). Después de sedimentar se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y se contó la radioactividad en una mezcla que contenía 0,4% (P/V) de Omnifluor y 30% (V/V) de Tritón en tolueno.

G. DETERMINACIONES HORMONALES

G.1 Determinación de Progesterona (P)

El dosaje de P se realizó por radioinmunoensayo (143) mediante la utilización de un suero anti-progesterona, obtenido por inmunización activa de conejos, a intervalos de dos semanas, con un conjugado progesterona: BSA, preparado por

acoplamiento de la carboximetil-oxima de la progesterona a BSA. El suero anti-T se utilizó en una dilución apropiada (1:4000) para ligar el 50% de la [³H]-P de referencia (aproximadamente 10.000 cpm).

El rango de utilidad fue de 12,5 a 800 pg de P en un volumen final de 0,5 ml. Previa incubación durante 16 hs, a 4° C, la hormona libre se separó por el agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón-dextrano (0,5 - 0,05% P/V) en el buffer de ensayo (Na₂HPO₄·2H₂O 0,04 M; NaH₂PO₄·H₂O 0,03 M; azida sódica 0,015 M; NaCl 0,15 M; EDTA 10 mM y gelatina 0,1% (1:7) y posterior centrifugación. El sobrenadante completo fue transferido a viales de conteo, a los que se les agregó 0,2 ml de dioxano y líquido centelleante (0,5% PPO y 0,05% POPOP en tolueno). La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS-100 C.

1.2 Progesterona sérica

Una vez obtenida la sangre de los animales, se les permitió coagular y se separó el suero para la determinación hormonal. Una alícuota de este suero fue extraída dos veces con 5 ml de éter etílico. El residuo evaporado de los extractos etéreos, fue resuspendido en 0,5 ml de buffer de ensayo y una alícuota apropiada fue utilizada para la determinación del contenido de progesterona.

G.3 Progesterona del medio de incubación

De los sobrenadantes de las incubaciones, guardados a -20° C se tomó una alícuota adecuada que, sin extracción previa, se utilizó para la determinación de progesterona previa dilución 1:25 en buffer de RIA.

G.4 Determinación de AMPc

Para el dosaje de este nucleótido cíclico, se utilizó la técnica de Brown y col.(144)

G.4.1 Aislamiento de la proteína quinasa de adrenal bovina

Luego de la separación de la médula, las cortezas de glándulas adrenales bovinas, fueron homogeneizadas, utilizando un homogeneizador tipo Polytron (Brinkmann), a 0° C, con 1,5 volúmenes de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, conteniendo sacarosa 0,25 M, KCl 25 mM y $MgCl_2$ 5 mM. Este homogenato se centrifugó a 2000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se recentrifugó a 5000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante de esta última centrifugación se guardó en alícuotas de 0,5 ml a -20° C. Esta preparación fue descongelada y diluida con el buffer de ensayo (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 conteniendo teofilina 8 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM). Este buffer se utilizó en todos los pasos posteriores.

G.4.2 Ensayo para la determinación de AMPc

Cada tubo de ensayo contenía 50 ul de una dilución apropiada de enzima, 100 ul de una cantidad conocida de AMPc (entre 0,039 y 20 pmoles) y 50 ul de ^3H -AMPc (aproximadamente 3000 cpm). La cantidad de enzima era tal que ligaba aproximadamente el 40% del AMPc de referencia.

La incubación se realizó a 4° C durante 90 minutos. Finalizada la incubación, el AMPc libre se separó por el agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón-BSA (500 mg de carbón: 100 mg de BSA, para 10 ml de buffer de ensayo).

La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS-100 C, utilizando tolueno centelleante, conteniendo 30% V/V de Tritón X-100.

G.5 Radioinmunoensayos de hormonas proteicas (Prl, LH, FSH)

En todos los casos se utilizó el RIA por doble anticuerpo (145). Las muestras fueron evaluadas por duplicado en alícuotas que oscilaban entre 10 y 150 ul de suero de rata y fueron cuantificadas usando los reactivos provistos por el NIAMDD (N.I.H.-USA).

Se utilizaron los mismos protocolos para las tres hormonas. Se agregó el primer anticuerpo a los sueros preparados y se incubó 24 hs. a 4° C. Se agregó luego la hormona trazadora y el tercer día el segundo anticuerpo. Luego de 48 a 72 hs. (a 4° C) se separó por centrifugación la

hormona libre de la unida. Se aspiró el sobrenadante y se contó la radiactividad en los precipitados correspondientes a los complejos hormona-anticuerpo en un contador gamma automático Beckman modelo 4000.

Prl: El primer antisuero contra r-Prl fue obtenido en conejos (NIAMDD anti-rat prolactin serum 4-7). Se diluyó en buffer fosfosalino (fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M, merthio-late 0,01%, pH 7,4) que contenía EDTA 0,05 M con 2% de suero de conejo normal al rango óptimo de trabajo (entre 1:5000 y 1:2500). El standard de referencia fue Prl de rata (NIAMDD rat 1-2) con una actividad biológica de 30 UI/mg. Los patrones (de 0,0396 a 20 ng por tubo) se prepararon en buffer fosfosalino con 1% de albúmina de huevo. El segundo antisuero fue de oveja contra globulina de conejo.

LH: El ensayo y buffers utilizados fueron los mismos que para Prl con las siguientes modificaciones. Se usó el método heterólogo desarrollado por Niswender y col. (146) La hormona trazadora fue en este caso LH purificada, aislada de hipófisis ovina. Como primer antisuero se utilizó el obtenido por Niswender y col. inmunizando conejos con LH ovina emulsionada en adyuvante Freund completo. Dicho antisuero reacciona no sólo con la LH ovina sino también con la de numerosas especies, incluyendo la rata. Las diluciones de trabajo fueron 1:25000. Como preparación de referencia se utilizó la LH purificada de hipófisis de rata (NIAMDD Rat

LH RP1), con mínimos contaminantes de FSH y TSH. La curva patrón se extendió de 7,8 a 100 ng/tubo.

FSH: Las variantes en este caso son las siguientes: La hormona trazadora fue NIAMDD-Rat-FSH-I-S. El primer antisuero fue obtenido en conejos contra FSH purificado de rata (NIAMDD-Anti-rat FSH serum-10), siendo la dilución de trabajo de 1:2000 a 1:2500. El standard de referencia fue FSH purificado de rata (NIAMDD-Rat-FSH-RP1) con casi nula contaminación de LH y TSH y la curva patrón se extendía de 7,8 a 1000 ng/tubo.

6.6 Bioensayo de la LH sérica

El bioensayo se basa en la producción de testosterona estimulada por LH en células de Leydig (147). Estas células fueron preparadas a partir de testículos de ratas adultas por tratamiento con colagenasa y resuspensión en Medio 199 con 0,5% BSA y MIX 0,1 mM (148). Se incubó una alícuota (0,1 ml) de la suspensión celular ($1-2 \times 10^6$ células) con varias concentraciones de LH (0,08-3 mU) en un volumen final de 1 ml. Las incubaciones se realizaron a 34° C con agitación a 150 ciclos/minuto bajo una atmósfera de 95% O_2 - 5% CO_2 durante 3 horas. Para el bioensayo de las muestras de suero se realizaron diluciones apropiadas que se incubaron en las condiciones descriptas. Los tubos de incuba

ción se centrifugaron a 1000 x g durante 15 minutos y se tomaron alícuotas del sobrenadante que se diluyeron 1:25 con PBS para el RIA de testosterona (149). La producción de testosterona de las muestras de suero se comparó con la de los tubos de standar de LH mediante un programa de computadora de bioensayos paralelos (150). El standard de LH utilizado en el bioensayo fue gonadotrofina hipofisaria humana (LER 907) obtenida de la National Pituitary Agency. En este ensayo 1 mU de LER fue equivalente a 33 ng de RH1.

6.6.1 Extracción de la LH del suero de rata

Se extrajo la LH sérica de cada grupo experimental (C, D e I) con Sefarosa-Concanavalina A (147). Se agregó a 0,2 ml de las muestras de suero o bien a la LH standard utilizada para el bioensayo, alícuotas de 0,5 ml del gel (Sefarosa-Concanavalina A 30 a 40% en PBS). Los tubos se agitaron durante 2 horas a 22° C y luego se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 x g, descartándose los sobrenadantes. Para eluir la LH del gel de lectina se agregó 0,5 ml de α -metilmanósido 0,3 M y se agitaron nuevamente los tubos durante 2 horas. Se centrifugaron a 1200 x g durante 10 minutos y se realizó el bioensayo de LH a los sobrenadantes. La recuperación del procedimiento fue del 50%. No se hallaron diferencias significativas en la bioactividad entre las LH extraídas o no, por lo cual los experimentos se realizaron

midiendo la B-LH directamente de los sueros.

H. OTRCS METODCS.

Los resultados de los análisis de Scatchard fueron procesados mediante una computadora Hewlett-Packard modelo 9815A de mesa. Para resolver los cálculos de las Ka y Q de Gráficos de Scatchard para dos sitios se utilizó el programa ISIS 1512 BAS (152).

Los análisis estadísticos fueron realizados por medio del test de Dunnett (151).

Las mediciones de proteínas fueron hechas por la técnica de Lowry y col (140) empleando BSA como estandar.

Para determinar ADN se utilizó la técnica de Burton (139).

A. I N S U L I N A

INTRODUCCION

A.1 Estructura síntesis y secreción de Ins

La Ins, hormona proteica constituida por dos cadenas de aminoácidos (A y B) unidas a través de puentes disulfuro, se sintetiza en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas de los mamíferos. Junto con el glucagón, hormona peptídica secretada por las células α pancreáticas, ambas hormonas juegan un papel clave en el mecanismo homeostático de control de la concentración de glucosa sanguínea.

El producto inicial de la síntesis ribosomal de Ins, la proinsulina, consta de una sola cadena polipeptídica con unos 81 a 86 aminoácidos, según la especie estudiada. Contiene ambas cadenas, A y B, de la Ins; la cadena A constituye el extremo carboxilo terminal de la cadena de la proinsulina y la B es la del extremo amino terminal. Entre las cadenas A y B, existe la cadena de conexión C. La molécula de proinsulina contiene tres enlaces disulfuro cruzados en las mismas posiciones que en la insulina nativa. Su transformación en insulina parece ser efectuada por la acción de peptidasas del tejido de los islotes luego de lo cual se produce un empaquetamiento en las vesículas de Golgi donde tanto la Ins como el péptido C cristalizan con Zn^{++} en una disposición ordenada. El contenido de dichas

vesículas se libera por exocitosis a la sangre ante la recepción de señales desencadenadas por un incremento en el nivel de glucosa en sangre. El Ca^{++} desempeña un importante papel en la liberación de Ins.

La concentración normal de Ins en sangre es de 1 mM aproximadamente, elevándose 3 ó 4 veces luego de una ingesta rica en glúcidos (una hora o dos después de la comida, la concentración de glucosa desciende a niveles normales). La vida media de la Ins en sangre es de 3 a 4 minutos, por lo tanto, la liberación de Ins por el páncreas constituye una respuesta muy sensible a las fluctuaciones del nivel de glucosa sanguínea. La liberación de Ins también es estimulada por ciertos aminoácidos y factores específicos secretados por el estómago.

A.2 Acción de la Ins sobre sus tejidos efectores

Los tejidos blanco principales para la acción de la Ins son el hígado, corazón y músculo, donde la Ins no sólo actúa regulando el metabolismo de carbohidratos sino también de grasas y aminoácidos. En general, la Ins puede ser considerada como una hormona anabólica: estimula la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas e inhibe su degradación (153, 154). Por otra parte, la mayoría de las células de los mamíferos poseen receptores insulínicos que unen la hormona con alta afinidad, aunque se desconoce el significado funcional en muchos casos. Sin embargo, el requerimiento de Ins es indispensable para el crecimiento normal. Muchas células en cultivo necesitan dicha hormona en el

medio de incubación para su proliferación continua, ya sea mediante el agregado de suero o como suplemento en medios definidos.

La Ins ejerce sus efectos activando a nivel de la superficie celular los sistemas de transporte de iones y nutrientes (hexosas, aminoácidos, K^+ , PO_4^{\ominus} , etc.) y modulando enzimas intracelulares que forman parte de los caminos metabólicos afectados por la hormona (ej.: activación de la glucógeno sintetasa, piruvato deshidrogenasa, fosfodiesterasa). Estas son reacciones rápidas y a temperatura fisiológica. También se conocen efectos de la Ins a largo plazo sobre las velocidades de turnover enzimáticos que probablemente juegan un papel importante en la homeostasis metabólica a largo plazo.

A.3 Receptor de Ins

La Ins se une con alta afinidad y especificidad a receptores expuestos en la superficie externa de la membrana plasmática (155-157). La unión a estos receptores es rápida y reversible y la capacidad de análogos de Ins para competir con la Ins nativa por este sitio es directamente proporcional a su actividad biológica "in vitro". Sin embargo, las curvas de unión de la Ins a las células son inusuales (los gráficos de Scatchard respectivos son curvilíneos). Esto puede explicarse por la presencia de varias especies de receptores que exhiben afinidades muy diferentes para la Ins o bien por la existencia de una única población de sitios que muestra cooperatividad negativa (158).

Los receptores de Ins son glicoproteínas de membrana de un peso molecular aparente de 300.000. El tratamiento del receptor con neuraminidasa o β galactosidasa no afecta la unión de la Ins, aunque ambos tratamientos simultáneos impiden la unión. Los residuos de ácido siálico estarían involucrados en el funcionamiento del receptor (159, 160). Los estudios sobre estructura del receptor de Ins se han realizado mediante la marcación del receptor covalentemente con ^{125}I de alta actividad específica como para permitir su detección. Las subunidades marcadas se identifican por autoradiografía luego de una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Estos estudios demostraron que el receptor de Ins está compuesto de 4 subunidades diferentes. Contiene dos subunidades α idénticas y glicoproteicas de peso molecular 120 - 130.000, expuestas en la superficie externa de la membrana donde posibilita la unión de la Ins. Asimismo, posee dos subunidades β , de peso molecular 90 - 95.000 que también participan en la unión de las hormonas, aunque atraviesan la membrana exponiéndose a ambas superficies. La estructura del receptor es similar a la de las inmunoglobulinas. Resulta un complejo $\alpha_2 \beta_2$ unido por puentes disulfuro y capaz de ligar 2 moles de Ins por mol de receptor (161). Se ha sugerido la presencia de una subunidad δ (que no es una glicoproteína), de peso molecular 65.000. Esta subunidad interactuaría no covalentemente con la subunidad β en la superficie interna de la membrana (162, 163).

A.4 Mecanismo de acción

Es en cierto modo curioso que, pese a que la Ins ha sido tan estudiada, sobre todo debido a su relación la diabetes, no esté aún dilucidado su mecanismo de acción.

Aunque durante años han aparecido grandes cantidades de observaciones sugiriendo la existencia de un segundo mensajero para la Ins, ninguno ha sido capaz de explicar los variados efectos que ejerce la Ins en sus células blanco (164). Sin embargo, puede afirmarse que la Ins desencadena cambios en la fosforilación y en el estado de activación de una cantidad de enzimas regulatorias así como otras proteínas como por ejemplo: la fosfodiesterasa AMK dependiente (alta afinidad, enzima de membrana plasmática), el receptor de Ins, la hidroximetil glutaril Co-A reductasa, la piruvato deshidrogenasa, la glucógeno sintetasa, etc.

Cuando la Ins se une a su receptor en la superficie celular, los receptores inmediatamente se agrupan y migran a vesículas recubiertas ("coated pits"). Estas vesículas son áreas bien definidas de la membrana plasmática que están cubiertas con una proteína denominada clatrina. Una vez situados en estas vesículas, los receptores se internalizan a través de un proceso dependiente de energía (endocitosis); las vesículas luego pierden su cobertura de clatrina y aparentemente se asocian con estructuras del Golgi en la célula. En este momento habrá dos posibilidades: los receptores son destruidos por la

asociación con los lisosomas o bien reciclados a la membrana plasmática (165). La prolongada exposición de las células a la Ins provoca una disminución ~~meta~~ de los receptores de la membrana plasmática ("down regulation")(166). Este movimiento dinámico de los receptores desencadenado por la hormona podría ser una vía de señalización al interior celular (167).

Hay evidencias que sugieren que el proceso de internalización del receptor de Ins desencadena la activación de una fosfodiesterasa de vesículas densas dependiente de AMPc (168) e inicia la traslocación de carriers inactivos de glucosa presentes en un pool interno (169). Por otra parte, la activación del transporte de aminoácidos y de la fosfodiesterasa de membrana plasmática es independiente de estos eventos. La internalización, por lo tanto, actuaría como mediadora de ciertos mecanismos dependientes de Ins.

Por otra parte, ha sido sugerido que la Ins podría inducir la producción de un péptido que mediaría su acción (se comprobó la estimulación de fosfatasas de la glucógeno sintetasa y de la piruvato deshidrogenasa). Sin embargo, no se ha logrado hasta el momento su purificación a homogeneidad como para definir su estructura. Se ha propuesto la existencia de una proteasa específica asociada al receptor de Ins que produciría el mediador a través de un mecanismo que puede ser mimetizado por bajas concentraciones de tripsina. También ha sido sugerido que el mediador podría ser un fosfolípido. Sin embargo, no es claro cómo éste lograría la especificidad asociada a la

acción de Ins (167).

Se ha demostrado que la Ins es capaz de estimular la fosforilación de la subunidad β de su propio receptor (la actividad de quinasa está asociada con la misma subunidad β). Esta quinasa, que transfiere grupos fosfato a residuos de tirosina del sustrato proteico, también es capaz de fosforilar otros aceptores exógenos (angiotensina II, histonas, etc.)(170-174). Sin embargo, hay evidencia que sugieren que este mecanismo estaría mediando los efectos a largo plazo de Ins sobre el control del crecimiento celular, y no los efectos metabólicos rápidos (167).

Otra interesante hipótesis enunciada (175) sugiere que la unión de la Ins a su receptor en la membrana induce la activación de una quinasa asociada a la superficie interna de la membrana plasmática, que alteraría el estado de fosforilación de ciertas proteínas específicas. Houslay y col. han sugerido que la Ins regularía la actividad de quinasas de membranas dependientes o no de AMPc, a través de una proteína regulatoria de nucleótidos de guanina (168) que aún no ha sido identificada.

Habría, entonces, cuatro mecanismos principales mediante los cuales la Ins ejercería sus efectos intracelulares, aunque se desconoce aún si ellos tienen un origen común además del propio receptor.

Los mecanismos son:

i) La endocitosis del receptor de Ins y su procesamiento intracelular.

- ii) La actividad de tirosina-quinasa asociada con la subunidad β .
- iii) La activación de quinasa de membrana cuya actividad podría estar regulada por una proteína regulatoria de nucleótidos de guanina.
- iv) La liberación de un mediador peptídico.

A.5 Acción de Ins sobre tejidos gonadales

Las alteraciones bioquímicas responsables de la disfunción gonadal asociada al estado diabético no han sido aún completamente dilucidadas.

Los estudios de unión de Ins a glándulas endócrinas han demostrado la presencia de sitios receptores específicos para Ins en membranas testiculares, células de la granulosa y en hipófisis (176, 177, 178) de rata.

En hipófisis enteras de ratas macho, se ha demostrado que la incorporación de glucosa es estimulada por Ins "in vitro" (179). En células hipofisarias en cultivo, se ha demostrado que la Ins (DE_{50} 4 ng/ml) tiene un efecto directo aumentando la producción "in vitro" de LH y FSH inducida por LHRH en medio libre de suero (el suero tiene un efecto inhibitorio). Este es un efecto dependiente del tiempo y de la dosis pero independiente de la presencia de glucosa. El efecto no es mediado por un incremento de la proliferación celular ni por un aumento inespecífico del metabolismo (no aumenta la síntesis de ADN ni el contenido proteico) (180).

La Ins (24 ng/ml) sinergiza con hCG en la estimulación de la producción de testosterona en células testiculares en cultivo de ratas hipofisectomizadas (181). Una posible explicación a este efecto sería un aumento del número de receptores hCG o de su afinidad producido por Ins (149).

Han sido descritos numerosos sistemas en que la Ins (aun en dosis fisiológicas) es capaz de actuar como mitógeno y estimular la diferenciación celular: línea celular de ovario de hamster chino (182), células de la granulosa de rata en cultivo de monocapa (183), una sublínea celular de ovario de rata (184). En este último trabajo se demostró un efecto mitogénico inducido por el EGF, pero la Ins, y no el EGF, estimuló la secreción de P. El sistema relativamente más estudiado acerca de la acción de Ins ha sido el de cultivo de células de la granulosa porcina. Inicialmente se evidenció la necesidad de la presencia de Ins al cultivar las células en medios químicos definidos (en ausencia de suero), y que la Ins sola estimulaba la acumulación de P si las células de la granulosa eran obtenidas de folículos grandes (185). May y Schomberg (186) en el mismo sistema no logran observar dicha estimulación, posiblemente por la presencia de suero. También se ha demostrado la acción mitogénica de la Ins en estas células a concentraciones dentro del rango fisiológico (187). Por otra parte, la Ins se requiere para la inducción de los receptores de LH por FSH (188, 189) y para el mantenimiento de los receptores de FSH (190).

Se ha demostrado en células bovinas en cultivo que la Ins y otros factores de crecimiento (FGF, EGF, IGF, PDGF) pueden sustituir al suero en el mantenimiento del transporte de glucosa, que este efecto se correlaciona con la incorporación de timidina al ADN y que no depende de síntesis proteica (191).

En cultivos tecales porcinos (presumiblemente luteinizados in vitro), la Ins aumentó la acumulación de P y androsterediona estimuladas por LH (192).

Otras evidencias acerca de la acción de Ins a nivel ovárico son las aportadas por ciertos casos clínicos. El síndrome de hiperandrogenismo, resistencia insulínica y acantosis nigricans (HARI-AN), con hiperinsulinemia asociada a una malfunción de los receptores insulínicos, es uno de ellos. La hiperinsulinemia podría estimular directamente la síntesis de andrógenos tecales y provocar el hiperandrogenismo asociado (193). En el síndrome de ovario poliquístico (SOP) se ha observado obesidad asociada a resistencia insulínica en pacientes alrededor del período de la menarca. En estos pacientes obesos la hiperinsulinemia podría producir un aumento de la síntesis de andrógenos tecales y del estroma, y este aumento a su vez podría iniciar las restantes anormalidades hormonales asociadas al SOP (192).

Se ha descrito en células de la granulosa humana la modulación por Ins de la actividad de aromatasa. El incremento producido por la Ins sobre la actividad de aromatasa estimulada por FSH no estuvo mediado por aumento en el número de célu-

las (194). En células de la granulosa de rata en cultivo, se ha demostrado un incremento producido por Ins de la esteroidogénesis estimulada por FSH y una estimulación de 3β -HSD. En este caso, la Ins sola no estimuló la esteroidogénesis en ausencia de gonadotrofinas (195).

En resumen, existen múltiples situaciones clínicas y experimentales en las que se evidencia una acción de la Ins sobre la fisiología gonadal y, en particular, sobre el ovario. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la acción de la insulina en la fase lútea y específicamente en células luteales. En base a estos antecedentes se encaró el estudio de la acción de Ins sobre la función lútea, presentado en este trabajo.

A.6 Diabetes y función reproductiva

La diabetes mellitus es una enfermedad sistémica crónica caracterizada por variados y generalizados desórdenes metabólicos.

Hace ya casi 300 años el médico hindú Sushruta reconoció la existencia de dos tipos de diabetes: uno que comenzaba en la juventud y de tendencia familiar y otro atribuido al uso de una dieta desequilibrada. A través de los siglos los médicos han caracterizado estos dos tipos de diabetes como: diabetes mellitus (tipo I) insulino-dependiente y diabetes mellitus (tipo II) no dependiente de Ins (196).

La diabetes mellitus tipo I dependiente de Ins se produce debido a la presencia de alteraciones severas en los islotes pancreáticos que conducen a una eventual deficiencia absoluta en la secreción de Ins, insulinopenia, tendencia a la cetosis y dependencia de la administración diaria de Ins para el mantenimiento de la vida. Esta forma de diabetes está asociada a la existencia de ciertos antígenos codificados en el cromosoma 6 (gen diabetogénico). La destrucción de los islotes ocurre como una respuesta autoinmune (197).

Como consecuencia de la deficiencia insulínica la homeostasis de glucosa está permanentemente alterada y se generan complicaciones severas: cetoacidosis, mortalidad perinatal, ceguera, nefropatía, problemas en las extremidades debido a las complicaciones vasculares. Existen diversas estrategias clínicas para el tratamiento de estas complicaciones.

La diabetes humana se acompaña de graves trastornos sexuales y reproductivos (198, 199). El tratamiento con insulina sólo los corrige parcialmente. En el hombre ha sido señalada la alta frecuencia de impotencia sexual (200) y se han observado lesiones testiculares (201, 202), disminución del número de espermatozoides (201), bajo contenido de cetoesteroides y andrógenos urinarios (203).

En la mujer diabética son comunes la atrofia ovárica, la amenorrea, la pubertad retrasada y la concomitante infertilidad (204-208). Se han descrito trastornos endócrinos

caracterizados por el alto nivel de gonadotrofinas en sangre y orina y el de glucocorticoides en sangre (209, 210). Antes de la era insulínica era sólo excepcional que una mujer diabética tuviera un hijo vivo. Eran frecuentes los abortos, la muerte fetal y perinatal, la toxemia, etc. Hoy en día, gracias a los avances en el conocimiento del metabolismo de la madre diabética se ha logrado un cierto mejoramiento de la prognosis para el embarazo (211).

A.6.1 Estudio de la diabetes en animales de experimentación

Los primeros estudios sobre la diabetes con modelos experimentales datan de 1889 y consistieron en inducir diabetes en perros mediante pancreatocotomía (212). Otro aporte de importancia clave en el estudio de esta enfermedad fue el aislamiento de la insulina por Banting y Best en 1922 (213). Houssay demostró en 1930 el papel de la hipófisis anterior en la diabetes (214). A partir de estos avances pioneros en el conocimiento de esta enfermedad y de las repetidas observaciones acerca de serios trastornos sexuales y reproductivos en hombres y mujeres diabéticos se encaró el estudio sistemático de los disturbios sexuales en la diabetes experimental en ratas y perros pancreatocotomizados (208, 215-224, 225-237, 199, 238).

El conocimiento acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la infertilidad de la rata macho diabética ha avanzado considerablemente en los últimos años. El estado diabético induce una disminución en la biosíntesis androgénica, en

la incorporación de testosteronas (T) a los tejidos blanco periféricos, en la conversión de T a DHT en próstata ventral y disminuye los niveles séricos de LH (234, 239 - 241). Asimismo ha sido demostrado que en la rata macho diabética hay: a) un número reducido de sitios de unión a LH en células de Leydig (149); b) una respuesta reducida de estas células al estímulo de hCG en cuanto a la producción "in vitro" de T (242); c) una conversión mayor de T a metabolitos 5α reducidos en túbulos seminíferos (222); d) niveles reducidos de ABi (proteína ligadora de andrógenos) en epidídimo (222); e) una disminución de la unión de andrógenos a fracción, citosólica y nuclear en próstata (243) y f) una disminución de la actividad de 5α -reductasa y 3α - y 3β -HSD en próstata (244). La mayoría de estos parámetros se restablecieron por terapia insulínica (149, 222, 242). En ciertos casos la terapia con T restableció la función normal (243). Por otra parte se han descrito alteraciones en el eje hipotálamo-hipofisario de estas ratas: a) ausencia de elevación de los niveles de LH como respuesta a la castración; b) falta de respuesta a la administración de LHRH; c) disminución de la unión de andrógenos y de la actividad de 5α reductasa hipofisaria (245).

En ratas hembra diabéticas por aloxano ha sido descrita menor fertilidad, tendencia a abortar, presencia de lesiones morfológicas en hipófisis anterior, ovario y útero, menor porcentaje de animales que ovulan y menor número de óvulos por

ovulación. Estas alteraciones pueden ser corregidas parcialmente con terapia insulínica (246-253).

Las alteraciones uterinas, que dificultan la nidación del huevo y el posterior desarrollo fetal, podrían deberse a la disminución estrogénica de los animales diabéticos o bien a trastornos metabólicos propios de este órgano (237). En este sentido ha sido señalada: la falta de respuesta del E para promover la incorporación de acetato a lípidos uterinos (254), el menor efecto mitótico del E sobre el epitelio luminal uterino (255), fallas en la magnitud de la traslocación nuclear de los receptores de E uterinos (256), disminución del efecto de la inyección ip E sobre la estimulación de la síntesis de proteínas uterinas tempranas y tardías (257) y restablecimiento de estos parámetros por tratamiento con Ins (258).

Se ha postulado que los disturbios de la función reproductiva en ambos sexos son en parte debidos a alteraciones en la secreción o producción de gonadotrofinas hipofisarias (210,234,259, 245, 260). Sin embargo Liu y col. (253) no hallaron diferencias en las concentraciones de gonadotrofinas circulantes entre ratas diabéticas por aloxano y controles. Estos autores atribuyen la disminución del peso ovárico observada en ratas diabéticas, a una reducción en la sensibilidad ovárica a las gonadotrofinas. Por otra parte Kirchick y col. describieron fallas en la ovulación, ausencia del pico de LH preovulatorio y recuperación de estos parámetros por tratamiento con Ins en ratas diabéticas por aloxano

tratadas con MSG. Dichas **fallas** las atribuyen a una respuesta hipofisaria disminuida a la LHRH en proestro (261, 262). Contrariamente 193 y col. no observaron alteraciones en la sensibilidad hipofisaria a la LHRH en ratas macho diabéticas (260).

Por lo tanto aún no está claro cuál es el efecto primario de la diabetes sobre el sistema reproductivo y tampoco si las alteraciones descritas se deben a la falta de Ins o a los efectos de la pérdida de peso, catabolismo proteico, hiperglucemia, vasculopatía gonadal, etc., asociados al estado diabético.

Por otra parte no se conocen las alteraciones bioquímicas precisas responsables de los trastornos ováricos descritos. Por esta razón en el presente trabajo se realizaron estudios "in vivo" acerca de diversos parámetros reproductivos en ratas hembras diabéticas. Por otro lado, otro enfoque del trabajo fue la realización de estudios "in vitro" que proveen la oportunidad de evaluar los efectos directos de la Ins sobre el ovario y evitan las complejas variables sistémicas asociadas a la diabetes "in vivo".

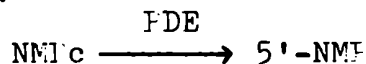
A.6.1.1 La diabetes por STR como modelo experimental

La STR (2 deoxi -2-(3-metil-3 nitrosourea)-D-glucopiranosina) la cual es extraída de *Streptomyces achromogenes*, posee la capacidad de desarrollar en corto tiempo un estado de franca diabetes. Tal efecto se detecta plenamente dentro de las 4^{ra} hs., y se caracteriza por una hipoglucemia e hipoglucosuria iniciales

(alrededor de las 10 horas de inyectada). Este efecto es producido por la liberación brusca de Ins al destruirse las células beta del páncreas. Luego de este período se produce una hiperglucemia progresiva y aumento de glucosa en orina, que se estabiliza a partir del día 8^o del tratamiento (263). El área de acción de la STR sobre el páncreas se limita a las células beta, donde la droga ejerce una intensa actividad citotóxica actuando a través de la unión a la membrana celular. El componente de glucosa de la STR incrementa su incorporación en estas células de modo que la citotoxicidad de la nitrosourea se concentra en ellas. Aparentemente la STR disminuye los niveles de NAD intracelulares inhibiendo su síntesis e incrementando su degradación (264), y por consiguiente destruyendo estas células. Por otra parte la STR está bastante libre de efectos tóxicos no específicos. El aloxano por lo contrario produce 10 veces más mortalidad y es altamente nefrotóxico (265).

A.7 Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (FDE)

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos son las enzimas que catalizan la hidrólisis de nucleótidos cíclicos según la siguiente reacción:



Los nucleótidos cíclicos NMPc son AMPc o GMPc y generalmente los metales divalentes Mg^{++} y Mn^{++} son estimulantes de la enzima.

Esta hidrólisis constituye el único proceso degradativo demostrado para la remoción intracelular de los nucleótidos cíclicos y la consecuente terminación de sus efectos. Esta enzima está presente en casi todos los tejidos de los mamíferos y en realidad está constituida por un sistema de enzimas, en el que cada isoenzima posee características físicas y cinéticas diferentes y localización celular propia (266 - 272). La presencia de formas múltiples de la enzima que no son comparables de tejido a tejido ha suscitado gran confusión en la aproximación al problema de la IDE y en la interpretación fisiológica de los resultados. En otros términos, aunque las publicaciones sobre IDE no son escasas, la comprensión del sistema IDE y su vinculación con la acción hormonal es un problema aún no resuelto.

En la mayoría de los casos estudiados existen dos tipos de IDE: las que poseen afinidad en el orden micromolar para AMFc y otras con afinidad de uno o dos órdenes de magnitud menor. Las IDE del primer tipo corresponden a enzimas periféricas y están reguladas principalmente por sustancias biológicamente activas que interactúan con la membrana plasmática celular. Las IDE del segundo tipo constituyen la principal fracción de IDE solubles. Estas se han hallado en alta concentración en tejidos nerviosos y son muy sensibles a Ca^{++} e hidrolizan GMFc (K_m 1-2 μ M) y AMFc (K_m 20 μ M). Estos dos tipos han sido separados y caracterizados en cerebro, hígado, corazón y músculo (273).

Como ya ha sido mencionado una de las acciones metabólicas de la Ins involucra la reducción de los niveles intracelulares de AMPc a través de la estimulación de la actividad de PDE, luego de la unión de la hormona a su receptor. Esto ha sido demostrado en hepatocitos, adipocitos (274), membranas de hígado purificadas (275), etc. La activación por Ins parece ocurrir a través de una fosforilación de la enzima, ya que la fosfatasa alcalina revierte la estimulación (275). Sin embargo todavía no se comprenden los eventos moleculares que ocurren en la membrana y que promueven la fosforilación y activación de la PDE-AMPc.

PDE en células esteroideogénicas:

Los nucleótidos cíclicos están involucrados en la regulación de varias funciones de las células esteroideogénicas. Diferentes hormonas como ACTH y angiotensina II en adrenal, LH en células de Leydig, FSH en células de Sertoli, FSH o LH en células de la granulosa según su grado de diferenciación, LH en células luteales incrementan los niveles intracelulares de AMPc a través de la estimulación de la adenilato ciclasa (276-281, 119, 120).

La importancia de la regulación del catabolismo del AMPc se ha reconocido recientemente (282 - 284).

En tejido testicular se ha descrito la presencia de formas múltiples de PDE. En testículo de rata inmadura se han ca-

racterizado tres formas enzimáticas Ca^{++} /calmodulina dependiente (picos 1-3), además de una forma específica para AMFc e independiente de Ca^{++} /calmodulina. Estas enzimas han sido separadas por cromatografía en columna de DEAE celulosa. El pico 1 de FDE mostró alta afinidad para AMFc, lo cual señala una diferencia con las isoenzimas de otros tejidos. Por otra parte esta forma enzimática no se encontró en el testículo adulto, otra indicación de su papel altamente especializado (285). Sin embargo otro estudio realizado en el mismo sistema (testículo inmaduro) describe solamente los picos 2 y 3 donde además demuestra que corresponden a una misma isoenzima en dos estados diferentes: asociada o disociada de calmodulina. Esta isoenzima (pico I) corresponde a la FDE de GMFc dependiente de Ca^{++} /calmodulina descrita en otros tejidos (273). Por otra parte, este trabajo muestra la presencia de dos picos (II y III) de alta afinidad hacia AMFc no dependientes de Ca^{++} /calmodulina. El pico III corresponde a la FDE-AMFc de bajo Km descrita en otros tejidos. El pico II representaría una actividad específica del testículo (282), en particular, de las células germinales ya que está ausente en células de Sertoli (286). En estas células ha sido demostrada la estimulación de la actividad de FDE por FSH, dibutiril AMFc, toxina de cólera e isoproterenol. Dicha estimulación está mediada por un aumento de AMFc y depende de la síntesis de proteínas. Ha sido sugerido que la inducción del catabolismo de AMFc consecuente a la estimulación de la FDE podría ser responsable de la

desensibilización observada luego de la acción hormonal (370,371). Se ha demostrado la estimulación selectiva de la isoenzima AMFc de alta afinidad (K_m 2 μ M) mientras que la IDE-GMfc, Ca^{++} /calmodulina dependiente no fue afectada (286).

Son escasos los estudios realizados sobre la IDE de ovario (287,288). Recientemente ha sido caracterizada la IDE de células de la granulosa de rata y su estimulación por FSH (284)

depende del tiempo y de la dosis de la hormona. Este efecto se bloquea por cicloheximida y está mediado aparentemente por un aumento de los niveles de AMFc intracelular ya que el dibutiril AMFc tiene un efecto idéntico al de la FSH. En este sistema, al igual que en células de Sertoli, la estimulación afecta a una IDE-AMFc de alta afinidad (K_m = 2 μ M) que no depende de Ca^{++} /calmodulina, sin modular la actividad de la IDE-GMfc presente en las células. Asimismo, la FSH estimula una forma IDE-AMFc de alta afinidad dependiente de la Ca^{++} /calmodulina similar a la previamente mencionada de testículo inmaduro (tipo 1).

Hasta el presente no se han realizado estudios sobre la IDE de células luteales, por lo cual en este trabajo se realizó la caracterización preliminar de la IDE y se estudió su regulación por Ins.

R E S U L T A D O S

A. ACCION DE LA INS SOBRE LA REGULACION ENDOCRINA DE LA FUNCION LUTEAL

A.1 Alteraciones ováricas en ratas diabéticas por STR

Se utilizaron animales adultos (60 días) divididos en tres grupos experimentales: Control (C), diabéticos (D) y diabéticos tratados con Ins (I). Las ratas fueron sacrificadas en diestro alrededor de los 90 días de edad.

a) Los animales diabéticos mostraron hiperglucemia, peso ovárico reducido y niveles disminuidos de P circulante. Estos parámetros se restablecieron bajo terapia sustitutiva con insulina. (Tabla 1). La Figura 1 muestra la estimulación de la producción "in vitro" de AMPc utilizando ovarios enteros de ratas en diestro, normales y diabéticas, estimulados con gonadotropina exógena. En estas condiciones experimentales el aumento observado en el grupo D no resultó significativo.

La curva dosis respuesta a la estimulación por hCG de la producción de P realizada con ovarios enteros de ratas en diestro controles y diabéticas muestra una menor sensibilidad en este último grupo (Figura 2).

b) Se estudió el receptor de FSH, LH y Prl en la fracción particulada de ovarios de ratas en diestro, controles (C) y diabéticas (D). La evaluación de la constante de afinidad K_a

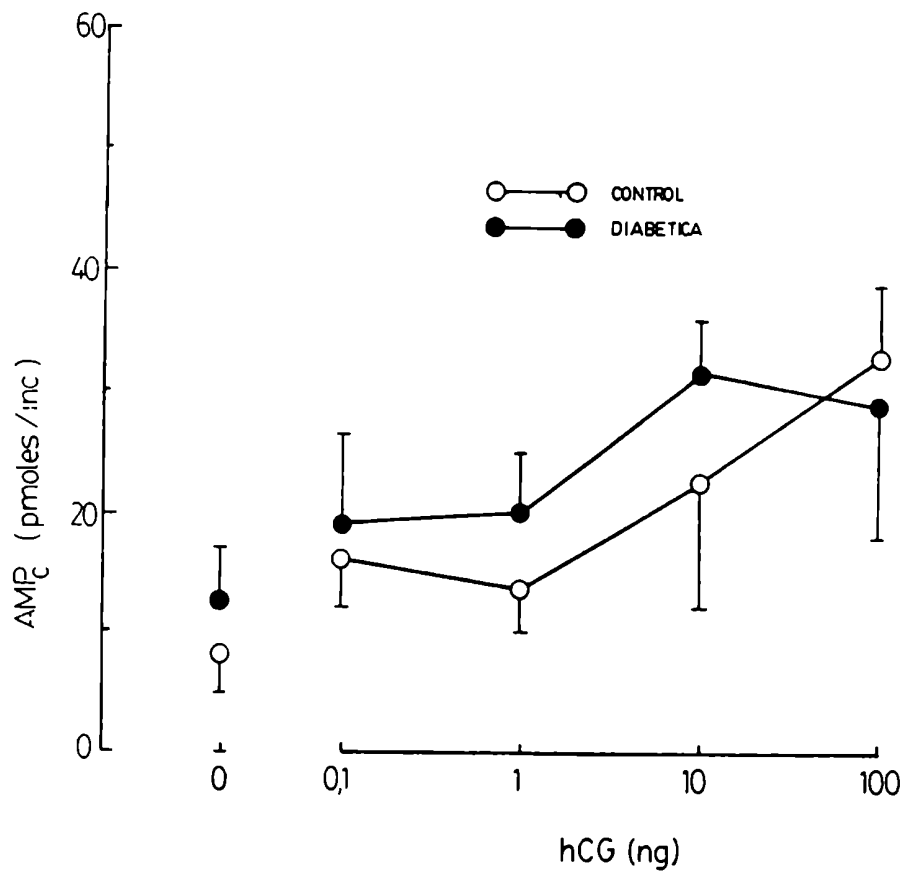


Fig. 1: Producción de AMP cíclico por ovarios de ratas normales y diabéticas. Los ovarios intactos fueron incubados durante 3 horas a 37° C en 2 ml de Medio 199, con 0,1 mM MIX, suplementado con distintas concentraciones de hCG (C= grupo control, D= grupo diabético). Las incubaciones se realizaron por triplicado.

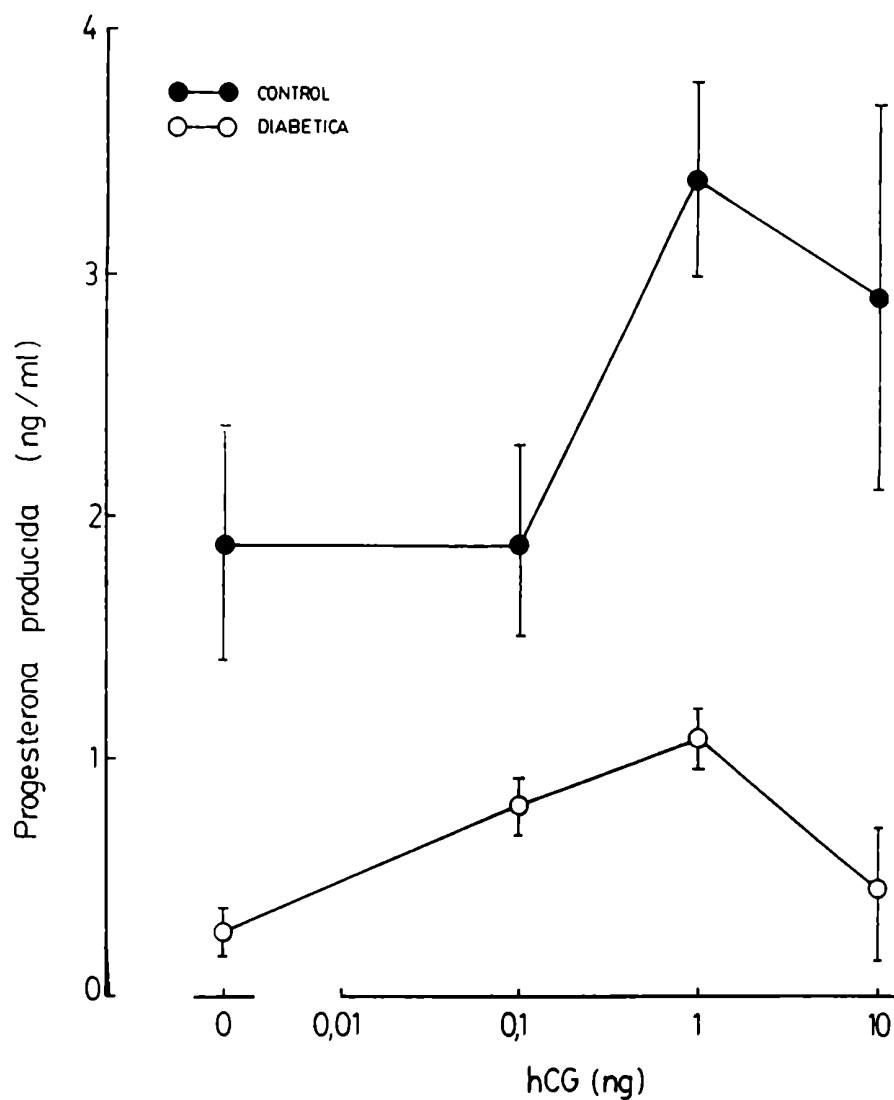


Fig. 2: Producción de progesterona por ovarios de ratas en diestro.
Los resultados están expresados en ng de progesterona producidos por ml de medio de incubación, luego de 3 horas de incubación a 37° C con distintas concentraciones de hCG.

TABLA I: Efectos de la diabetes por estreptozotocina y posterior tratamiento con insulina sobre peso ovárico, glucosa sérica y progesterona circulante.

GRUPO EXPERIMENTAL			
Parámetro	Control (12)	Diabético (12)	Diabético + Insulina (12)
Peso ovárico (mg)	44,0 \pm 2,3	29,8 \pm 1,2*	41,3 \pm 2,5
Glucosa (mg/100 ml)	98 \pm 12	420 \pm 39*	110 \pm 29
Progesterona sérica (ng/ml)	4,8 \pm 0,2	2,4 \pm 0,2*	4,2 \pm 0,6

Los animales fueron sacrificados 4 semanas luego de la inyección de estreptozotocina o vehículo. Los ovarios fueron extraídos y pesados. La sangre fue recolectada para determinar glucosa y progesterona séricas.

Los resultados se dan como promedios \pm ES. Los números entre paréntesis indican número de animales. Las evaluaciones estadísticas fueron hechas en relación a valores control (* $p < 0,001$).

y número de sitios (Q) se realizó por el método de Scatchard (137).

Las curvas de saturación y gráficos de Scatchard (Fig. 3) para la unión de hCG revelaron la presencia de una única clase de sitios de unión de alta afinidad. La K_a no difiere entre ambos grupos. Grupo D: $1,37 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, Grupo C: $1,13 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Sin embargo, se encontró una marcada disminución en el número de sitios de unión en el grupo de animales diabéticos. Grupo D: $8,1 \pm 0,05$ (n= 10) vs Grupo C: $14,0 \pm 1,3$ fmoles/mg proteína (n= 10) ($p < 0,01$).

Para la unión de FSH no se hallaron diferencias significativas ni en K_a ni en Q (Fig. 4). $K_a(C) = 1,63 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $Q(C) = 1,3 \pm 0,2$ fmoles/mg proteína (n= 8). $K_a(D) = 1,37 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ y $Q(D) = 1,5 \pm 0,1$ fmoles/mg proteína (n= 8).

Tampoco se observaron diferencias en la unión de Prl a la fracción particulada de ovario (Fig. 5). $K_a(C) = 0,23 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $Q(C) = 84,2 \pm 4,4$ fmoles/mg proteína (n= 8).

c) Considerando que la rata hembra diabética no ovula normalmente, es lógico suponer que sus ovarios poseen distintas poblaciones de células luteales en relación a los controles. Este hecho podrá ser responsable de la disminución en el número de sitios de unión a hCG en los estudios en que se utiliza fracción de membrana de ovario entero. Por esta razón, se estudió la unión de hCG a células luteales de ratas C, D e I superovuladas por inyecciones de PMSG y hCG, a los 80 y 82 días de edad respectivamente.

Estas células fueron aisladas por tratamiento con colagenasa (133).

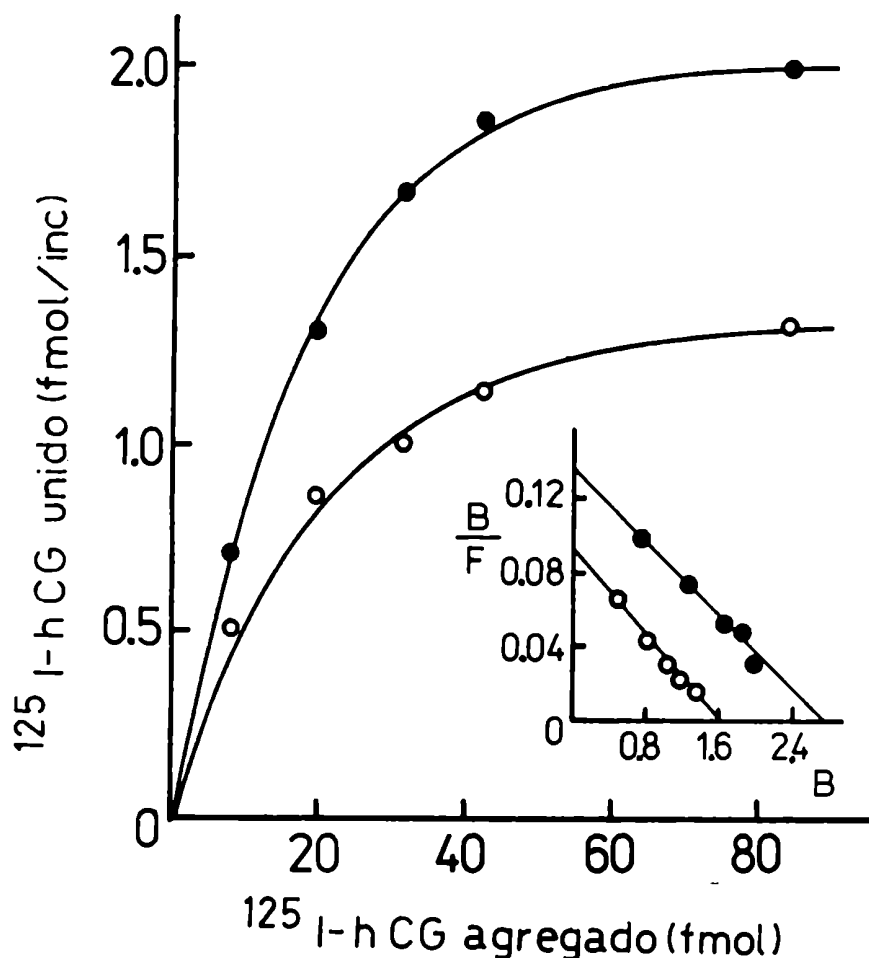


Fig. 3: Unión de ^{125}I -hCG a fracción de membrana de ovarios de ratas control y diabéticas por estreptozotocina. Se incubaron alícuotas de suspensión de membranas de ovario (400-600 ug de proteína) en PBS con concentraciones crecientes de ^{125}I -hCG y una concentración constante de hCG fría en un volumen final de 0,25 ml durante 2 hs. a 34°C . Se utilizó PBS para parar la reacción y para los lavados. Con los datos obtenidos se realizó la curva de saturación y el gráfico de Scatchard correspondiente. Los valores se expresan en la curva de saturación. Cada punto es promedio de muestras por duplicado. ●—● ratas control (n= 10); ○—○ ratas diabéticas (n= 10).

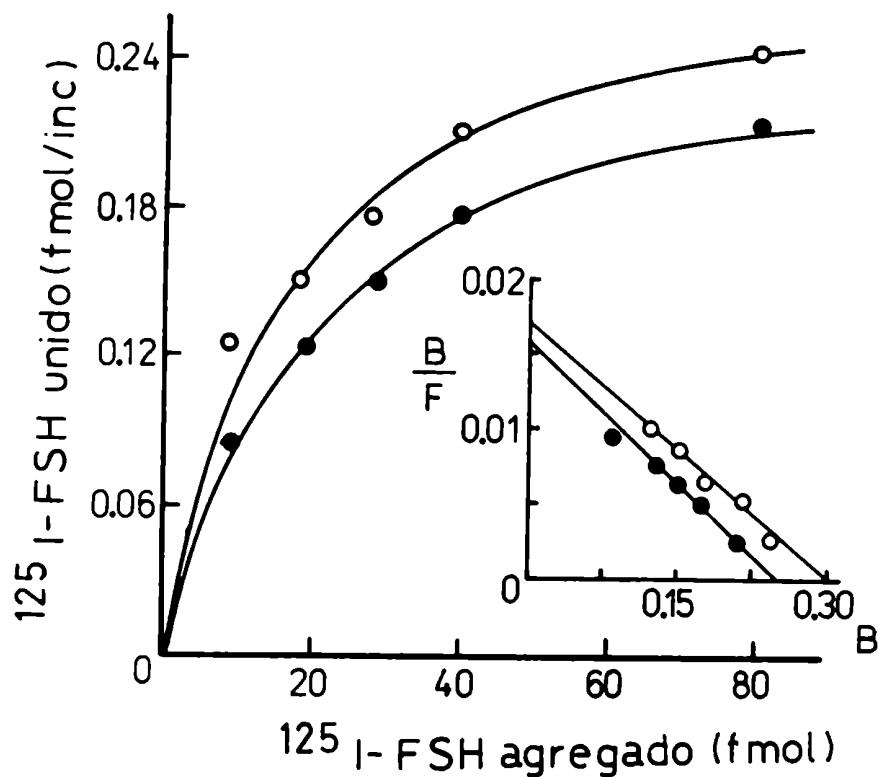


Fig. 4: Unión de ^{125}I -FSH a fracción de membrana de ovarios de ratas control y diabéticas por estreptozotocina. El procedimiento de incubación fue similar al descrito en la leyenda a la figura 3. Con los datos obtenidos se realizó la curva de saturación y el gráfico de Scatchard correspondiente. Cada punto es promedio de muestras por duplicado, ● ratas control (n= 8): ○ ratas diabéticas (n= 8).

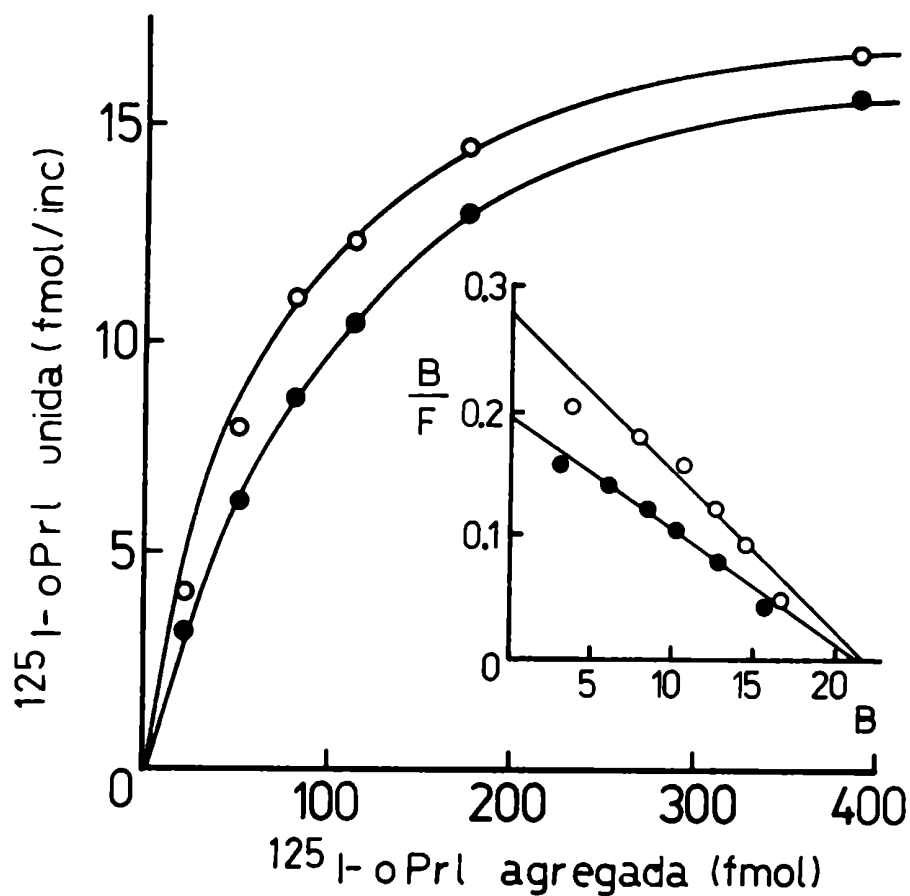


Fig. 5: Unión de ^{125}I -oPrl a fracción de membrana de ovario de ratas control y diabéticas por estreptozotocina. El procedimiento de incubación fue similar al descrito en la figura 3. La incubación se realizó durante 16 hs. a 20°C . Con los datos obtenidos se realizó la curva de saturación y el correspondiente gráfico de Scatchard. Cada punto es promedio de muestras por duplicado, ●—● ratas control (n= 10), ○—○ ratas diabéticas (n= 10).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6. Se observó una disminución de alrededor del 50% en el número de sitios de unión a hCG por célula en células luteales de ratas diabéticas $C = 5,7 \pm 0,3$ ($n = 6$), $D = 2,80 \pm 0,07$ ($n = 6$), $I = 5,1 \pm 0,2$ ($n = 6$) fmoles/ 3×10^6 células ($P < 0,001$). El tratamiento con insulina restableció este parámetro (Fig. 6). La K_a fue similar en todos los grupos y aproximadamente de $1,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

d) Considerando que los cambios en la unión de ^{125}I -hCG fueron observados tanto en fracción particulada como en células luteales fue de interés determinar si dichas diferencias podían correlacionarse con cambios en la producción de AMFc y P. Con este objetivo se aislaron células luteales de ratas superovuladas y se incubaron a 37°C bajo atmósfera de carbógeno durante 3 horas. Se incubaron aproximadamente 2×10^6 células por tubo con MIX $0,1 \text{ mM}$ en 2 ml de Medio 199 adicionado con distintas concentraciones de hCG. Se midió la P producida por radioinmunoensayo (143) y el AMFc por la técnica de unión a proteína quinasa de adrenal bovina (144).

La Figura 7 muestra la curva dosis respuesta a hCG para la producción de AMFc. La máxima producción de AMFc de ratas control se obtuvo con 10 ug de hCG/tubo ($1,26 \times 10^{-10} \text{ M}$). La respuesta de las células de ratas diabéticas fue significativamente mayor (40%) que los controles. En nuestras condiciones el tratamiento con insulina no fue capaz de restaurar la

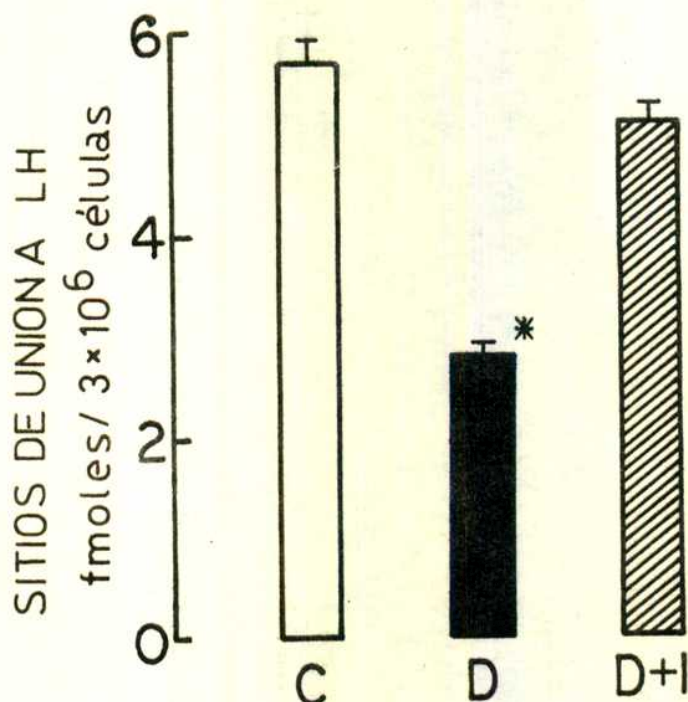


Fig. 6: Unión de ^{125}I -hCG a células luteales aisladas de ratas control (C), diabéticas por estreptozotocina (D) y diabéticas tratadas con insulina (I). Las células luteales obtenidas de ratas pseudopreñadas fueron preparadas por digestión con colagenasa. Se incubaron alícuotas de la suspensión de células luteales que contenían 3×10^6 células aproximadamente, en Medio 199 durante 3 hs. a 34°C . La cantidad de sitios receptores fue calculada a partir de gráficos de Scatchard. Cada barra representa el promedio \pm ES. Cada grupo consta de 12 animales y los ovarios fueron separados en dos pools diferentes para cada grupo. Las comparaciones estadísticas fueron calculadas utilizando el test-t de Dunnet ($\#p < 0,001$) C= Grupo control, D= grupo diabético, I= ratas diabéticas tratadas con insulina.

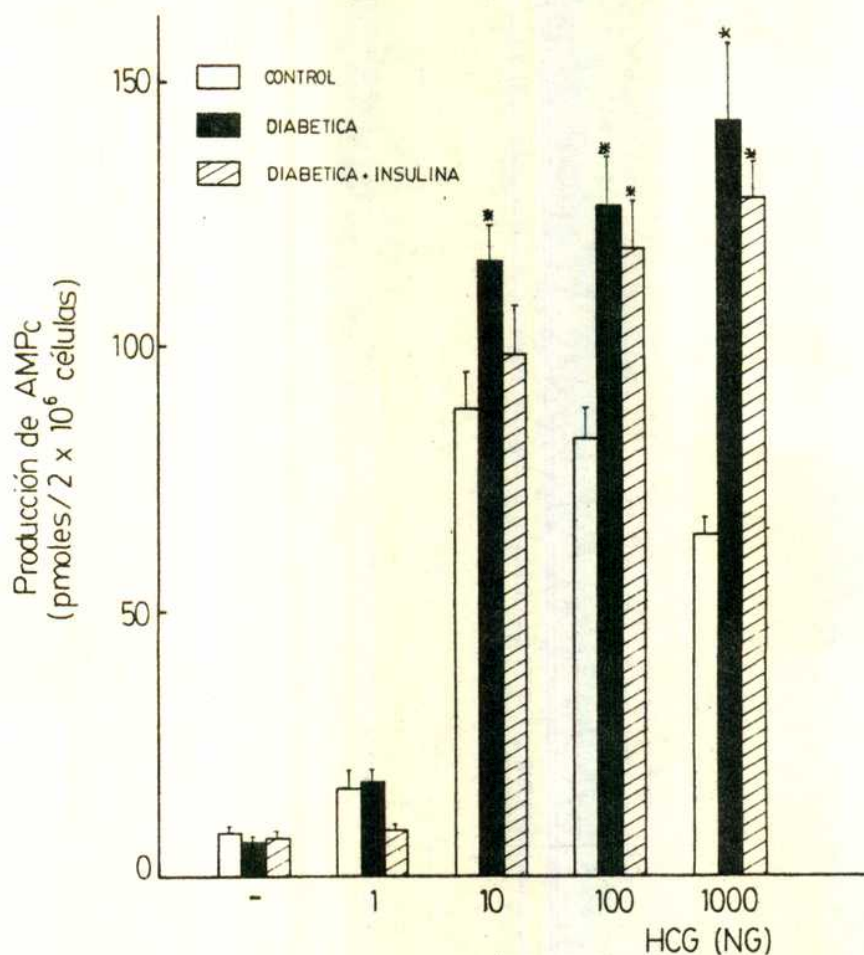


Fig. 7: Efecto de dosis crecientes de hCG sobre la producción de AMPc en células luteales aisladas de ratas control, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina. La preparación de las células luteales, la incubación y el ensayo de AMP cíclico se describen en la sección "Materiales y Métodos". Los datos se expresan como pmoles de AMP cíclico formados por 2×10^6 células. Cada barra representa el promedio \pm ES de determinaciones por duplicado. Las comparaciones estadísticas fueron hechas en relación a los valores control para cada concentración de hCG mediante el test-t de Dunnet. (* $p < 0,05$).

respuesta normal de AMPc.

La Figura 8 muestra la respuesta de P a dosis crecientes de hCG en células luteales de ratas control, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina. Aunque no se detectaron diferencias significativas en la estimulación máxima, puede observarse una pérdida de sensibilidad de las células de animales diabéticos que se evidenció por una caída significativa de la DE_{50} . Este efecto se revirtió por tratamiento con Ins.

e) Ya que uno de los efectos de la Ins es la modulación de la actividad de PDE se evaluó la actividad de esta enzima en células luteales aisladas de los tres grupos experimentales. Se realizaron determinaciones en homogenato, fracción citosólica y fracción particulada (Tabla II). Se observó mayor actividad en el citosol y un aumento significativo de dicha actividad enzimática medida en citosol en el Grupo D respecto al C. El tratamiento con Ins restablece los valores a los observados en los controles.

A.II Acción "in vitro" de la Ins sobre células luteales. Receptores de Ins.

Los resultados anteriores sugieren que la Ins juega un papel importante en el metabolismo lúteo, ya que su ausencia en la diabetes induce alteraciones en los parámetros ya descritos. Sin embargo, para descartar que estas alteraciones se deban a efectos secundarios a la ausencia de Ins (hiperglucemia,

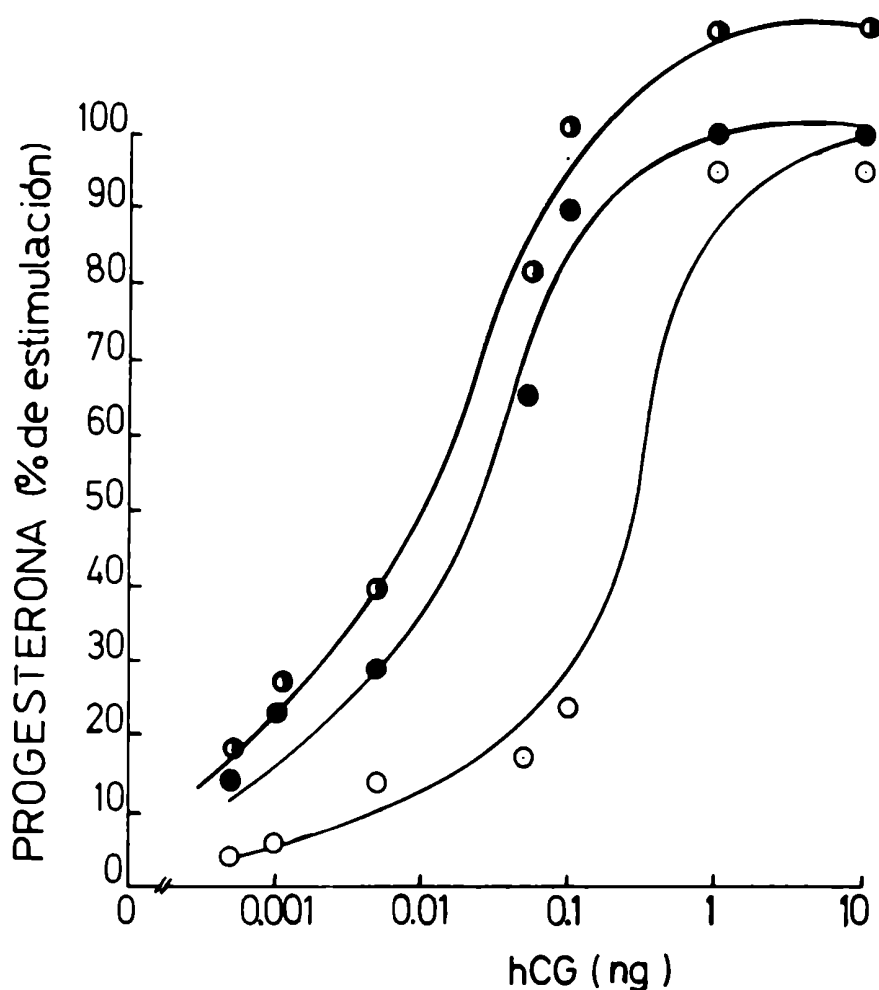


Fig. 8: Efecto de concentraciones crecientes de hCG sobre la producción de progesterona en células luteales aisladas de ratas control, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina.

Los detalles experimentales son los mismos que los descritos en la figura 5. Los datos se expresan como porcentaje de estimulación de la producción de progesterona referida a los valores basales obtenidos en ausencia de hCG. Los valores basales fueron: control: $10,9 \pm 0,1$, diabéticos: $11,7 \pm 0,4$, diabéticos tratados con insulina: $10,4 \pm 0,2$ ng de progesterona formados/ 2×10^6 células. Los datos se expresan en porcentaje de producción de progesterona, ●—● ratas control (n= 8), ○—○ ratas diabéticas (n= 8), ◐—◐ ratas diabéticas tratadas con insulina (n= 8).

TABLA II: Actividad de fosfodiesterasa en células luteales de ratas controles (C) diabéticas (D) y diabéticas tratadas con insulina (I).

	HOMOGENATO	PELLET	CITOSOL
C	28 \pm 1	23 \pm 2	110 \pm 6
D	32 \pm 2	29 \pm 3	323 \pm 23 *
I	22 \pm 3	23 \pm 2	194 \pm 10

Las determinaciones se efectuaron con [^3H] - AMPc 10 μM en el homogenato total, pellet y sobrenadante de 105.000 xg. Los resultados se expresan como pmoles de AMPc hidrolizados/mg prot/min. Son promedio de \pm ES de determinaciones realizadas por duplicado de dos experimentos distintos (* $p < 0,001$).

pérdida de peso, etc.) es de fundamental importancia la demostración de una acción directa de la Ins sobre estas células. Los siguientes experimentos se realizaron en ratas control de 25 días, superovuladas por administración de FMSG y hCG.

a) Se realizaron curvas dosis-respuesta de células luteales en presencia de hCG, Ins y hCG + Ins 0,02 nM, midiéndose el AMPc total y la P liberada al medio de incubación.

La respuesta de AMPc a incubaciones con cantidades crecientes de Ins, hCG o ambas se muestra en la Figura 9. La producción de AMPc llegó al máximo con 10^{-10} M hCG, sin embargo, la Ins no estimuló la producción de AMPc ni aumentó la estimulación producida por hCG.

La Figura 10 muestra que la Ins estimuló la producción de progesterona de células luteales cuando fue agregada al medio de incubación en las concentraciones de 0,2 nM a 20nM observándose una disminución a mayores concentraciones, mientras que la hCG produjo máxima estimulación con 0,05 nM. Las incubaciones con ambas hormonas (ver Fig. 10) se realizaron utilizando concentraciones crecientes de hCG y una dosis fija de Ins de 0,02 nM por incubación. En estas condiciones pudo observarse un efecto sinérgico a dosis submáximas de hCG. Se realizaron incubaciones de células luteales en presencia de diferentes concentraciones de EGF (0,02 - 200 nM) no observándose cambios en la producción de AMPc o P para ninguna de las concentraciones utilizadas.

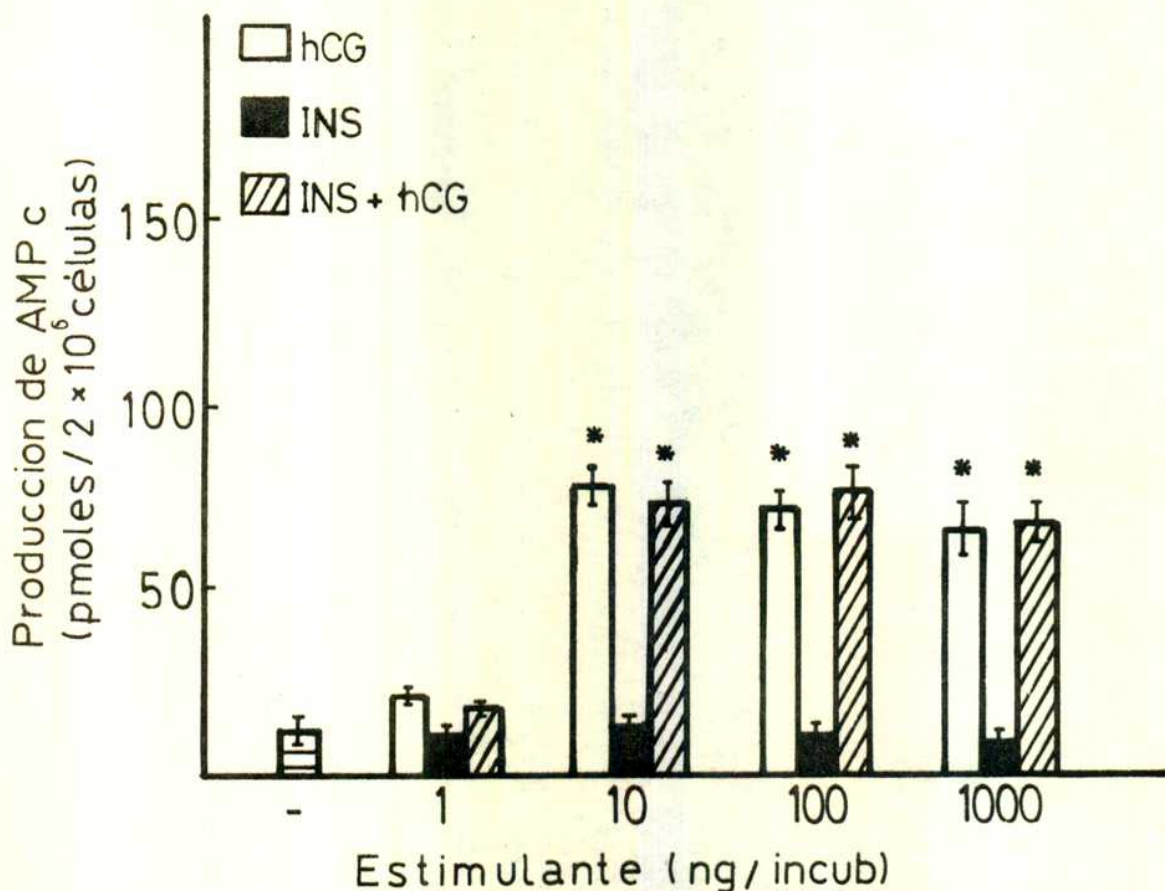


Fig. 9: Efecto de dosis crecientes de hCG, Ins o hCG + 0,02 nM Ins sobre la producción de AMPc por células luteales aisladas. Las células fueron incubadas con las hormonas en presencia de 0,1 mM MIX a 37° C bajo una atmósfera de 95% O₂, 5% CO₂ durante 3 hs. Luego de la incubación se tomaron alícuotas de 1 ml, se hirvieron durante 15 min. y se guardaron a -20° C hasta la determinación del AMPc total. Cada barra representa el promedio + ES de determinaciones realizadas por triplicado de tres experimentos diferentes. Las comparaciones estadísticas fueron hechas en relación a los valores control (# p < 0,01) con el test-t de Dunnet.

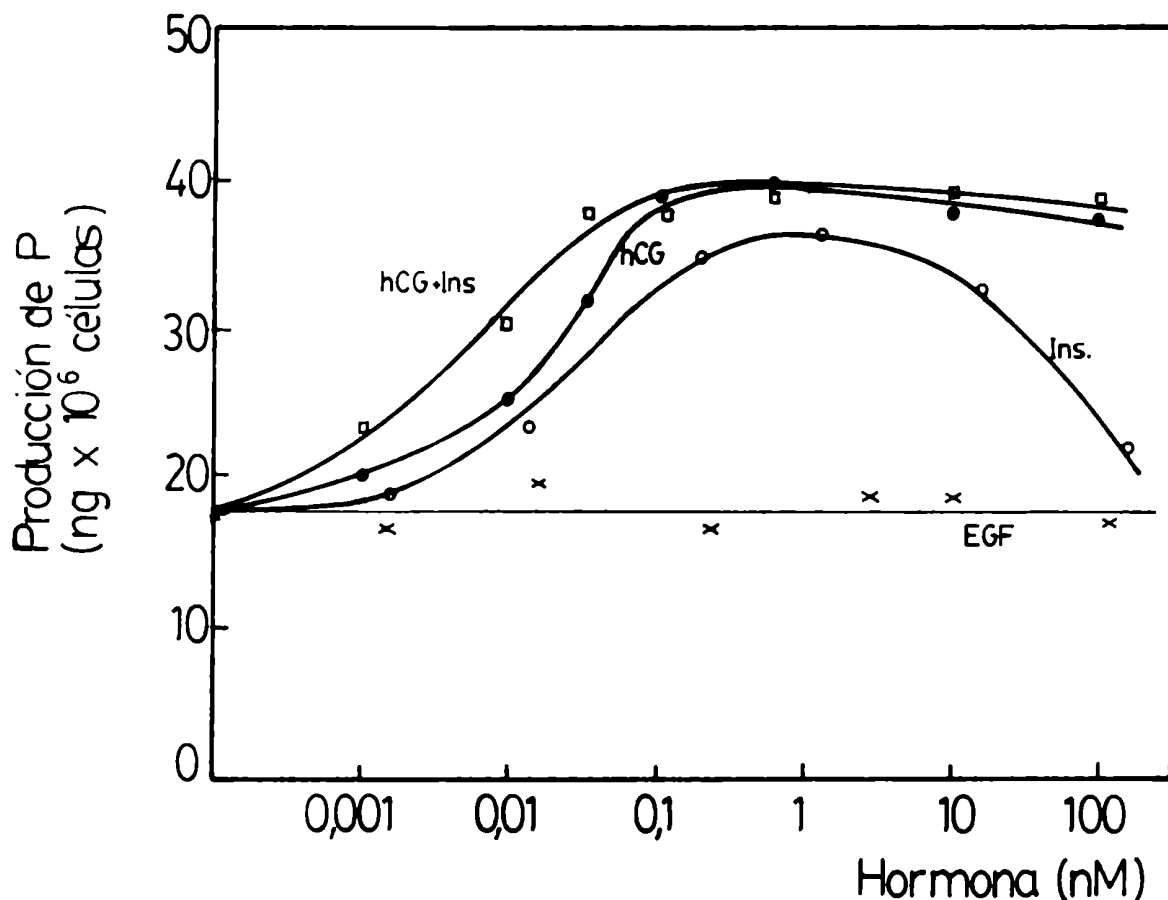


Fig. 10: Efecto de dosis crecientes de hCG, Ins, hCG + 0,02 nM Ins ó EGF sobre la producción de progesterona en células luteales aisladas en presencia de MIX. Las células fueron incubadas en las condiciones descritas en la figura 9. Luego de la incubación se tomaron alícuotas de 0,5 ml y se centrifugaron a 800xg durante 10 min. a 4° C. El sobrenadante se guardó congelado a -20° C hasta la determinación de la progesterona por RIA. Las curvas son resultado de incubaciones realizadas por triplicado de cuatro experimentos diferentes.

Las incubaciones de células luteales en ausencia de MIX se observan en la Fig. 11. La estimulación por hCG fue menor que en presencia del inhibidor. En estas condiciones no se evidenció ni la estimulación producida por la Ins, ni el efecto sinérgico mencionado anteriormente, lo cual sugiere la existencia de algún efecto modulador de la Ins sobre la actividad de PDE.

b) Con el fin de evaluar algunos de los posibles mecanismos involucrados en el efecto estimulador de la Ins se realizaron incubaciones en presencia o ausencia de dos dosis estimuladoras de Ins (0,2 y 2 nM) con el agregado o no de los siguientes inhibidores: aminoglutetimida (10 ug/ml), cicloheximida (1 ug/ml) y actinomicina (10 ug/ml). En todos los casos los valores basales disminuyeron significativamente. No se observó estimulación por Ins en presencia de cualquiera de estos inhibidores (Fig. 12).

c) Actividad de PDE de células luteales.

Se evaluó la acción de Ins sobre la actividad de PDE en células luteales de ratas prepúberes superovuladas. Para ello se preincubaron las células 10 minutos con diferentes concentraciones de Ins en Medio 199 a 37° C. Se observó un aumento de actividad de la PDE-AMPC medida en la fracción sobrenadante siendo la concentración óptima de la hormona de 0,2 nM (Fig. 13).

La actividad de PDE depende del tiempo de preincubación. La Fig. 14 muestra que la actividad enzimática es máxima cuando

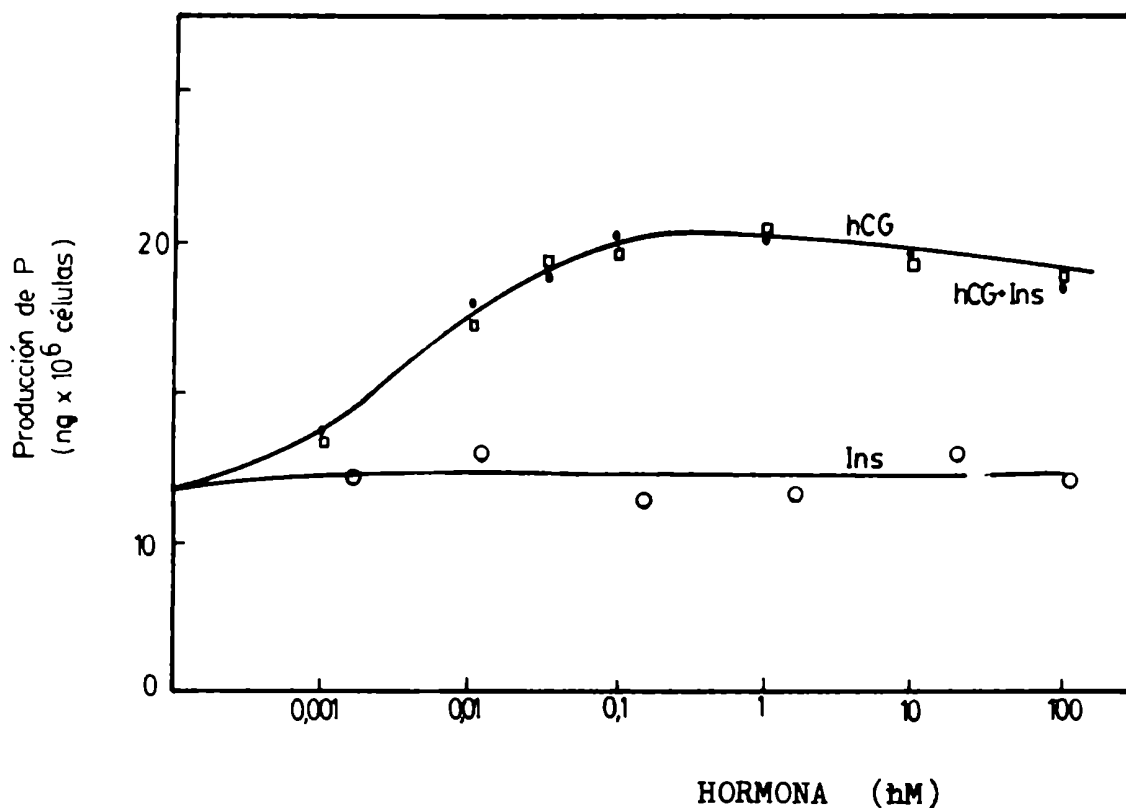


Fig. 11: Efecto de dosis crecientes de Ins, hCG o hCG + 0,02 nM Ins, en ausencia de MIX. Las células fueron incubadas en las mismas condiciones descritas para la figura 10 excepto que fueron realizadas en ausencia de MIX. Las curvas son resultado de incubaciones realizadas por triplicado de dos experimentos diferentes.

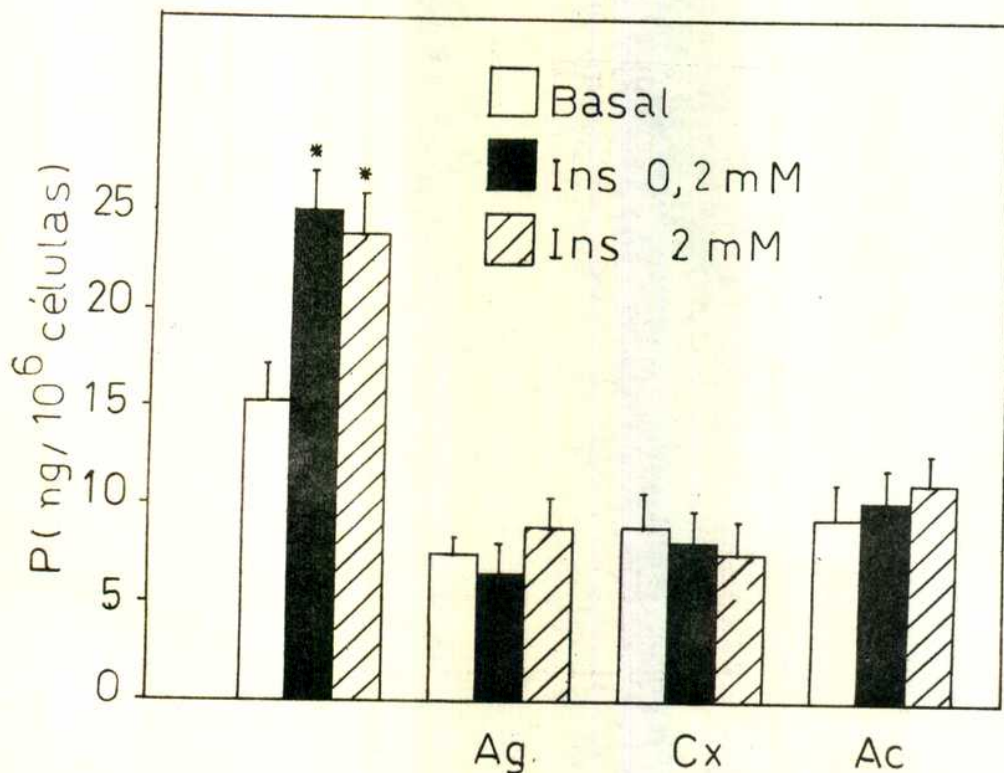


Fig. 12: Efecto de la aminoglutetimida (1 mM) (AG), actinomicina D (10 ug/ml) (AC) y cicloheximida (1 ug/ml) (Cx) sobre la producción de progesterona en respuesta a dos concentraciones estimulantes de Ins (0,2 y 2 nM). Se realizaron incubaciones de células luteales en las mismas condiciones descritas para la figura 10 en presencia o ausencia de los inhibidores. Las barras representan el promedio \pm ES de determinaciones realizadas por triplicado de tres experimentos diferentes.

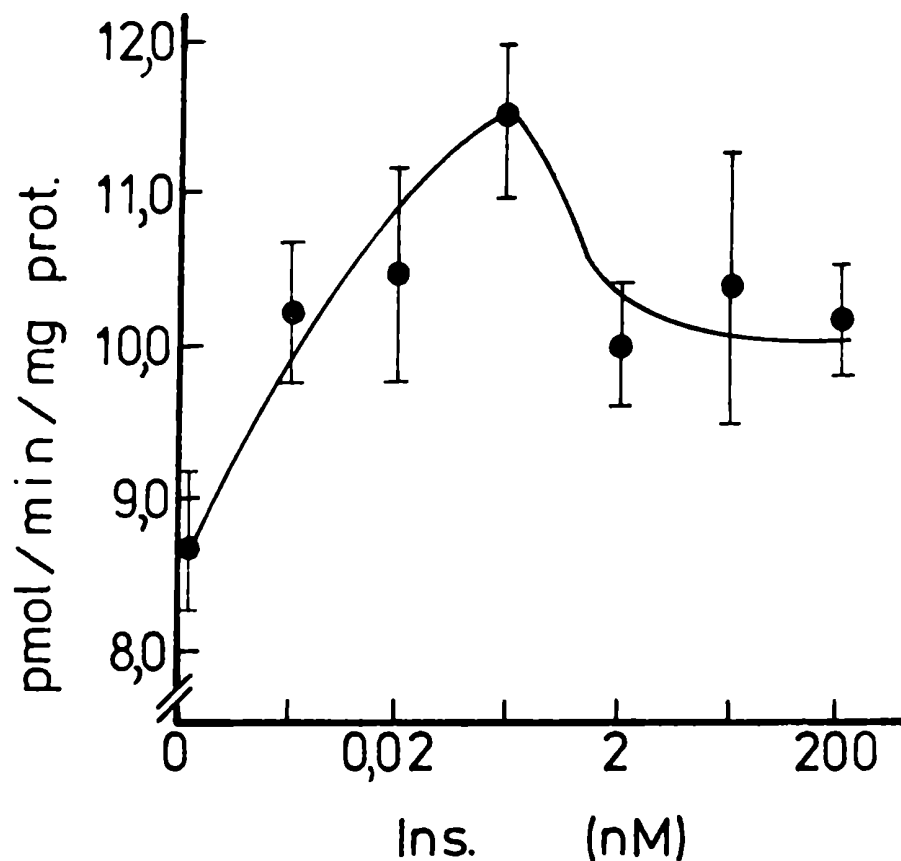


Fig. 13: Efecto de concentraciones crecientes de Ins (0-200 nM) sobre la actividad de PDE de células luteales. Las células fueron aisladas por digestión con cola genosa y preincubadas en Medio 199, 0,1% BSA a 37°C durante 10 min. en presencia de diferentes concentraciones de Ins. Los valores son promedio \pm ES de preincubaciones realizadas por triplicado de dos experimentos diferentes.

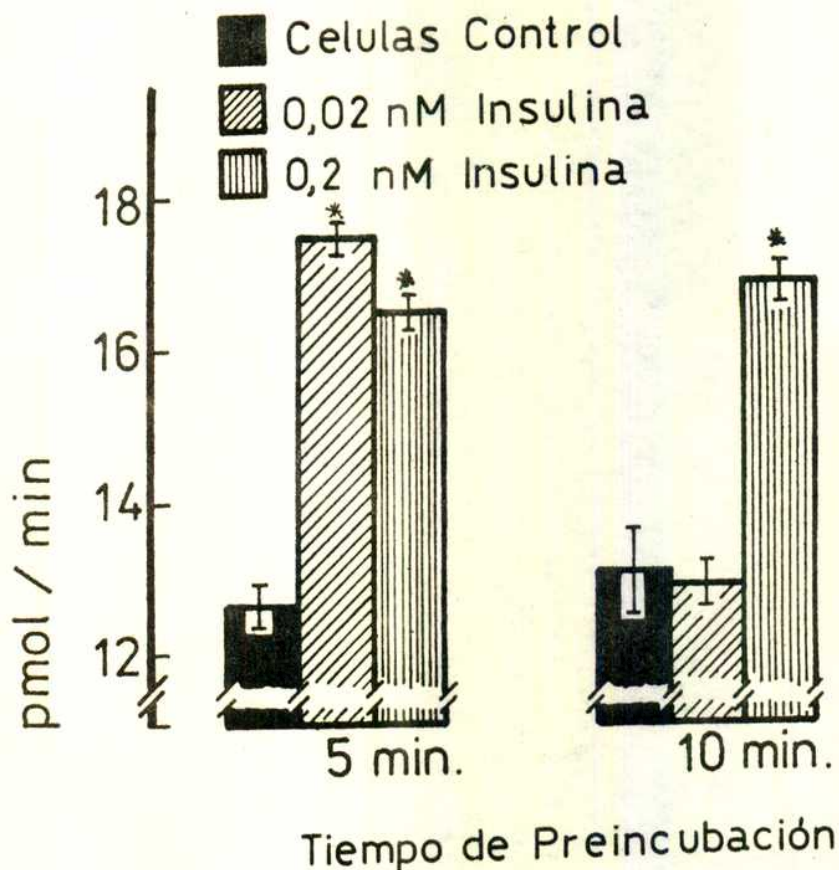


Fig. 14: Efecto del tiempo de preincubación sobre la actividad de PDE estimulada con Ins 0,02 y 0,2 nM. Las células fueron aisladas e incubadas en presencia o ausencia de dos concentraciones de Ins óptimas para la estimulación de la enzima, determinadas en el experimento de la Figura 13. Los valores se expresan como promedio \pm ES de preincubaciones realizadas por triplicado de dos experimentos diferentes.

las células se preincubaban durante 5 minutos. Con concentraciones menores de Ins el efecto estimulador de la hormona disminuye cuando la preincubación se prolonga a 10 minutos.

El efecto de Ins sobre la actividad de PDE de fracción soluble determinó la purificación de dicha fracción a través de una columna de DEAE-celulosa. La Fig. 15 muestra el perfil de elución de la PDE-AMPC obtenida del sobrenadante de células luteales tratadas o no con Ins 0,2 nM durante 10 minutos. A partir de células luteales no tratadas se obtuvieron dos picos (I y II) de actividad de PDE-AMPC utilizando AMPC 1 μ M como sustrato. Cuando se utilizaron células tratadas con Ins se observó un aumento de la actividad en ambos picos.

Cuando se utilizó GMPc como sustrato se observó hidrólisis del nucleótido solamente en el pico I. Esta actividad también aumentó en células tratadas con Ins.

Se caracterizó la dependencia de sustrato de los picos I y II. Ambas formas enzimáticas presentan gráficos de Lineweaver-Burk no lineales, con un K_{m1} = 3-5 μ M (alta afinidad) y K_{m2} = 60-66 μ M (baja afinidad) para AMPC en células tratadas o no con la hormona. (Fig. 16) La Tabla IV resume los valores de los parámetros cinéticos de las actividades de ambas formas de la PDE de células luteales. La Ins aumentó la V máx de ambas formas alrededor de 2 a 8 veces sin afectar la afinidad de la enzima por su sustrato (Fig. 16).

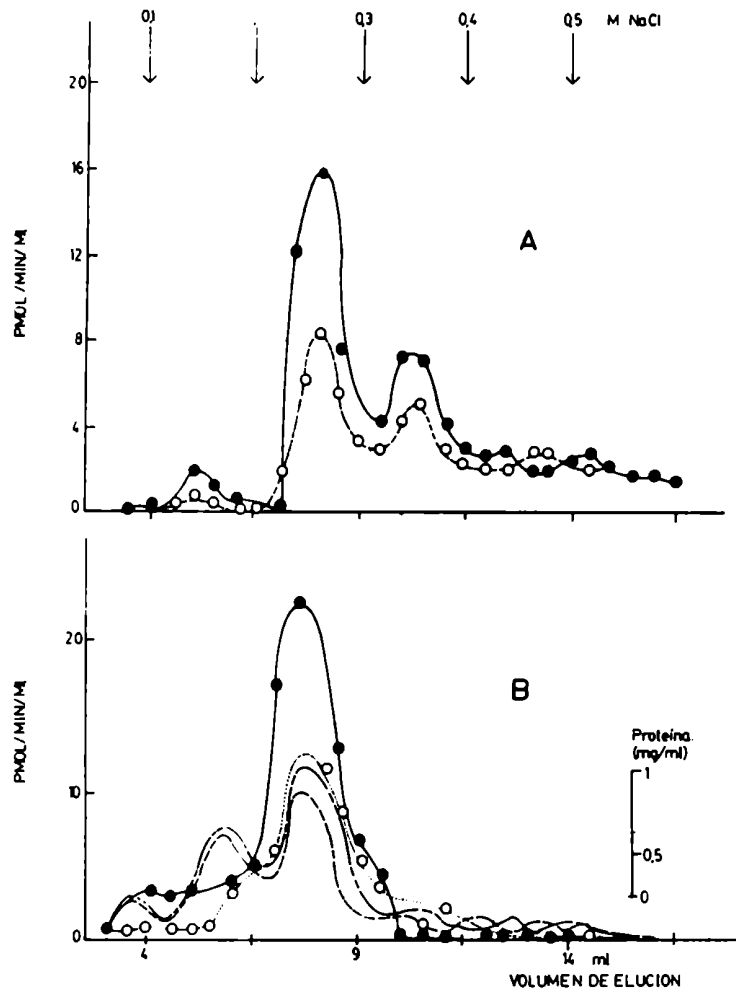


Fig. 15: Perfil de elución (DEAE-celulosa) de la PDE de fracción sobrenadante de 100.000 xg de células luteales. Puntos blancos: células control
Puntos negros: células preincubadas con Ins 0,2 nM durante 10 minutos.

La elución se realizó mediante un gradiente discontinuo de NaCl 0,05 a 0,5 M en buffer A. Se tomaron alícuotas de estas fracciones para el ensayo de actividad de PDE con 10^{-6} M de ^3H -AMPC como sustrato (A) o 10^{-6} M de ^3H -GMPc como sustrato (B). En la parte B se observa además el perfil de proteínas en presencia — — — — — o ausencia - - - - - de Ins.

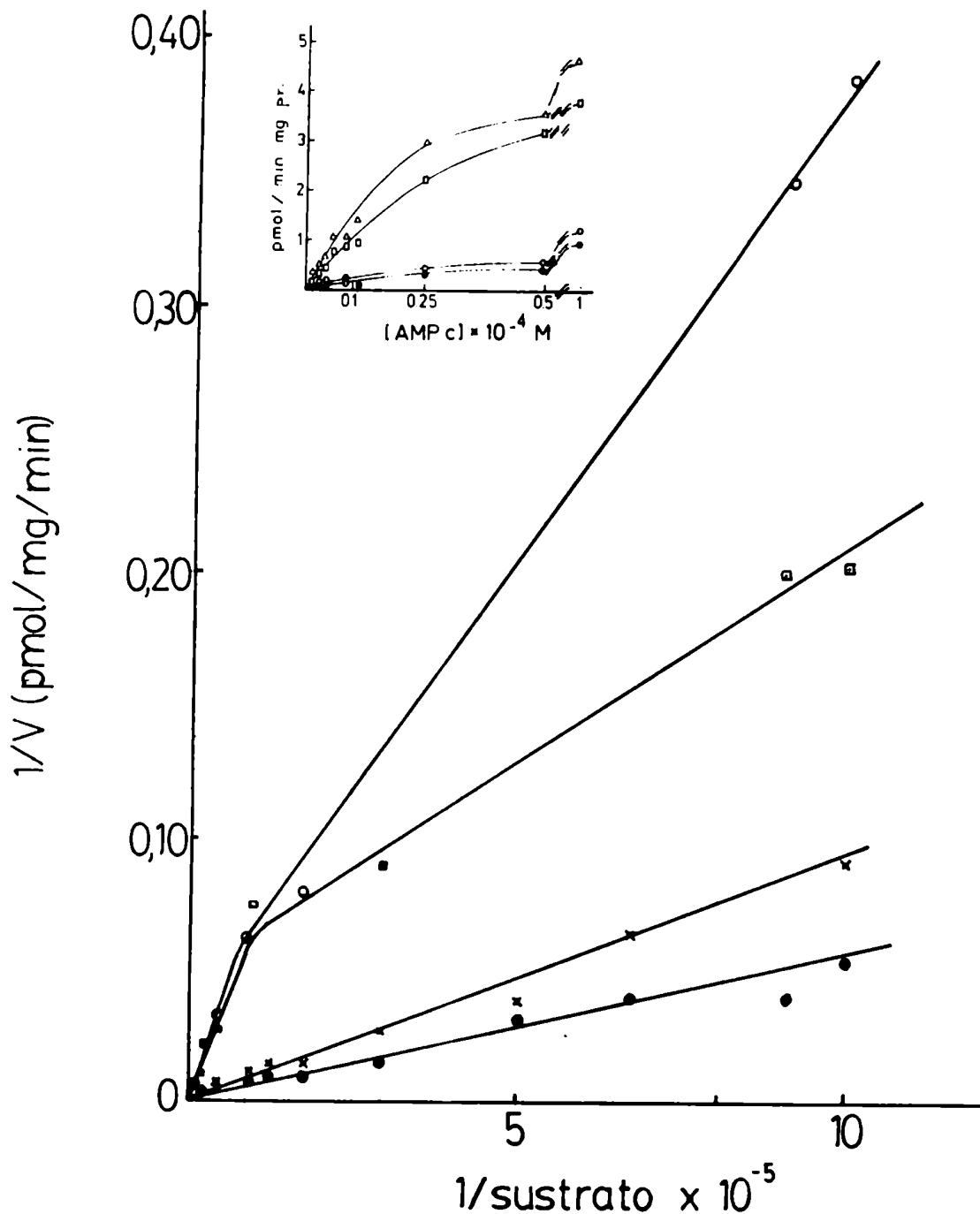


Fig. 16: Efecto de las variaciones de sustrato (AMPC) sobre los picos I (círculos) y II (cuadrados) obtenidos en cromatografía de DEAE-celulosa (Fig. 15).
 Puntos blancos: células control
 Puntos negros: células tratadas con Ins 0,2 nM
 Las velocidades iniciales se calcularon a partir de curvas de tiempo obtenidas para cada concentración de AMPC.

TABLA IV: Parámetros cinéticos de las actividades de PDE de nucleótidos cíclicos de células luteales.

		ALTA AFINIDAD		BAJA AFINIDAD	
		Km (μ M)	Vmax (nmol/min)/ mg prot.	Km (μ M)	Vmax (nmol/min)/ mg prot.
<u>PICC I</u>					
	CONTROL	4	0,22	66	1,12
	INSULINA	5	1,3	61	8
<u>PICC II</u>					
	CONTROL	5	0,3	46	1,05
	INSULINA	3	0,7	49	6,5

Los datos obtenidos fueron obtenidos de gráficos de Lineweaver-Burk mostrados en la Figura 16.

La actividad de la forma I medida con ^3H -AMTc se inhibe en presencia de GM1c (10^{-4} - 10^{-6}M) mientras que la actividad de la forma II no se modifica, lo cual muestra comportamientos diferentes de ambas formas.

d) Receptores de insulina en células luteales.

En el mecanismo de reconocimiento de hormonas proteicas está involucrado un receptor de membrana asociado a un sistema de amplificación de la respuesta hormonal.

En base a esto se encaró la caracterización del receptor de insulina en células luteales aisladas de ovarios de ratas superovuladas. Se utilizó ^{125}I -Ins marcada por el método de lactoperoxidasa de acuerdo a Thorell y Johansson (134) con algunas modificaciones (ver Métodos).

La Fig. 17 muestra la curva de tiempo y temperatura de la unión de ^{125}I -Ins a células luteales. Los valores máximos de unión fueron logrados luego de 30 minutos de incubación a 20°C . Estas fueron, por lo tanto, las condiciones utilizadas en los siguientes experimentos.

El gráfico de Scatchard para Ins utilizando concentraciones crecientes de Ins fría se muestra en la Fig. 18. La naturaleza curvilínea del gráfico sugiere la presencia de dos clases de sitios de unión con distintas afinidades.

Los valores de las constantes de afinidad y números de sitios respectivos fueron: $Ka_1 = 2,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, $Ka_2 = 5,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y $Q_1 = 35.000$ sitios/célula, $Q_2 = 900.000$ sitios/célula.

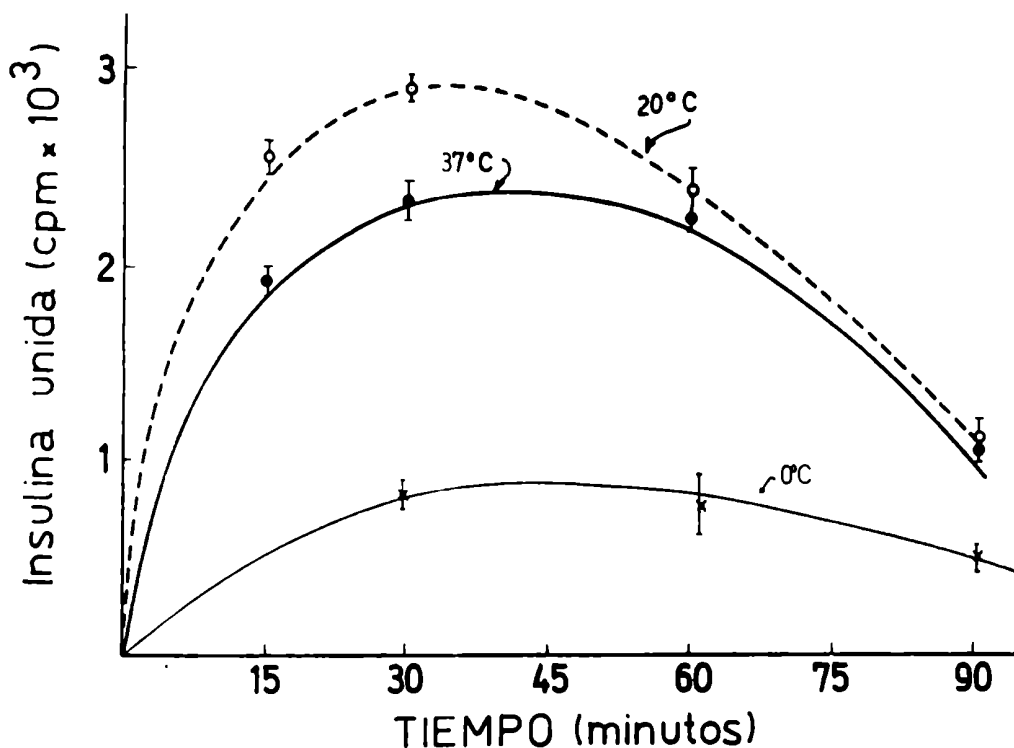


Fig. 17: Efecto de tiempo y temperatura sobre la unión de ^{125}I -Ins a células luteales aisladas de ratas normales superovuladas. Se incubó 100 μl de suspensión de células ($0,7-1,8 \times 10^6$ células) con 0,3 pmoles de ^{125}I -Ins durante diferentes tiempos a 20°C , 37°C ó a 0°C . Se realizaron incubaciones paralelas con 5 μg de insulina fría para evaluar la unión no específica. La reacción se detuvo por el agregado de 2 ml de Medio 199 frío y se centrifugaron los tubos a $800 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . Se contó la radiactividad remanente en el pellet. Los valores son promedio + ES de determinaciones realizadas por duplicado en dos experimentos diferentes.

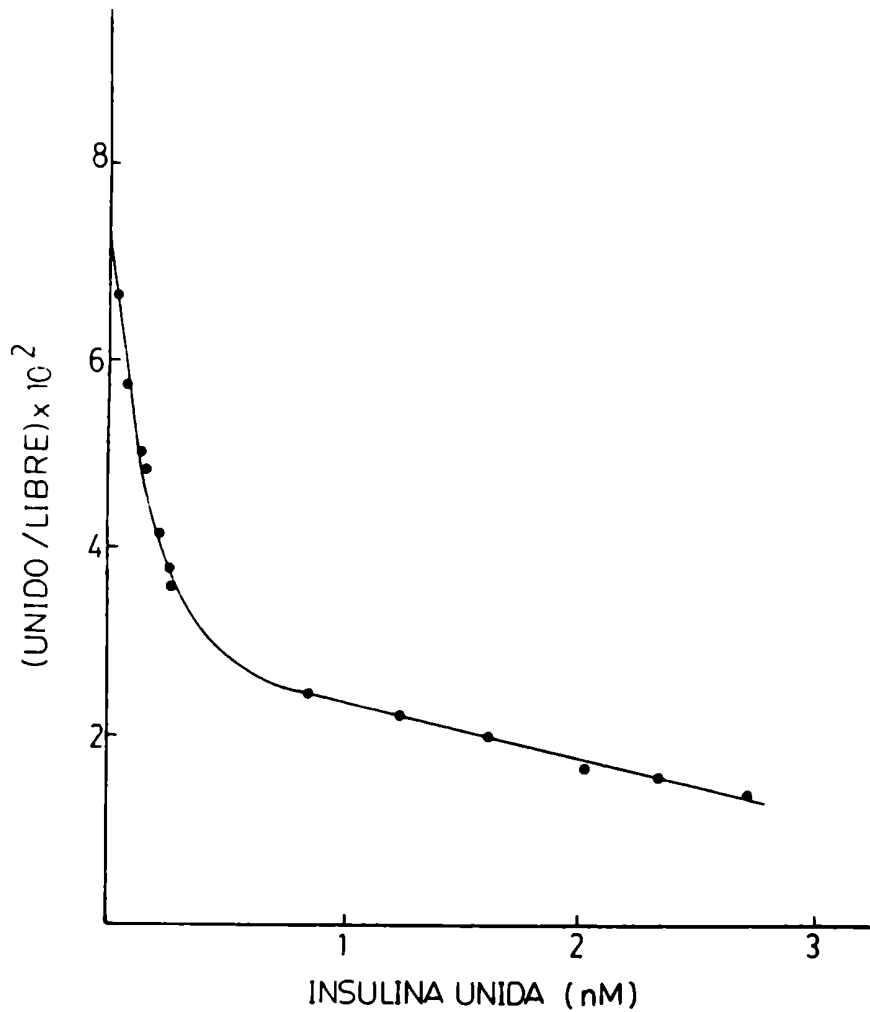


Fig. 18: Gráfico de Scatchard para la unión de insulina a célula luteales. Se incubó alícuotas de la suspensión de células (2×10^6 células/100 ul) con 0,04 pmoles de ^{125}I -Ins y concentraciones crecientes de insulina fría (0,1-5000 ng) durante 30 minutos a 20°C . en un volumen final de 0,5 ml. Las incubaciones fueron realizadas por duplicado. El experimento fue repetido tres veces.

Se estudió la especificidad de la unión de ^{125}I -Ins incubando células luteales con hormona radioactiva en presencia de diferentes concentraciones de insulina fría o bien hormonas heterólogas, hCG, hGH, hLH, oIRL, EGF, (Fig. 19). Con la excepción de insulina ninguna de las hormonas fue capaz de desplazar la insulina unida, lo que demuestra que la unión a insulina, es específica.

Para verificar si la formación de los complejos hormona-receptor producían la alteración o destrucción de la hormona, se midió el porcentaje de radiactividad precipitable por TCA 10% en la ^{125}I -Ins recuperada luego de la incubación con células luteales. La hormona así obtenida fue 88% precipitable por TCA 10%. La degradación de 0.05 ug/tubo de insulina en el buffer de incubación libre de células fue de un 5% a los 30 minutos.

Por otro lado había que descartar que la unión encontrada fuera por pegada inespecífica a tubo o a células. Para ello se realizó el ensayo de unión de insulina con células luteales que habían sido destruidas por hervor durante 15 minutos. En este caso hubo un 95% de reducción de la capacidad de unión.

Se estudió la naturaleza química del receptor exponiéndolo a la acción de enzimas durante 30 minutos a 37°C . En la Tabla III se observa que hay un 91% de decrecimiento de la unión específica luego de la acción de la tripsina. No se detectaron efectos luego del tratamiento con RNasa o DNasa. La fosfolipasa C aumentó levemente la unión específica de insulina.

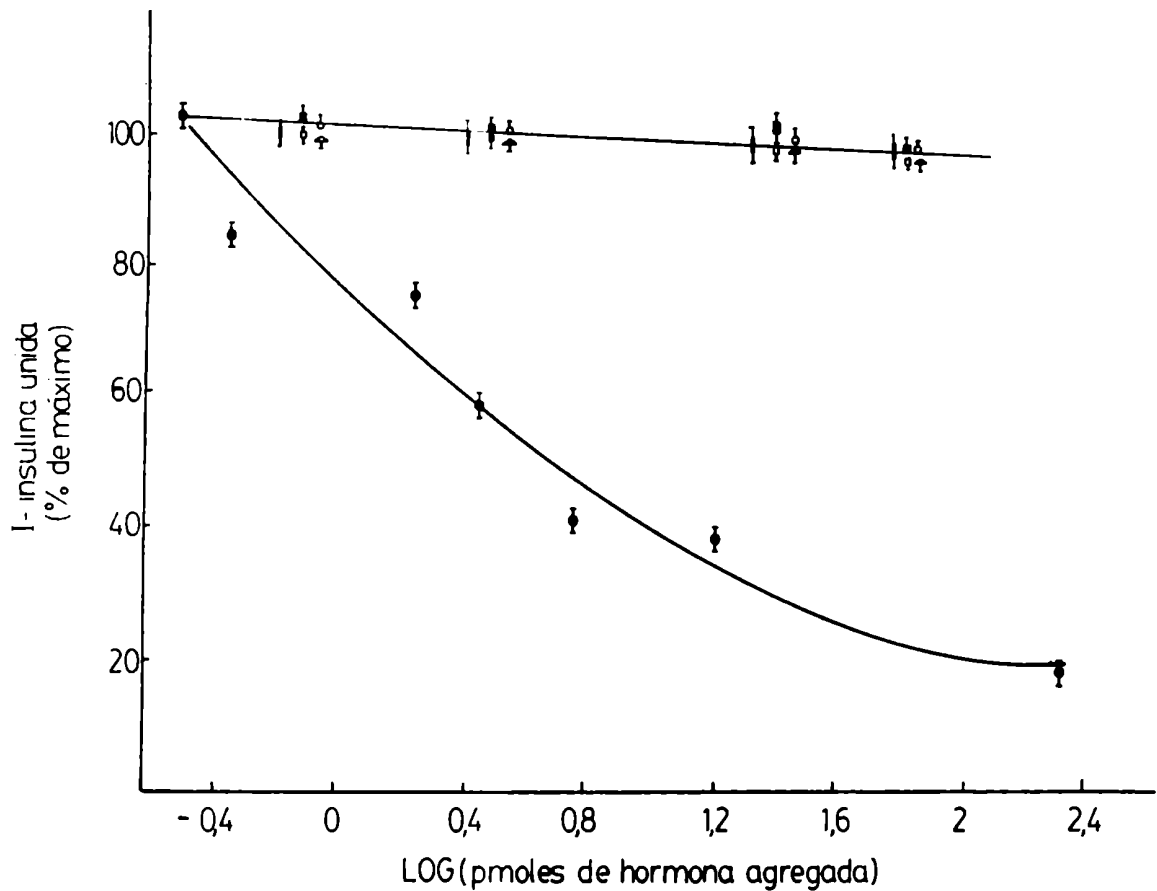


Fig. 19: Especificidad de la unión de ^{125}I - Ins a células luteales. Células luteales aisladas fueron incubadas durante 30 minutos con ^{125}I -Ins (0,4 pmoles) y con concentraciones crecientes (0-500 nM) de Ins \bullet , hCG \blacksquare , hGH \square , hLH \times , o-Prl \circ , y EGF \blacktriangle . La unión fue calculada como porcentaje de ^{125}I -Ins unida en ausencia de hormona fría. Cada punto representa el promedio \pm ES de, por lo menos, tres observaciones.

TABLA III: Efectos de tratamientos enzimáticos sobre la unión de ^{125}I -Ins a células luteales.

ENZIMA	CONCENTRACION	UNION ESPECIFICA DE ^{125}I -INS(% de control)
-	-	100
TRIPSINA	50	8,9
FOSFOLIPASA C	50	118,6
DESCRIBONUCLEASA	50	89,6
RIBONUCLEASA	50	94,1

Se incubó alícuotas de suspensión de células, igual que para los estudios de unión, a 37°C en presencia de enzimas durante 30 minutos en FBS. Luego de centrifugar las células se lavaron tres veces con PBS frío. En las incubaciones con tripsina se agregó 200 ug de inhibidor de brotes de soja antes de centrifugar. La determinación de la unión específica de ^{125}I -Ins fue idéntica a la descrita en la Figura 17.

La Figura 20 muestra la localización subcelular del receptor de insulina. Se observa mayor unión en el pellet de 100.000 μ , aunque también hay una unión significativa en la fracción de 12.000 μ .

A.III Alteraciones en el eje hipotálamo hipofisario en ratas diabéticas por STR

Para completar el panorama acerca de la influencia de la Ins sobre la función reproductiva se realizaron estudios adicionales con el fin de evaluar el funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario en ratas diabéticas.

Se utilizaron ratas adultas (60 días) ovariectomizadas de los grupos C, D e I determinándose los siguientes parámetros: a) Los niveles circulantes de LH medidos por RIA (I-LH) y actividad biológica (B-LH) en ratas C, D e I. Los mismos parámetros luego de la administración aguda de LHRH con o sin tratamiento con benzoato de estradiol (Eb) (10 μ g Eb/rata 48 y 24 hs. antes del experimento).

b) Los niveles circulantes de prolactina (lrl) basales, luego de la administración de Eb y TRH en ratas C, D e I.

c) Los niveles de receptor nuclear y citoplasmático de estradiol en hipotálamo y en hipófisis de ratas C, D e I, tratadas no con Eb (10 μ g Eb/rata 48, 24 y 1 hora antes del experimento).

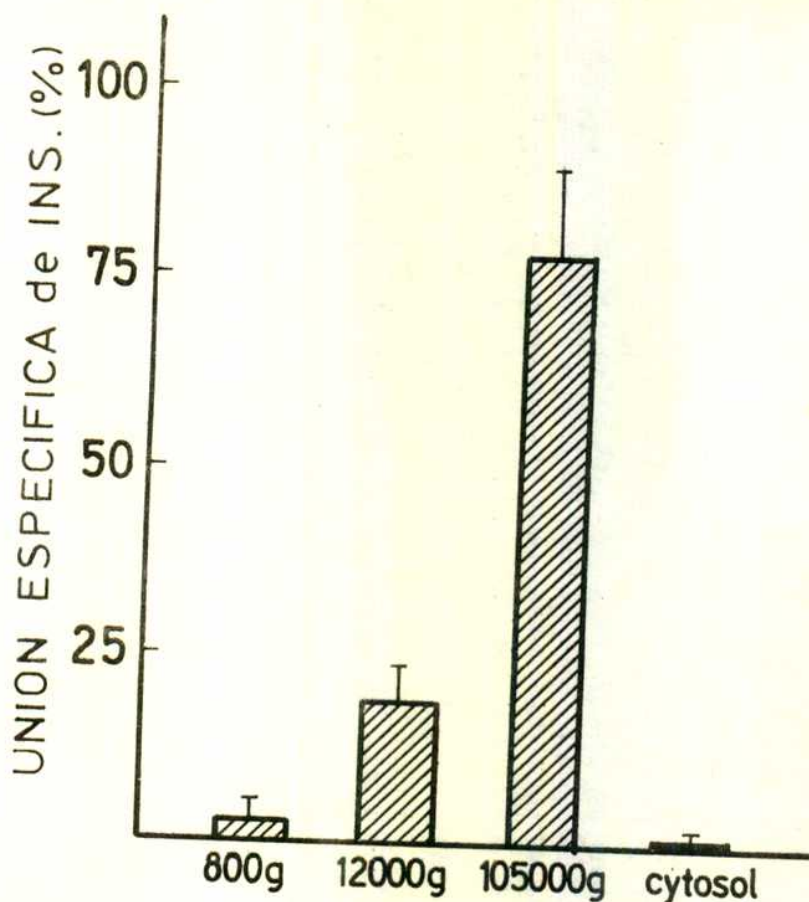


Fig. 20: Distribución de la unión de ^{125}I -Ins en fracciones subcelulares aisladas de homogenato de cuerpo lúteo de rata.

Los ovarios fueron cortados, colagenizados y homogeneizados en PBS (buffer fosfato salino, pH 7,4). El homogenato fue luego centrifugado a 4°C en una centrífuga internacional B-20 a 800xg durante 15 min., 12.000 xg durante 30 min. y una ultracentrífuga Beckman LS-50 a 105.000 xg durante 60 minutos. Los diferentes pellets fueron resuspendidos en PBS y se determinó la unión específica de ^{125}I -Ins en 100 μl de las suspensiones que contenían 400-700 μg de proteína. La unión del sobrenadante de 105.000 xg (citosol), se midió por precipitación con 12,5% de polietilenglicol

a) I-LH y B-LH en ratas ovariectomizadas (ovx) tratadas o no con Eb en los grupos C, D e I.

La tabla V muestra los valores de I-LH y B-LH en ratas ovx. El estado diabético se asocia a una marcada reducción (63%) en los valores de I-LH. El tratamiento con Eb (10 ug/rata 48 y 24 hs. antes del sacrificio) indujo una disminución en I-LH en todos los grupos experimentales (50%) sin embargo los animales diabéticos mostraron niveles menores aún después del tratamiento con Eb. Los valores de I-LH se normalizaron completamente luego de la terapia insulínica. Se obtuvieron resultados similares en las mediciones de B-LH observándose una disminución aún mayor en la bioactividad de LH (73%) (Tabla V).

La Tabla VI muestra los cocientes entre B-LH e I-LH en estos grupos. El cocientes es significativamente menor en el grupo D mientras que el grupo I muestra valores similares al grupo C. Los animales D tratados con Eb no presentaron cambios en los cocientes B-LH/I-LH (Tabla VI).

Se determinaron asimismo los valores de FSH circulantes por RIA (Fig. 21). Dichos valores mostraron alteraciones similares a los valores de I-LH en los animales diabéticos. Se observó un restablecimiento en el grupo I. El tratamiento de los tres grupos con E indujo un efecto de feedback negativo que hizo descender los niveles de FSH aproximadamente a la mitad en todos los grupos, manteniéndose en los animales estrogenizados la disminución significativa del grupo D respecto al C.

TABLA V: Efecto de la diabetes inducida por estreptozotocina y de la terapia insulínica sobre los valores de I-LH y B-LH en ratas hembra ovariectomizadas (ovx).

	I-LH SERICA (ng/ml)		B-LH SERICA (nU/ml)	
	—	Eb	—	Eb
OVX-C	545 \pm 67	243 \pm 18	44,6 \pm 7	14,1 \pm 0,9
OVX-D	202 \pm 37 *	106 \pm 10 *	12,0 \pm 3 *	7,6 \pm 0,6 *
OVX-I	495 \pm 49	208 \pm 77	44,0 \pm 4	15,9 \pm 4

Los valores de LH séricos fueron determinados en ratas ovx que recibieron o no tratamiento con benzoato de estradiol (Eb) 48 y 24 hs. antes del experimento (10 ug/rata). Las comparaciones estadísticas se hicieron con respecto al grupo control (* p < 0,005) (n= 6). Los valores se expresan como promedio \pm ES/

TABLA VI: Efecto de la diabetes inducida por estreptozotocina y de la terapia insulínica sobre los cocientes B-LH/I-LH.

	LHRH			
	Eb		Eb	
OVX-C	2,38±0,28	1,88±0,16	2,19±0,28	1,96±0,23
OVX-D	1,70±0,10*	2,19±0,52	1,47±0,12 *	2,22±0,34
OVX-I	2,69±0,24	2,14±0,09	1,48±0,15 *	3,64±0,87

Ratas hembra ovx fueron tratadas con vehículo o benzoato de estradiol (Eb) (10 ug/rata durante dos días). Se administró LHRH 100 ng/0,25 Kg peso). Los valores de B-LH fueron transformados utilizando los equivalentes apropiados. Las comparaciones estadísticas se hicieron con respecto al grupo control (*P < 0,05) (n= 6). Los datos se expresan como promedio ± ES.

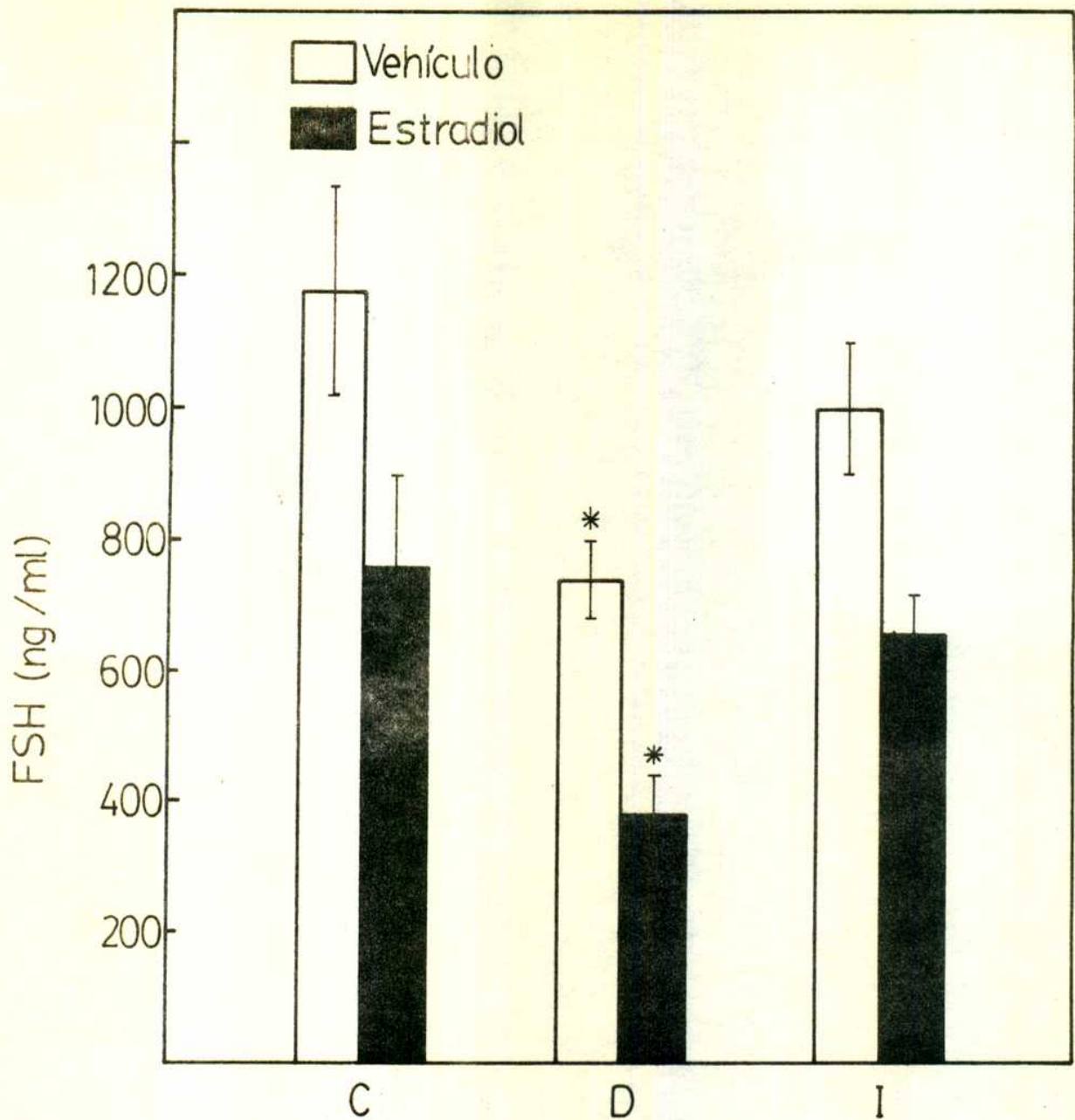


Fig. 21: Efecto de la diabetes inducida por STR y de la terapia insulínica sobre los valores de FSH en ratas hembra ovariectomizadas (ovx). Los valores séricos de FSH fueron medidos por RIA en ratas ovx que recibieron o no tratamiento con Eb 48 y 24 hs. antes del experimento (10 ug/rata). Las comparaciones estadísticas se hicieron con respecto al grupo C (* $p < 0,05$). Los valores son promedio \pm ES (n= 6).

Respuesta hipofisaria a la administración de LHRH en ratas C, D e I.

En condiciones basales, tanto los valores de I-LH como los B-LH se encontraron disminuidos en el grupo D y se restauraron por terapia insulínica (Fig. 22). No se observaron diferencias en la respuesta hipofisaria a la LHRH entre los grupos cuando se determinaron los niveles de I-LH (Fig. 22, panel superior). Sin embargo el grupo D mostró valores de B-LH significativamente disminuidos. El tratamiento con Ins no fue capaz de restituir esta respuesta.

Los valores de B-LH/I-LH (Tabla VI) muestran cocientes significativamente menores en los grupos D e I tratados con LHRH respecto al control.

Respuesta hipofisaria a LHRH en animales C, D e I tratados con Eb.

El tratamiento con estradiol indujo un feed back positivo sobre la sensibilidad hipofisaria a la LHRH. La Figura 23 muestra que la administración de LHRH provocó incrementos similares en I-LH y B-LH en todos los grupos experimentales. Esto indica que el tratamiento con Eb restauró la bioactividad de la LH liberada en respuesta a la LHRH en ratas del grupo D.

La Tabla VI muestra los cocientes B-LH/I-LH correspondientes. Mientras que no se observaron cambios en el grupo D, el cociente se encontró un poco aumentado en el grupo I.

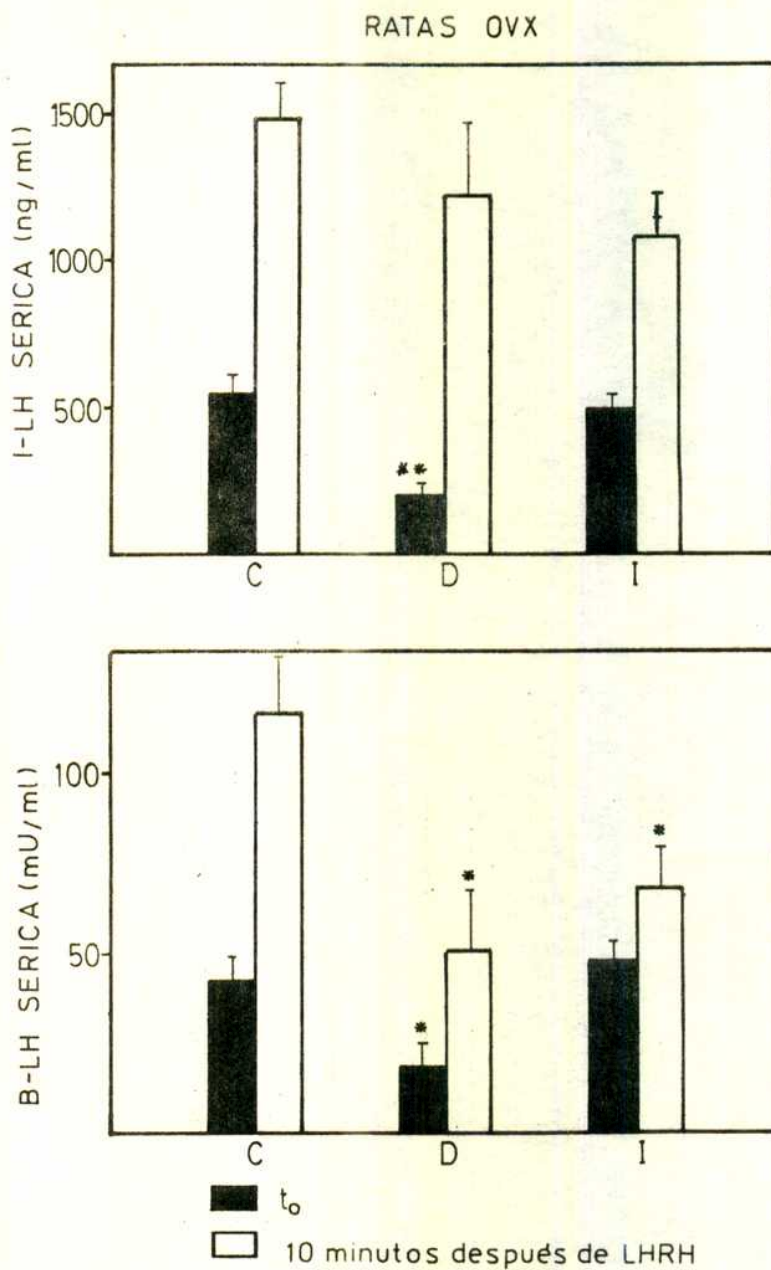


Fig. 22: Respuesta hipofisaria a la LHRH en ratas ovx C, D e I. El panel superior muestra los niveles de I-LH y el inferior los niveles de B-LH. El experimento fue repetido tres veces y los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$) con respecto al control por el test-t de comparaciones múltiples de Dunnett ($n = 6$).

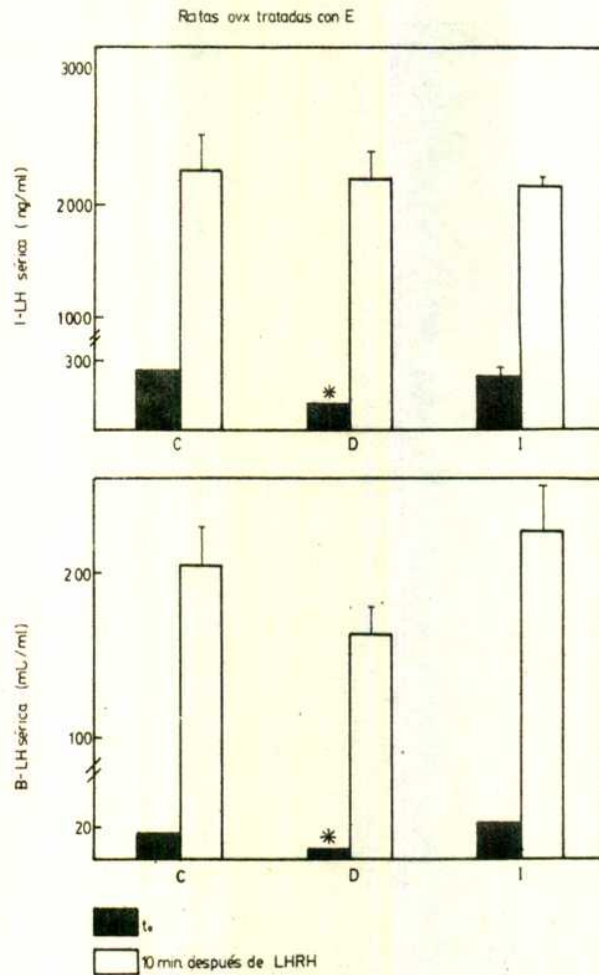


Fig. 23: Respuesta hipofisaria a la LHRH en ratas C, D e I tratadas con Eb. El Eb se administró 48 y 24 h_s antes de la inyección de LHRH (10 ug/rata sc). El panel superior muestra los valores de I-LH y el inferior los de B-LH. El experimento fue repetido dos veces y los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,005$) con respecto al control por el test-t de comparaciones múltiples (método de Dunnett) (n= 6).

b) Prl sérica en ratas C, D e I tratadas o no con Eb.

La mitad de las ratas de cada grupo C, D e I fue tratada con 10 ug/rata sc 48, 24 y 1 hora antes del sacrificio. Este tratamiento indujo en las ratas C un aumento de 10 veces en la concentración circulante de Prl (medida por RIA). Este aumento no se observa en las ratas D y se recupera parcialmente en el grupo I (Fig. 24).

Respuesta prolactínica a la TRH en grupos C, D e I.

La Figura 25 muestra que esta respuesta también se encuentra alterada en el grupo D y parcialmente recuperada en el grupo I. Estas alteraciones podrían deberse a defectos en la síntesis o liberación de Prl o bien a deficiencias en la acción de estradiol a nivel hipotalámico o hipofisario. Para comprobar la segunda hipótesis se encaró el estudio de los niveles de receptor de estradiol en ambos tejidos.

c) Receptores hipotalámicos e hipofisarios de Estradiol en ratas C, D e I.

La Figura 26 muestra el gráfico de Scatchard para la unión de [^3H] - E a citosol de hipófisis e hipotálamo de ratas control ovx. El número de sitios Q fue de 214 fmoles/mg proteína y 98,8 fmoles/mg proteína y los valores de Kd fueron de 3,7 y 2,9 nM para hipófisis e hipotálamo respectivamente. Los gráficos de Scatchard para la unión de [^3H]- E a fracción

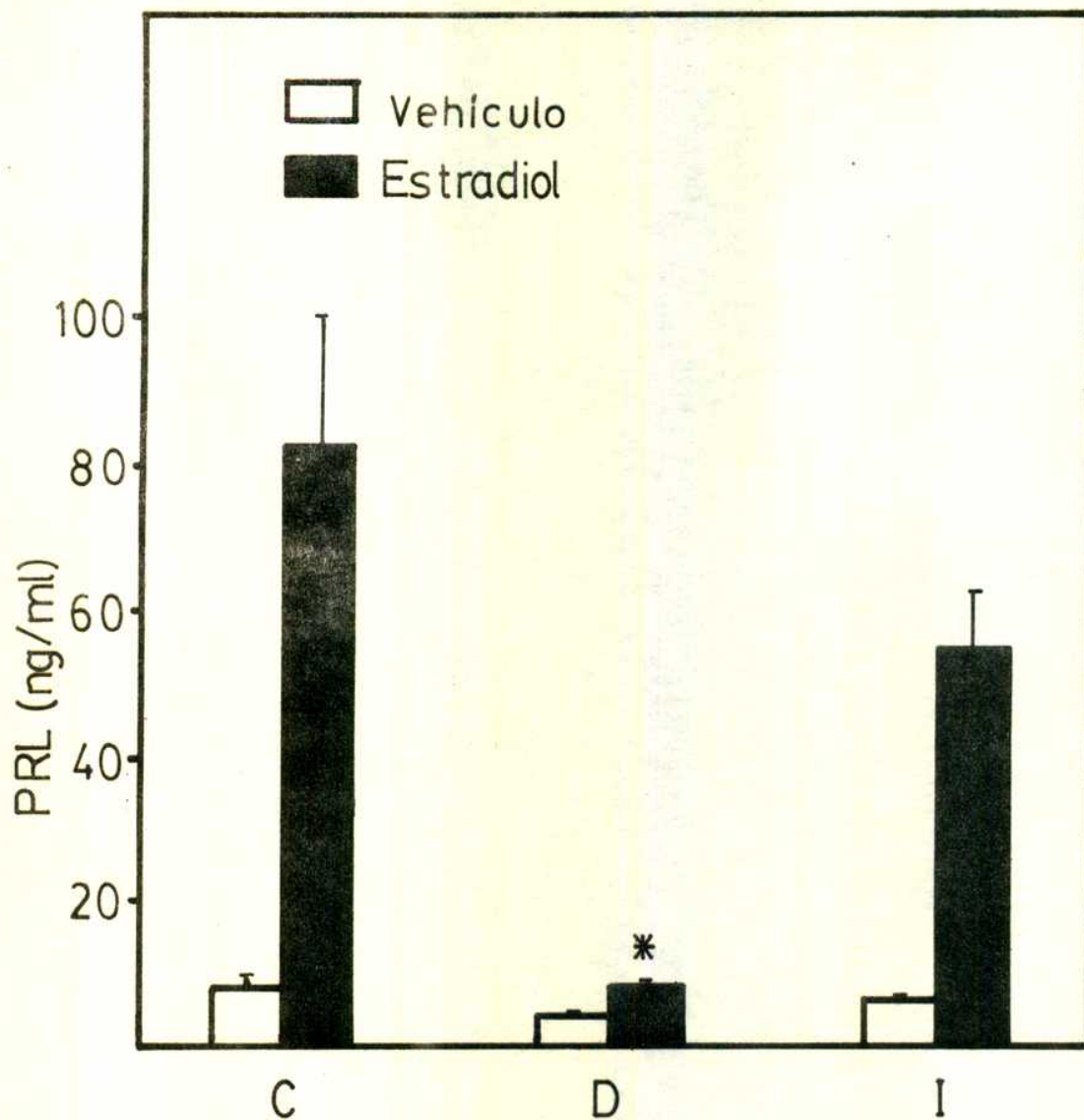


Fig. 24: Respuesta prolactínica al estradiol en ratas C, D e I. El tratamiento con Eb fue con dosis de 10 μg / rata 48, 24 y 1 h antes del exp. El experimento fue repetido tres veces y los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,005$) con respecto al control por el test de comparaciones múltiples (método de Dunnett) ($n = 6$).

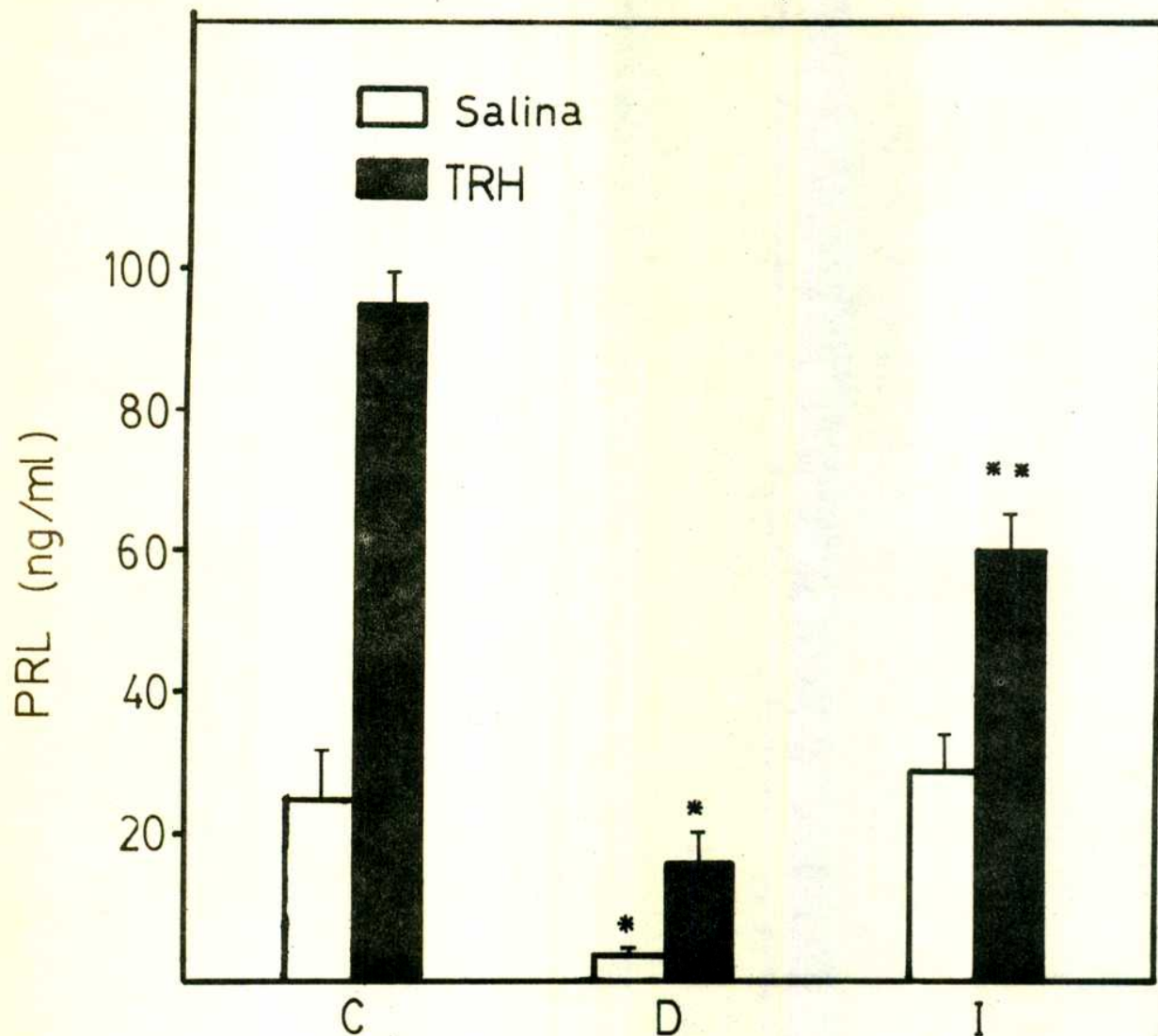


Fig. 25: Respuesta prolactínica a la TRH en ratas C, D e I tratadas con Eb 48 y 24 hs. antes del experimento (10 ug/rata sc). Las ratas fueron inyectadas con TRH (4 ug/kg peso) 15 minutos antes del sacrificio. El experimento fue repetido dos veces y los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$) con respecto al control por el test de comparaciones múltiples (método de Dunnett ($n= 6$)).

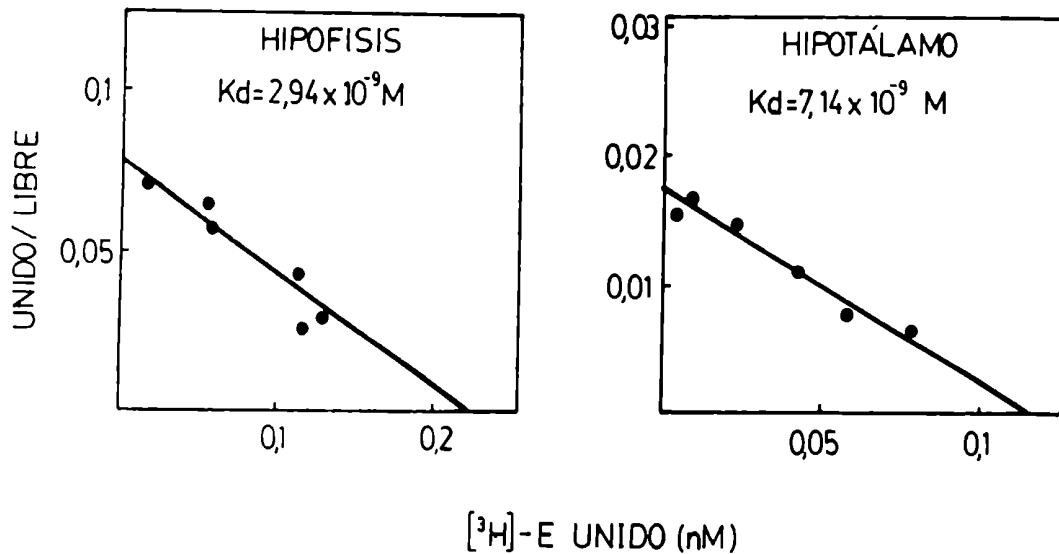


Fig. 26:3 Gráficos de Scatchard de la unión específica [³H]-E a fracción citosólica de hipófisis e hipotálamo de ratas ovx. La determinación de los sitios de unión se realizó mediante una técnica de intercambio (ver Métodos). K_d = 3,7 nM y Q = 214 fmoles/mg. proteína para hipófisis y K_d = 2,9 nM y Q = 98,8 fmoles/mg. proteína para hipotálamo.

nuclear de hipófisis e hipotálamo (realizados en ratas tratadas con Eb, 48, 24 y 1 hora antes del experimento) se muestran en la Fig. 27. Se obtuvieron valores de Q de 456 fmol/mg ADN y 385 fmoles/mg ADN y de Ka de 2,94 y 7,14 nM para hipófisis e hipotálamo respectivamente. En los experimentos siguientes se realizaron incubaciones con 10 nM de [3 H]- E para hipófisis y 5 nM para hipotálamo en citosol y núcleos ya que dichas concentraciones fueron saturantes.

La Figura 28 muestra los niveles de receptor nuclear de E en hipófisis de ratas tratadas con Eb en los tres grupos experimentales. Se observó una disminución significativa de dichos receptores expresados en fmoles/mg ADN en los grupos D e I. Estos resultados se pueden correlacionar con los bajos valores de Prl sérica observados en los animales diabéticos estrogénizados. Se realizaron asimismo determinaciones de los receptores citoplasmáticos en animales ovx no inyectados (Fig. 29). Se observó también un menor tenor de receptores en los animales diabéticos y una recuperación parcial en los animales tratados con I.

La Figura 30 muestra la unión del [3 H]- E a fracción nuclear hipotalámica en animales tratados con E. Se observó una disminución de los niveles de receptores de E en animales diabéticos y una aparente recuperación de este parámetro en el grupo I. En este caso también la determinación de los niveles de receptor citoplasmático de E indica una disminución significativa en el grupo D y una recuperación por el tratamiento insulínico (Fig. 31).

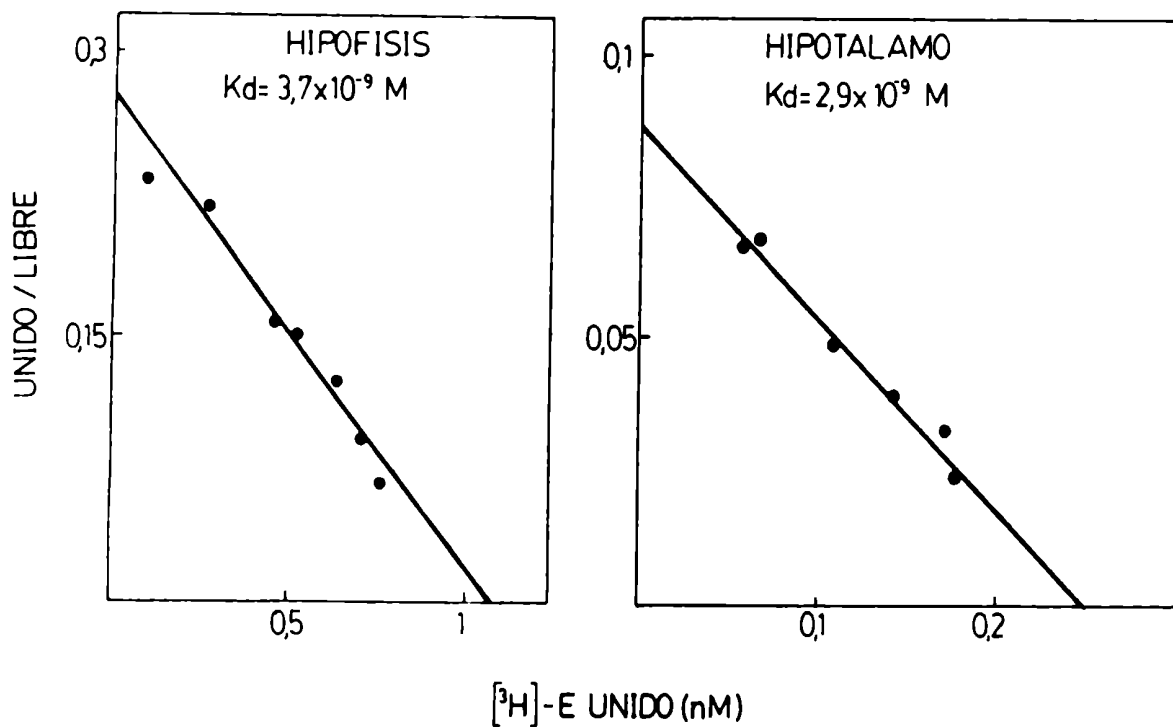


Fig. 27: Gráficos de Scatchard de la unión específica de [³H]-E por la hipófisis anterior e hipotálamo de ratas ovx tratadas con Eb (10 ug/rata, 48, 24 y 1 h antes del experimento). $K_d = 2,94$ y $Q = 456$ fmol/mg ADN para hipófisis y $K_d = 7,14$ nM y $Q = 385$ fmol/mg ADN para hipotálamo.

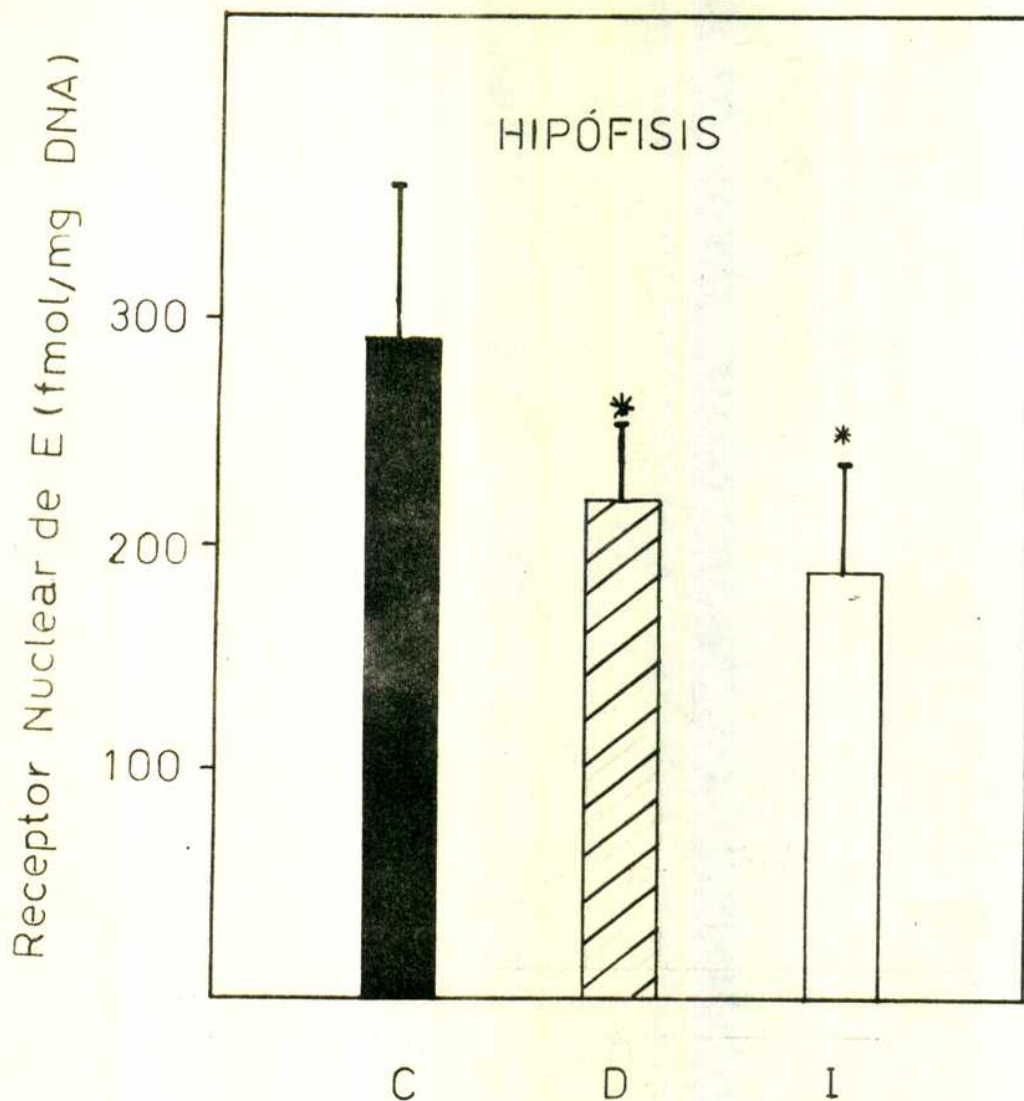


Fig. 28: Receptores de E nuclear en pituitarias de animales C, D e I. Las ratas fueron inyectadas con Eb (10 ug/rata sc) 48, 24 y 1 h. antes del experimento. Los niveles de receptor fueron determinados por técnica de intercambio (ver Métodos). El experimento fue repetido tres veces y los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$) con respecto al control por el test-t de comparaciones múltiples (método de Dunnett).

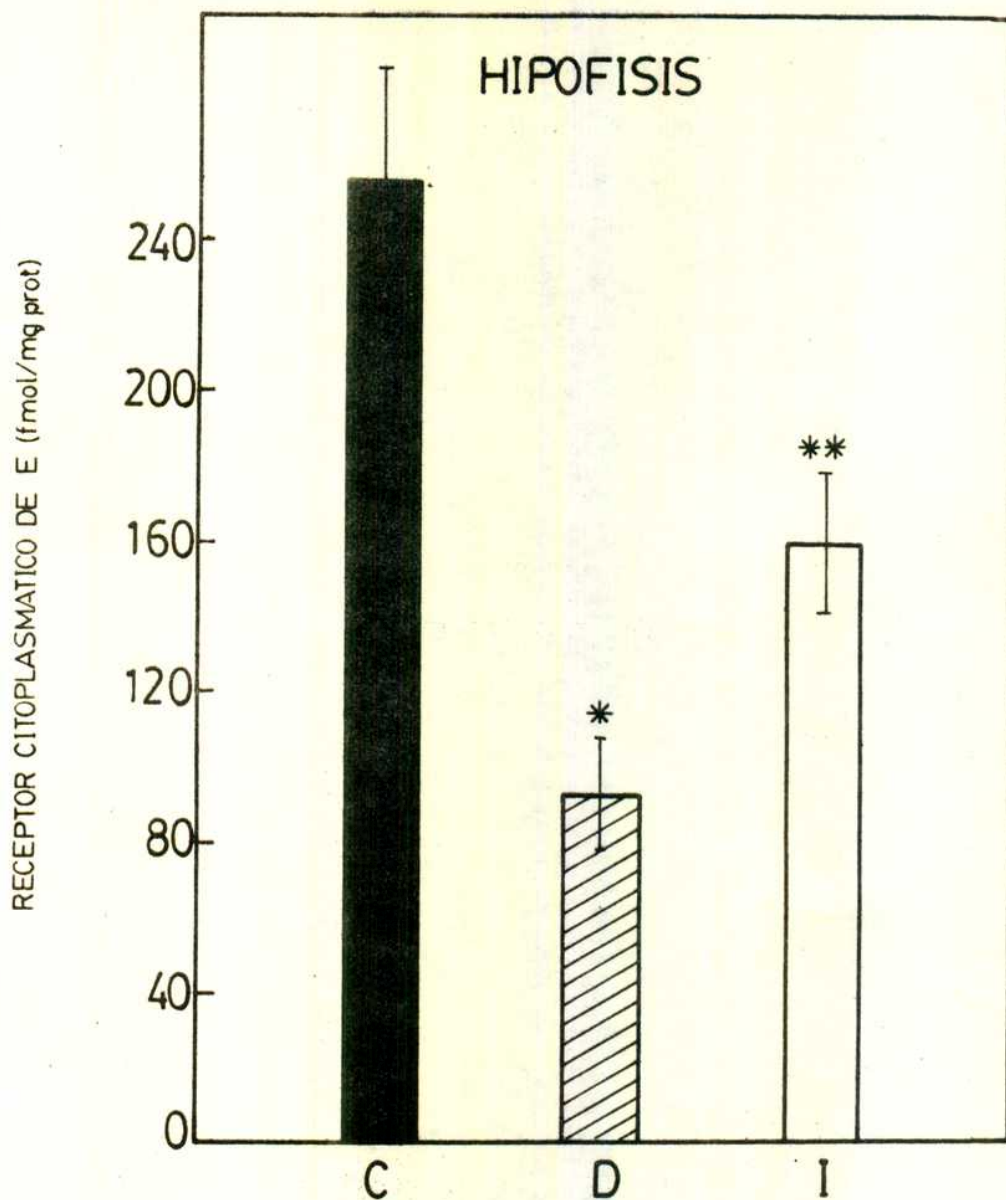


Fig. 29: Receptores de E citoplasmáticos hipofisarios de animales C, D e I, ovx. El experimento fue repetido tres veces y los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$) con respecto al grupo C por el test-t de Dunnett.

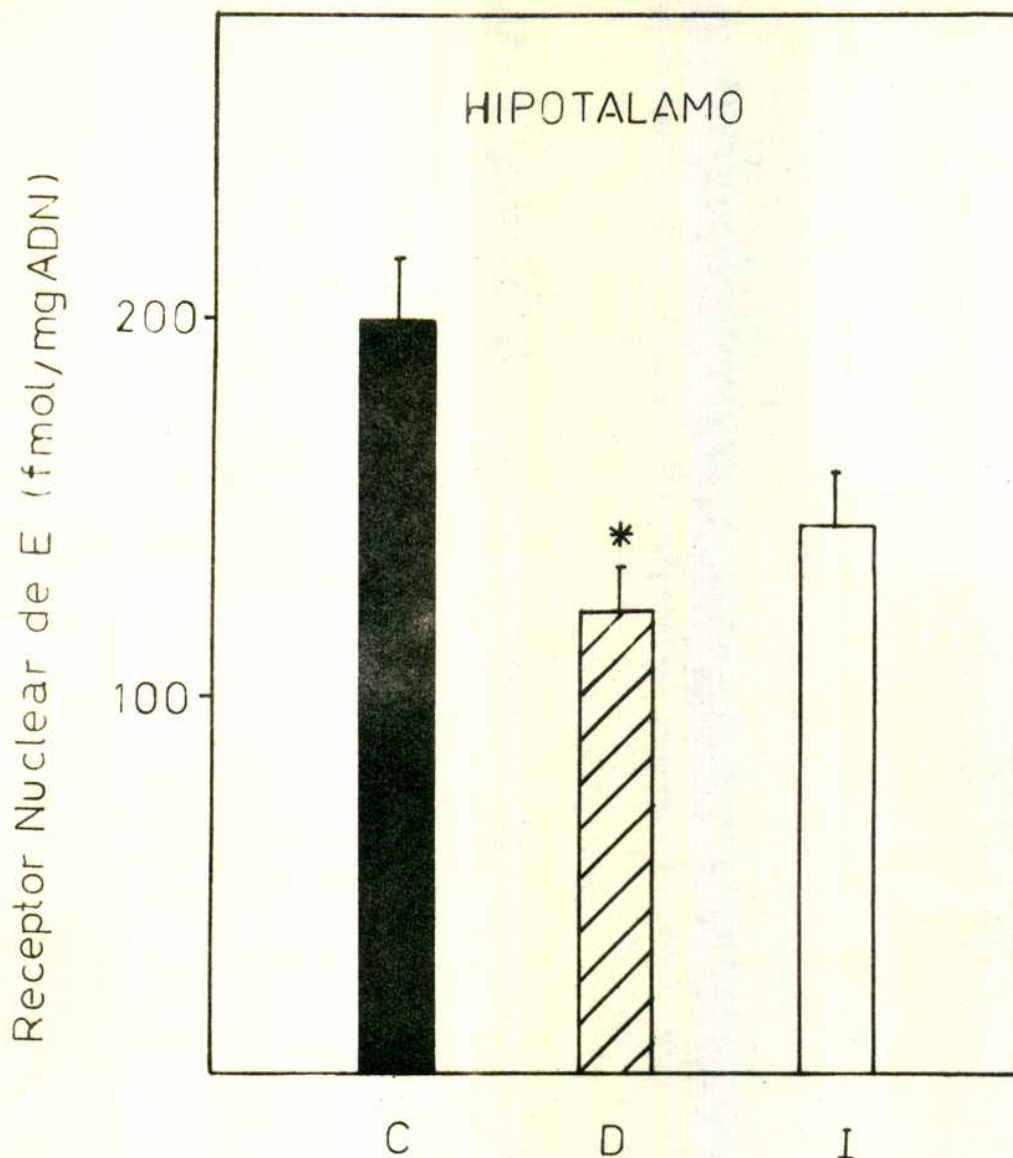


Fig. 30: Receptores de E nucleares hipotalámicos de animales C, D e I. La administración de Eb y la determinación de los receptores se describen en la Fig. 28. El experimento fue repetido tres veces y los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$) con respecto al grupo C por el test-t de Dunnett.

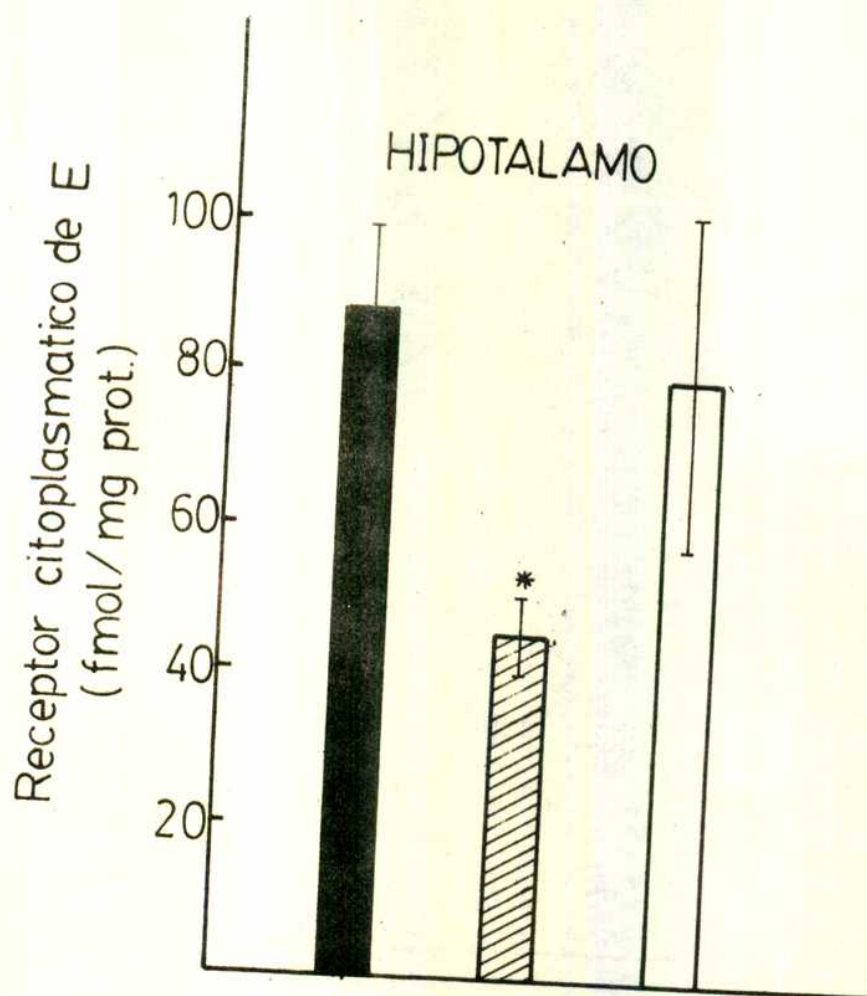


Fig. 31: Receptores de E citoplasmáticos hipotalámicos en animales C, D e I, ovx. El experimento fue repetido tres veces y los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$) con respecto al grupo C por el test - t de Dunnett.

D I S C U S I O NA. ACCION DE LA INS SOBRE LA REGULACION ENDOCRINA DE LA
FUNCION REPRODUCTIVAA.I Alteraciones ováricas en ratas diabéticas por STR

Los resultados expuestos muestran claramente una disminución de la capacidad esteroidogénica ovárica y específicamente de las células luteales de ratas diabéticas por STR, como se evidencia por los bajos niveles plasmáticos de P y por la menor sensibilidad en cuanto a respuesta esteroidogénica al estímulo gonadotrófico. La terapia sustitutiva con Ins recuperó estos parámetros.

Los bajos niveles circulantes de P en animales diabéticos pueden deberse o bien a una disminución en la síntesis o secreción de P ovárica o bien a un elevado ritmo de metabolización de la hormona. En este sentido cabe destacar un estudio reciente de Ekka y col. (289) acerca de la aceleración de la metabolización pentérica de estradiol en ratas diabéticas por STR. Sin embargo los resultados obtenidos "in vitro" con ovario entero mostrando una menor respuesta esteroidogénica en ratas diabéticas dan apoyo a la primera hipótesis. Esta asimismo respalda los estudios preliminares de Liu y col. donde

describen valores plasmáticos normales de LH en ratas diabéticas por aloxano. Dichos autores sugieren que las alteraciones ováricas estarían relacionadas con una menor sensibilidad a las gonadotrofinas (253).

En el ovario de rata han sido identificados receptores a gonadotrofinas y Prl con alta afinidad y especificidad (290). Los resultados obtenidos en este trabajo indican asimismo la presencia de una sola clase de sitios específicos de unión para cada hormona con alta afinidad.

Los menores niveles de receptor de LH en membranas de ovario de ratas diabéticas en diestro podrían explicar, al menos en parte, la menor sensibilidad al estímulo gonadotrófico. La diabetes redujo en un 43% el valor normal de número de sitios de unión a LH (8,1 en ratas D vs. 14,0 fmoles/mg de proteína en ratas C). No se evidenciaron cambios significativos en la constante de asociación (K_a del orden de $10^{10} M^{-1}$). No se encontraron diferencias ni en K_a ni en Q en los receptores de Prl y FSH, lo cual descarta que las alteraciones observadas se deban a un efecto inespecífico sobre el ovario.

Sin embargo, los datos obtenidos en ovario entero de ratas en diestro podrían atribuirse a la heterogeneidad celular característica de cualquier estadio del ciclo estral. Los ovarios de ratas control en diestro pueden poseer varios folículos en diversos grados de madurez, folículos atrésicos y cuerpos lúteos en regresión. Los ovarios de ratas diabéticas poseen fun-

damentalmente folículos pequeños, folículos atrésicos y numerosos cuerpos lúteos pero es poco probable que posean algún folículo preovulatorio (249). Por lo tanto resulta difícil establecer comparaciones entre ambos grupos experimentales. El modelo utilizado de superovulación por tratamiento con gonadotrofinas, evita la heterogeneidad de poblaciones celulares. Mediante este artificio se induce la luteinización de todas las células foliculares presentes obteniéndose ovarios con poblaciones celulares homogéneas (más del 90% son células luteales)(133).

En este punto es importante destacar el éxito del tratamiento con gonadotrofinas en cuanto a la inducción de superovulación en las ratas diabéticas. Esto indica que la disminución observada en los receptores a LH y en la sensibilidad a esta hormona no fue obstáculo para la respuesta ovulatoria y de diferenciación celular inducida por la administración de PMSG y hCG.

Se continuaron por lo tanto los estudios en células luteales aisladas por tratamiento con colagenasa de los tres grupos experimentales: C, D e I. Se observó también en estas células un menor número de receptores de LH en ratas diabéticas (disminución de alrededor del 50%) y una recuperación de este parámetro en el grupo diabético tratado con Ins, manteniéndose inalterada la K_a ($1,1 \times 10^{10} M^{-1}$).

Las incubaciones de células luteales de los tres grupos experimentales mostraron una menor sensibilidad de las células

del grupo D al estímulo gonadotrófico en cuanto a la producción de P aunque a concentraciones mayores de hCG (10 ng) se obtiene una estimulación máxima similar a los controles. Las células de los animales del grupo I no mostraron diferencias con los controles.

Cuando se midió el AMPc total producido en las incubaciones "in vitro" en respuesta a hCG, tanto en ovario entero como en células luteales se observó un aumento de la producción de AMPc en el grupo D. El tratamiento con Ins no logró normalizar totalmente esta hiperrespuesta. En hígado, riñón y pulmón de ratas diabéticas por STR ha sido descrito también un aumento en los niveles de AMPc (291, 292). Este fenómeno podría atribuirse a una estimulación de la adenilato ciclasa en ratas diabéticas. En este sentido es importante mencionar que las mediciones preliminares de esta enzima en células luteales han evidenciado un marcado aumento de esta actividad enzimática en ratas diabéticas respecto a los controles (293). Esto permite suponer que en principio una de las acciones de la Ins en células luteales sería la de regular, mediante una acción inhibitoria, la actividad de la adenilato ciclasa. El descenso en los niveles de Ins en la diabetes sería causante del desenfreno de esta enzima, resultando en niveles más altos del nucleótido cíclico. Por otra parte hay que tener en cuenta que las incubaciones se realizaron en presencia de un inhibidor de fosfodiesterasa, el MIX, lo cual permite correlacionar correctamente el

aumento de AMPc con el aumento de la actividad de ciclasa.

Sin embargo no es posible atribuir la menor sensibilidad en cuanto a producción de P de células luteales u ovarios de ratas diabéticas solamente a la disminución observada en los receptores LH dado que está demostrado en ciertos tejidos esteroideogénicos que para producir la estimulación máxima de esteroides basta con la ocupación del 1% de los receptores de LH (294). La ausencia de una disminución en los niveles de AMPc en el grupo D dentro del rango de concentraciones de hCG (entre 0 y 1 ng) en el que se observan las diferencias en cuanto a producción de P, podría indicar también que ambos parámetros alterados, receptores y respuesta, no están vinculados. Sin embargo la discrepancia entre las curvas dosis-respuesta para AMPc y P ha sido atribuida a la existencia de cambios en pools específicos de AMPc (295) o en el AMPc unido a la proteína quinasa (296) que no pueden detectarse con los métodos corrientes.

Los estudios de Charreau y col. realizados en ratas macho diabéticas (149) describen una disminución en el número de receptores para LH sin alteraciones en la K_a ni en los coeficientes de sedimentación de los complejos LH/hCG-receptor. Se ha postulado que la marcada alteración en el metabolismo hidrocarbonado del animal diabético podría provocar un cambio en la región de hidratos de carbono de la molécula del receptor de LH. Como consecuencia el receptor podría estar en parte inactivado o disminuida su síntesis. Se podría suponer que este mecanismo

ocurre en ambos sexos.

Los resultados de las determinaciones de la actividad de PDE ovárica de animales de los grupos C, D e I señalan un aumento de dicha actividad enzimática en el grupo D. Esto puede explicarse teniendo en cuenta la estimulación previamente mencionada de la adenilato ciclase ovárica de ratas diabéticas responsable de la incentivación de la producción lútea de AMPc en respuesta al estímulo con hCG (Fig. 7). El aumento de los niveles del nucleótido cíclico induce necesariamente a una activación por sustrato de la PDE, como ha sido descrito para la estimulación por FSH vía AMPc de la PDE de células de la granulosa (284). Este fenómeno explicaría, al menos en parte, la mayor actividad de esta enzima en los ovarios de los animales diabéticos. Estudios realizados sobre la actividad de PDE de ratas diabéticas en adipocitos describen asimismo una activación de esta enzima (297). Estas evidencias y las anteriores descritas en este punto sugieren que mecanismos semejantes tienen lugar en distintos tejidos en el estado diabético.

A.II Acción "in vitro" de la Ins sobre células luteales. Receptores de Ins

Los resultados obtenidos en ratas diabéticas demuestran la presencia de alteraciones bioquímicas ováricas, en particular en células luteales de animales superovulados. Se ha sugerido

que estas alteraciones se producen debido a la ausencia de Ins en el estado diabético. Sin embargo es claro que en dicho estado se evidencian diversas fallas metabólicas secundarias a la ausencia de Ins, que podrían causar por sí mismas los efectos observados. El hecho comprobado de que la administración de Ins restablece, en muchos casos a normalidad, los parámetros alterados en el estado diabético, podría indicar una acción directa de la hormona sobre el ovario. No obstante nuevamente no puede descartarse que la acción primaria se ejerza sobre el estado diabético en general y que sea este restablecimiento lo que provoque la mejora a nivel ovárico.

De ser cierta la hipótesis de la acción directa de la Ins sobre células luteales, consecuentemente con el postulado de que toda hormona peptídica para ejercer su acción debe unirse a un receptor específico ubicado en la membrana plasmática, debería encontrarse un sitio de unión para esta hormona.

Estudios previos han demostrado que la Ins posee receptores de alta afinidad en células de la granulosa (177). Sin embargo no existen evidencias acerca de la presencia de estos receptores en células luteales. En el presente trabajo se ha demostrado que la Ins posee receptores específicos de alta afinidad (K_a de $2,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ con 35.000 sitios por célula para el primer sitio). Este hallazgo es el primer paso en la elucidación del mecanismo de acción de esta hormona a nivel de las células luteales. Por otra parte es importante destacar la naturaleza

curvilínea del gráfico de Scatchard para la unión de Ins. Esta característica del receptor de Ins ha sido observada en casi todos los tejidos efectores de esta hormona (372). Se ha sugerido como causa de ello la heterogeneidad de sitios de unión, es decir, la presencia de dos sitios, uno de alta afinidad y baja capacidad (primer sitio) y otro de menor afinidad y alta capacidad (segundo sitio). Mediante un programa de computadora diseñado por Thakur y col. (152) que permite calcular los valores de K_a y Q de ambos sitios se han obtenido los valores de ambas K_a y Q ($K_{a1} = 2,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $K_{a2} = 5,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$; $Q_1 = 35.000$ y $Q_2 = 900.000$ sitios por célula). Sin embargo no puede descartarse la hipótesis de la existencia de un solo sitio de unión cuya afinidad disminuye con la unión de la hormona (cooperatividad negativa) (298). Se ha determinado asimismo la especificidad de la unión frente a hormonas heterólogas (hCG, hGH, hLH, oPrl, EGF).

La curva de tiempo de la unión de Ins a diferentes temperaturas se utilizó para determinar las condiciones óptimas de incubación: 30 minutos a 20°C . La menor unión observada a 37°C respecto a 20°C fue descrita en tres sistemas celulares (176, 299). Esto se atribuye a una aceleración de los procesos degradativos ya sea de la hormona (300) y/o del receptor (301) a 37°C .

Las restantes características del receptor de Ins: naturaleza proteica y distribución subcelular son análogas a las

descriptas para este receptor en otros tejidos (302). Es interesante observar el leve aumento de la unión específica de Ins provocado por la incubación con fosfolipasa C (Tabla III). Este fenómeno ha sido previamente descrito y se debería a un desenmascaramiento de receptores provocado por alteraciones en la membrana (303).

La demostración de las propiedades de alta afinidad, baja capacidad, especificidad, saturabilidad, con las que cumple la molécula ligadora de Ins no son suficientes para que dicha molécula sea considerada como un verdadero receptor de Ins. La condición imprescindible para que un receptor sea considerado verdaderamente como tal es la asociación del mismo con una respuesta biológica. Por esta razón revisten fundamental importancia las evidencias presentadas relacionadas con la capacidad de la Ins de producir acciones biológicas específicas. En relación a esto, los resultados presentados indican que la Ins estimula la producción de progesterona "in vitro" en ausencia de estímulo gonadotrófico alguno, y que dicha hormona amplifica la acción estimuladora de hCG a concentraciones que inducen una respuesta submáxima. Esta acción se ejerce sin aumentos detectables en los niveles de AMPc. Esto no es de extrañar ya que es conocida la acción inhibitoria de esta hormona sobre la enzima adenilato ciclasa (304). Sin embargo, nuevamente no puede descartarse la intermediación de un pequeño aumento del AMPc intracelular, no detectado por el método utilizado para su determinación (295,296).

Es posible asimismo, que un cierto nivel de dicho nucleótido sea necesario para que la estimulación por Ins tenga lugar, a juzgar por los resultados obtenidos en ausencia de MIX (Fig. 11).

La estimulación de la producción de P por Ins podría ser consecuencia o bien de la inducción de enzimas del camino biosintético de P, salteando una elevación intermedia de AMPc o bien de una estimulación de la accesibilidad de los precursores endógenos a las enzimas biosintéticas. No puede descartarse en principio un efecto de la Ins como inhibidora del catabolismo de la P o como estimuladora de su secreción a través de una modificación de la permeabilidad de membrana (305). Por otra parte esta acción es específica de la Ins, ya que el EGF, factor que al igual que la Ins actúa estimulando la proliferación celular, no produjo efecto alguno sobre la producción luteal de P.

Es importante resaltar que la concentración de Ins requerida para la estimulación de la respuesta máxima de P (1 ng/ml) se encuentra dentro del rango fisiológico normal (1 a 4 ng/ml). Otros trabajos que describen efectos estimulatorios de la Ins en células gonadales sólo muestran acciones de la hormona a mayores concentraciones que las fisiológicas (181, 180, 195). Estos autores atribuyen las altas dosis de Ins necesarias para producir la respuesta biológica a la absorción de la hormona al tubo o a su degradación durante la incubación. En el presente trabajo las incubaciones de células luteales se realizaron en presencia de BSA 0,5%, que impide la pegada a tubo de la hormona.

Por otra parte se ha descrito que la velocidad de degradación de la hormona es proporcional a su concentración (373), lo cual invalidaría en principio el segundo argumento empleado por dichos autores.

La ausencia de la acción estimuladora de Ins sobre la producción lútea de P en presencia de los inhibidores utilizados indica que dicho efecto depende de síntesis de RNA y proteínas. Por otro lado estos resultados descartan que la acción de la Ins esté mediada por: a) un estímulo de la secreción de P presintetizada; b) una inhibición del catabolismo de P; o c) una activación de la 3β HSD, por ser estos eventos posteriores a la enzima SCC que hubieran persistido en presencia de un inhibidor (aminoglutetimida).

Los trabajos de Veldhuis y col. recientemente publicados (306, 307) apoyan estos resultados. Estos autores describen la estimulación por Ins de la producción de P de células de la granulosa porcina en cultivo, que también se inhibe por cicloheximida y actinomicina. En este estudio se muestra que la Ins aumenta el contenido mitocondrial de citocromo P-450 y que activa la enzima SCC y los autores atribuyen a ello el requerimiento de síntesis proteica y de ARN. Por otro lado estos estudios muestran la acción sinérgica de la Ins con FSH, LH, epinefrina, etc. y describen asimismo efectos estimulatorios sobre la producción de 20α -OH P. La disminución de la estimulación observada a ma-

yores concentraciones de Ins en este trabajo (Fig. 10) podría deberse a un posible efecto estimulador de la Ins, sobre la actividad de la 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Se han publicado estudios caracterizando la acción y los receptores de IGF I y II (somatomedina C y factor estimulador de la multiplicación) en células de la granulosa porcina (306, 308). Sin embargo, teniendo en cuenta los recientes hallazgos de Veldhuis y col. (309) en estas células, sobre la inhibición producida por un antisuero anti-receptor de insulina del efecto estimulador de la Ins y la inducción por Ins de la fosforilación de la subunidad β de su propio receptor, las acciones de esta hormona en células de la granulosa porcina, ocurrían a través de la unión a su propio receptor y no a receptores de los IGF. No obstante, en células de la granulosa no puede descartarse que ciertos efectos tengan lugar a través de la acción de los IGF, dada su alta concentración en el fluido folicular. Las células luteales, por el contrario, reciben las señales hormonales de la circulación, donde los IGF se encuentran unidos a proteínas transportadoras siendo por lo tanto su concentración libre plasmática prácticamente nula (310).

Los experimentos de estimulación por Ins en células luteales fueron realizados en presencia de MIX, inhibidor de la PDE ya que, en su ausencia, no se evidencia estimulación alguna (Fig. 11). Esto sugiere un posible efecto de la hormona sobre la actividad de la enzima PDE.

Las determinaciones de la actividad de PDE en células luteales luego de la preincubación con Ins, demuestran una acción estimuladora de esta hormona sobre la enzima. Dicha estimulación es dependiente de la concentración de Ins y del tiempo de incubación y es máxima a 0,2 nM, concentración que se encuentra dentro del rango fisiológico.

La Ins estimula dos formas enzimáticas de PDE-AMPC (picos I y II) de alta afinidad observadas en la fracción citosólica y separadas por cromatografía en columna de DEAE. En tejidos esteroideogénicos se han caracterizado previamente actividades de PDE y su regulación por hormonas hipofisarias (ver Introducción). Sin embargo hasta el presente no había sido estudiada la regulación por Ins de dicha enzima en células esteroideogénicas, siendo los resultados presentados en este trabajo, las primeras evidencias existentes sobre este efecto.

La mayor proporción de la actividad enzimática se encuentra en citosol, concordando estos datos con los resultados de Weber y col. (311) obtenidos en tejido adiposo. Estos autores describen dos formas enzimáticas de alta afinidad para AMPC con cooperatividad negativa a altas concentraciones de sustrato. Una de estas formas fue estimulable por Ins. Los trabajos de Houslay y col. (275) realizados en hepatocitos describen la actividad de PDE estimulable por Ins en fracción particulada aunque aclaran que dicha actividad se encuentra "débilmente unida" a la membrana plasmática y que puede extraerse fácilmente mediante un buffer

hipotónico, como el utilizado en este trabajo.

Los resultados obtenidos indican que ambas formas enzimáticas son diferentes, ya que sólo el pico I hidroliza GMFc. Asimismo la actividad de PDE-AMFc es inhibida por el agregado de GMFc probablemente por un efecto de competencia, mientras que la forma II no se modifica.

Los valores de Km para ambos picos son similares a los obtenidos en células de la granulosa (284). El pico I podría asimilarse al pico I obtenido en dicho trabajo por la semejanza en cuanto a su afinidad por el sustrato AMFc y por su capacidad de hidrolizar asimismo GMFc.

La estimulación de la actividad de PDE por Ins a concentraciones fisiológicas podría estar incluida entre las posibles causas de la menor respuesta de las células luteales frente a los estímulos gonadotróficos (en ausencia de MIX) comparada con la gran sensibilidad de las células de la granulosa. Sería necesario encarar un estudio detallado sobre las variaciones cuantitativas del AMFc unido a proteína quinasa con los diferentes estímulos hormonales para poder comprender cabalmente el significado fisiológico de la acción de la Ins sobre estas células.

A.III Alteraciones en el eje hipotálamo-hipofisario en ratas diabéticas por STR.

Se ha demostrado que la Ins juega un rol determinado en

el metabolismo luteal y que, en el estado diabético se producen alteraciones ováricas que, al menos en parte, se deberían a la ausencia de esta hormona. Sin embargo estas evidencias no pueden ser consideradas como las únicas causantes de los serios disturbios sexuales y reproductivos asociados al estado diabético. Teniendo en cuenta estudios previos describiendo alteraciones a nivel hipotálamo-hipofisario en ratas macho y hembra, se encaró el estudio del funcionamiento de este eje en el modelo experimental de la diabetes por STR.

Los datos presentados en este trabajo demuestran que la liberación de LH post-castración está disminuida en ratas diabéticas por STR y que esta respuesta se restablece por tratamiento con Ins. Por otra parte se ha demostrado que el feedback negativo por administración de E fue efectivo en todos los grupos experimentales, aunque los valores de LH luego del tratamiento con E fueron menores en el grupo D. Esta disminución podría deberse a alteraciones en la síntesis, liberación y/o degradación de la hormona o bien a alteraciones en la liberación de LHRH. Por otra parte la reducción de los valores de B-LH post-castración es mayor que la de las determinaciones de I-LH. Esto indicaría que la LH liberada a mayor amplitud y frecuencia luego de la castración está alterada en las ratas diabéticas. Por otro lado, con fines comparativos, se realizaron determinaciones de FSH circulante por RIA. Los resultados fueron esencialmente idénticos a los presentados para I-LH; lo cual sugiere en princi

cipio, la existencia de alteraciones similares para ambas gonadotropinas. El desarrollo de la técnica de bioensayo para FSH sería necesario para comprobar esta hipótesis.

La región de hidratos de carbono de la molécula de LH parece ser esencial para su reconocimiento por las células blanco (312-314). Las marcadas alteraciones del metabolismo hidrocarbonado asociadas al estado diabético podría afectar el proceso de glicosilación de la LH. En este sentido es importante destacar que la disminución en la liberación de la I-LH luego de la castración en los animales diabéticos no estuvo asociada a deficiencias en la sensibilidad hipofisaria a LHRH exógena, ya que al administrarla no se observaron diferencias en I-LH. Sin embargo nuevamente se evidencia una deficiencia en la LH liberada por este estímulo cuando se determina su actividad biológica. Estos resultados sugieren la existencia de serias alteraciones en la calidad de las glicoproteínas sintetizadas en el estado diabético.

Es un evento conocido que los estrógenos regulan la actividad biológica en ratas macho y hembra (315,316). En este caso se evidencia una restauración de la bioactividad de la LH por tratamiento con Eb que puede observarse analizando los cocientes B/I para ratas ovx con o sin administración de LHRH. Es posible entonces que las alteraciones observadas en el estado diabético se relacionen con la modulación esteroidea de la biosíntesis de LH. Esta acción protectora del E sobre el estado

diabético fue observada ya en 1954 por Houssay y Foglia (317).

Luego de estas observaciones se podrían replantear las causas de la disminución en la LH observada en ratas diabéticas ovx. Por los resultados obtenidos con la administración de LHRH queda eliminada la posible alteración en la secreción de LH o en la sensibilidad hipofisaria a LHRH. La cantidad de hormona sintetizada (o bien el pool de LH intracelular liberable por LHRH) es idéntica en los tres grupos experimentales. Restan entonces tres posibles explicaciones a las diferencias en I-LH post-castración: 1) una mayor degradación periférica debido a la alteración cualitativa de la gonadotropina en el grupo D; 2) una secreción tónica de LHRH disminuida, y 3) una combinación de ambos efectos. Un nuevo análisis de los datos de animales ovx tratados con E arrojan algunas conjeturas. Si fuera cierta la posibilidad "1" el mejoramiento de la B-LH por tratamiento con E impediría la mayor degradación de la LH en las diabéticas y los valores de I-LH deberían ser idénticos. Sin embargo no puede descartarse del todo esta posibilidad ya que la mayor degradación periférica en los diabéticos podría ser independiente de las alteraciones de la molécula.

Kirchick y col. muestran la ausencia del pico de LH en ratas prepúberes, diabéticas por aloxano, luego de la administración de PMSG (318) debido a una respuesta disminuida de la hipófisis a la administración de LHRH en el día del posible proestro (261). Contrariamente, los resultados presentados en este estudio, así

como los de Katayama y col. (319) describen una sensibilidad normal al estímulo de LHRH. Las discrepancias pueden deberse a la diferente sensibilidad hipofisaria de la rata inmadura (319) así como al diferente modelo experimental utilizado. Por otra parte se ha demostrado la presencia de picos preovulatorios de LH disminuidos o retrasados en animales diabéticos (319, 320). Teniendo en cuenta estos resultados Katayama y col. sugieren que la infertilidad asociada al estado diabético, se produce a causa de un impedimento en la liberación de LHRH, en concordancia con la hipótesis sustentada por el presente estudio.

La Ins fue efectiva en la normalización de la mayoría de los parámetros estudiados, lo cual constituye otra evidencia acerca del papel que juega la Ins en la regulación de la función reproductiva en la hembra (262, 180). Sin embargo, la Ins no fue capaz de restablecer la actividad biológica de la LH secretada luego de la estimulación con LHRH en ratas diabéticas ovariectomizadas.

Se podría considerar que la terapia insulínica recupera las lesiones responsables de la disminución de los valores de I-LH y B-LH como respuesta a la castración, mientras que no logra restablecer la actividad biológica de la LH liberada frente al estímulo de LHRH. Esto se podría atribuir a la dificultad en establecer valores fisiológicos y constantes de Ins mediante la terapia insulínica. Ello podría redundar en un mejoramiento relativo de las anormalidades metabólicas asociadas al estado dia

bético. La desnutrición, consecuencia del metabolismo anormal de hidratos de carbono, grasas y proteínas podría ser un factor que contribuye parcialmente a ocasionar los disturbios mencionados.

Por lo tanto queda demostrado que: a) el estado diabético induce una disminución en los valores de B-LH, probablemente debido a alteraciones en la biosíntesis de la región hidrocarbonada de la molécula; b) que el E mejora la B-LH (posiblemente actuando sobre su biosíntesis); c) que la terapia insulínica no restablece la bioactividad de la LH liberada por LHRH en ratas diabéticas y d) que probablemente existan alteraciones en la secreción hipotalámica de LHRH en ratas diabéticas y/o una mayor metabolización periférica de la LH, parámetros estos recuperables en su mayoría por tratamiento con Ins.

El estradiol estimula la secreción y síntesis de Prl actuando tanto a nivel hipofisario como hipotalámico. La disminución de la liberación de Prl en respuesta al tratamiento con E y a la administración de TRH en ratas diabéticas sugiere la existencia de alguna alteración en la acción del E a nivel hipofisario o hipotalámico. Las posibles fallas son numerosas: falta de inducción de los receptores de TRH, ausencia de la disminución de la sensibilidad hipofisaria a la dopamina, impedimento de la acción estimuladora del E sobre la síntesis de Prl hipofisaria, ausencia del antagonismo dopaminérgico a nivel hipotalámico.

La persistencia de una respuesta a la TRH cuatro veces superior a los valores basales en el grupo D, al igual que en los animales control, sugiere que los animales diabéticos poseen la capacidad de respuesta hipofisaria a la TRH. Sería, por lo tanto, probable que la causa de la menor cantidad de Prl liberada frente al estímulo de TRH se debe a una alteración en la síntesis de la Prl almacenada en los pools de bajo turnover, que es la que se libera en respuesta a la TRH (321). Este defecto podría atribuirse a los menores niveles de receptor de E hallados en hipófisis de animales diabéticos. La disminución de los receptores observada en la fracción nuclear, confirmando resultados previos de Weisenberg y col. (256), ha sido menos marcada que la de los receptores citoplasmáticos. Esto puede justificarse mediante la hipótesis de un efecto mejorador o compensatorio del E sobre hipófisis, que previamente se mencionó en relación al restablecimiento inducido por el E de la B-LH en respuesta a la administración de LHRH. La terapia insulínica no restableció la disminución hipofisaria de los niveles de receptor nuclear de E, expresados en fmoles/mg ADN. Esto puede deberse a que la Ins ejerce un efecto trófico a nivel hipofisario (aumentan los valores de ADN) sin inducir un mejoramiento concomitante en los niveles de receptor de E. Por otra parte esta falta de recuperación se correlaciona con el parcial restablecimiento de los niveles de Prl liberados en respuesta a la TRH.

La falla en la acción del E a nivel hipofisario podría

explicar de por sí los menores valores de Prl sérica observados en respuesta al tratamiento con E. Sin embargo las determinaciones de los niveles de receptor hipotalámico indican que existe asimismo una alteración hipotalámica en los animales diabéticos. Esta alteración, sin embargo, se restablece por tratamiento con Ins, al igual que los valores circulantes de Prl en respuesta al E.

Los trabajos de De Herthog y col. (289) describen una intensificación del metabolismo periférico del E en ratas diabéticas que es responsable de los cambios en el reciclado del complejo estradiol-receptor observados por dichos autores en útero de ratas diabéticas. Estas alteraciones también podrían ocurrir en hipófisis e hipotálamo y podrían ser en parte responsables de los trastornos observados.

Por último, es necesario aclarar que actualmente está en discusión la localización subcelular de los receptores de hormonas esteroides. Algunos estudios recientes sugieren la existencia de dichos receptores únicamente en el núcleo de la célula pero en un estado susceptible o no de ser transferidos a la fracción citoplasmática mediante la homogeneización del tejido según se encuentren libres o unidos a la hormona (322).

Finalmente, es conveniente tener en cuenta que las determinaciones de receptor hipofisario de E se realizaron en fracciones nucleares o citoplasmáticas de hipófisis enteras. Es

posible que las alteraciones en los receptores de E sean más acentuadas en los lactotropos que en los gonadotropos, a juzgar por los parámetros afectados. Sería necesario repetir las determinaciones aislando lactotropos y gonadotropos para poder sacar conclusiones más precisas.

En resumen estos resultados indican: a) que existen fallas en la acción del E a nivel hipofisario que probablemente redunden en una menor síntesis de la Prl liberada como respuesta a TRH y que no son recuperables totalmente por tratamiento con Ins y b) que existen alteraciones a nivel hipotálámico recuperables por Ins que provocan, al menos en parte, los trastornos en la respuesta prolactínica al E.

B P R O L A C T I N AI N T R O D U C C I O NB.1 Síntesis, estructura y secreción hipofisaria de la Prl

La Prl es una hormona hipofisaria proteica sintetizada en las células lactotropas (o mamotropas) del lóbulo anterior de la hipófisis. La hormona se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso (RER) como un precursor de mayor peso molecular que contiene una secuencia líder hidrofóbica que inserta la cadena polipeptídica naciente a la membrana (175). Este precursor es rápidamente clivado en las cisternas del RER. Luego la hormona pasa al sistema de Golgi y finalmente se acumula en gránulos secretorios (332). La extrusión hormonal se produce por fusión de la membrana del gránulo con la plasmática. Existen por lo menos dos pools o componentes intracelulares de Prl: la Prl recientemente sintetizada que a su vez es rápidamente liberada y Prl que se acumula en un pool de bajo turnover (186).

Los estudios estructurales sobre la molécula de Prl han mostrado que la Prl, la GH y la hormona lactógeno-placentaria derivan de un gen ancestral común (58). Sin embargo la Prl difiere de las otras dos en que posee un puente disulfuro cerca

de la parte amino terminal de la molécula.

Se ha descrito una familia de moléculas de Prl (Prl "pequeña", "grande" y "muy grande") con diferentes pesos moleculares. La "pequeña" corresponde al monómero (198 aminoácidos), la "grande" a un dímero-trímero y la restante a un agregado de alto peso molecular. Las tres formas son reconocidas por los anticuerpos anti-Prl pero las formas poliméricas no son bien reconocidas por los receptores de membrana de los tejidos blanco (58) lo cual sugiere una limitada actividad biológica. La liberación preferencial de las formas poliméricas ocurre sólo en estados patológicos (333).

El patrón de secreción tónica de Prl es pulsátil. Dichos pulsos se originan aparentemente en la hipófisis a través de una red de comunicación entre los lactotrofos (por medio de uniones estrechas) (334). Existe un ritmo circadiano de liberación de Prl (175). Los estrógenos son estimulantes de la secreción de Prl, por lo cual se producen cambios en los niveles de esta hormona asociados a los niveles de estrógenos circulantes durante el ciclo éstral y la preñez. Se produce un aumento de Prl asociado al parto, la lactancia y la ovulación y en otras situaciones como el stress.

B.2 Acción de la Prl

La Prl posee un espectro de acciones biológicas enorme-

mente variado. Contrariamente a otras hormonas hipofisarias que se especializan en la regulación de una o algunas pocas funciones, la Prl está involucrada en una amplia variedad de procesos fisiológicos de diversos sistemas de órganos.

Los efectos metabólicos de la Prl en los mamíferos están en su mayoría relacionados con el control endócrino de la reproducción. Varios órganos implicados en la función reproductiva son blancos de la Prl: ovario, cuerpo lúteo, testículo, glándula mamaria. Aunque la Prl no parece indispensable en el proceso ovulatorio propiamente dicho, ella interviene de forma decisiva en el mantenimiento del cuerpo lúteo en algunas especies. En la rata la Prl favorece la secreción de P del cuerpo lúteo, inhibiendo sus enzimas de degradación (335). Inversamente, durante la lactación, las intensas secreciones de Prl contribuyen a reducir la actividad ovárica de la madre. En el macho la Prl participa en la síntesis de andrógenos, manteniendo altos niveles de colesterol esterificado en células de Leydig (58) y a través de otros mecanismos aún no dilucidados. Asimismo la Prl modifica el contenido de receptores de andrógenos en próstata y estimula los niveles de andrógenos y LH séricos (340). La acción de la Prl sobre la glándula mamaria que le da el nombre de lactogénica a esta hormona, es la función más importante. En efecto, en todas las especies, el crecimiento del tejido mamario epitelial secretor y la inducción de la secreción de leche se encuentran

bajo la estricta dependencia de la Prl (175). En la mayoría de las especies, la Prl es también necesaria para el mantenimiento de la lactancia.

B.2.1 Acción de la Prl sobre el ovario

El mantenimiento del cuerpo lúteo en la rata, es otra función importante de la Prl en los mamíferos, ya que este efecto le asigna un segundo nombre a la hormona: hormona luteotrófica (LTH) (175). En la rata hembra se puede inducir el estado de pseudopreñez elevando los niveles séricos de Prl, ya sea mediante un implante de hipófisis anterior bajo la cápsula renal o mediante la administración de ciertas drogas antidopaminérgicas. Esta situación puede interrumpirse suprimiendo la secreción de Prl, comenzando un nuevo ciclo ovárico. En la rata inseminada, la supresión de la Prl antes de la implantación del huevo, interrumpe la preñez e induce un nuevo ciclo. El funcionamiento de éste depende por lo tanto de la Prl durante la preñez temprana y durante la pseudopreñez (341). La Prl actúa manteniendo los niveles del receptor de LH (342) y de la adenilato ciclasa estimulada por LH (343) en células luteales. Por otro lado la Prl antagoniza las acciones luteolíticas de la $PGF_{2\alpha}$ (344). Durante la preñez la Prl asimismo actúa manteniendo los niveles de receptor de estrógenos luteales (345). Ambos, la Prl y el estradiol, son los componentes del complejo luteotrófico en las

ratas preñadas (346).

Ha sido descripta la inhibición por Prl de la enzima 20α HSD que interviene en el catabolismo de P (335). Por otro lado la Prl aumenta la incorporación de ésteres de colesterol (347), estimula la actividad de colesterol esterasa (348) y aumenta la síntesis de colesterol en cuerpo lúteo (347). Estas acciones a su vez, aumentan la disponibilidad de sustrato para la SCC.

La Prl en la rata no sólo presenta acciones luteotróficas, sino también luteolíticas, durante los ciclos normales. El bloqueo de la secreción de Prl durante el ciclo estral resulta en la acumulación de cuerpos lúteos que no logran involucionar normalmente (349). Las elevaciones de la Prl sérica durante el proestro y estro podrían servir para inducir la luteólisis de los cuerpos lúteos formados en el ciclo anterior (350). Este rol luteolítico de la Prl parece ser único en los roedores (351).

La Prl, por otra parte, inhibe la producción de estrógenos (352) y la estimulación de dicha producción por gonadotropinas (353) a través de una inhibición de la actividad de aromatasas (353) y de un antagonismo de los efectos estimulatorios de la LH sobre la biosíntesis de andrógenos tecales e intersticiales (354). Asimismo la Prl estimula la actividad de 5α -reductasa de ovario de rata, con el concomitante aumento de los andrógenos 5α reducidos, lo cual, junto con la menor producción

de estrógenos, favorece la atresia (355).

En células de la granulosa humanas "in vitro" la P_{rl} inhibe la producción de P (356). Esto también ha sido demostrado en folículos pequeños porcinos (357, 358). La sup_{re}sión de la secreción de estrógenos por P_{rl} también ha sido ob_{servada} en humano (359), produciéndose por lo tanto un menor número de células de la granulosa y un concomitante decrecimen_{to} en el potencial esteroidogénico del cuerpo lúteo, es decir, un cuerpo lúteo deficiente (351) asociado a estados hiperpro_{lactinémicos}.

B.3 Receptores de P_{rl}

El receptor de P_{rl} existe en un gran número de tejidos: glándula mamaria, hígado, riñón, cerebro, adrenal, ovario, vesícula seminal, etc., aunque algunos de ellos no son considera_{dos} como tejidos blanco de la hormona (58). El receptor pare_{ce} ser una molécula proteica de unos 220.000 dalton de peso mo_{lecular} y estaría constituido por un conjunto de moléculas aso_{ciadas} entre las que algunas estarían más implicadas en la unión con la hormona y otras en la transmisió_n del mensaje hor_{monal}. Resultados recientes han demostrado que la porción del receptor implicada en la unión hormonal es de tamaño pequeño (34.000-43.000 daltons), de acuerdo a determinaciones realiza_{das} por electroforesis en presencia de SDS. La existencia e

importancia de residuos de hidratos de carbono en esta porción del receptor está en discusión (58).

El receptor es de alta afinidad ($K_a = 3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) y la unión se torna irreversible con el tiempo (58).

Los receptores del Prl no sólo se localizan en las membranas periféricas celulares sino que también han sido encontrados en las membranas de Golgi hepáticas y mamarias, en una proporción de hasta el 80%. El rol de estos sitios intracelulares podría estar relacionado con los flujos salientes y entrantes de porciones de membrana que resultan respectivamente de la endocitosis de los complejos hormona-receptor (58).

El número de receptores de Prl en los diversos tipos celulares y en las diferentes especies es extremadamente variable. En un tipo celular dado, el número de receptores prolactínicos también varía de acuerdo a la situación fisiológica y está controlado por diversas hormonas, en primer lugar, por la misma Prl. Esta regulación es compleja ya que hace intervenir dos fenómenos superpuestos y opuestos: regulación negativa y positiva. En glándula mamaria e hígado se han observado ambos: una rápida regulación negativa reversible que corresponde a la endocitosis del complejo hormona-receptor y a su degradación lisosomal (58) y por otro lado, una regulación positiva, lenta y estable, que se asocia a una acumulación de membrana en el aparato de Golgi y en el RER.

En otros tejidos, como la próstata, adrenal y páncreas, ha sido únicamente observada la regulación negativa,

Asimismo, los receptores de Prl están regulados por hormonas heterólogas: estrógenos, tiroxina y glucocorticoides en glándula mamaria; en hígado por esteroides ováricos y suprarenales, hormona de crecimiento y tiroxina, en testículo por LHRH y LH, etc. (58). El papel de estas modulaciones podría ser el de contribuir a que la célula blanco sea más o menos sensible a la hormona circulante, aunque esta es una hipótesis aún controvertida (58).

El mecanismo de acción de la Prl aún no ha sido dilucidado. Sin embargo los trabajos del grupo de Houdebine realizados en glándula mamaria postularon la existencia de un mediador intracelular proveniente de un clivaje proteolítico sobre las membranas que contienen el receptor de la Prl y que es capaz de entrar al núcleo de la célula donde activa ciertos genes específicos (58). Sin embargo esta teoría aún no ha sido completamente confirmada.

B.3.1 Receptores de Prl en ovario

La maduración de las células de la granulosa y su eventual transformación a células luteales está acompañada por un marcado aumento en el número de receptores de Prl (360). La FSH, vía

AMFc, parece ser la principal hormona involucrada en la regulación del contenido de los receptores de Prl (360, 361). La LHRH y sus análogos disminuyen el número de receptores de Prl en células luteales (362) y bloquean el aumento estimulado por FSH en células de la granulosa (363). El tratamiento con LH "in vivo" e "in vitro" de células de la granulosa en presencia de FSH produce un aumento adicional de la unión de Prl (363, 360). Por otra parte los ovarios de ratas superovuladas por administración de gonadotrofinas contienen aproximadamente tres veces más receptores de Prl/mg proteína que los ovarios normales (364).

Un estudio reciente de Bonifacino y Dufau (365) realizado en ovario de rata pseudopreñada, ha caracterizado el receptor de Prl como un dímero de peso molecular 80.000, formado por una subunidad α (40.000 daltons) que une a la hormona y una β , aparentemente no expuesta a la superficie exterior de la membrana. Estos estudios se realizaron mediante técnicas de "cross-linking".

R E S U L T A D O SB.I Influencia de la Prl en la regulación endócrina de la
función luteal

Se utilizaron ratas hembras prepúberes superovuladas experimentalmente por tratamiento con gonadotrofinas, separadas en cuatro grupos experimentales: C: ratas control, Prl tratadas con prolactina ovina (oPrl) (1mg/kg peso/día), S: tratadas con Sulpirida (antagonista dopaminérgico (30 mg/kg peso/día), Br: tratadas con bromocriptina, agonista dopaminérgico (3 mg/kg peso/día). Los tratamientos fueron realizados durante 7 días. Los animales fueron sacrificados por decapitación.

a) La Tabla VII muestra los efectos de los tratamientos con Prl, sulpiride y bromocriptina sobre el peso ovárico y los niveles circulantes de progesterona, Prl y LH. Los pesos ováricos de los diferentes grupos no difieren significativamente. Los niveles séricos de progesterona se encontraron reducidos en los animales del grupo Br e inalterados en los grupos S y Prl.

Por otro lado, como era de esperar la sulpiride aumentó significativamente los niveles de Prl séricos mientras que la

TABLA VII: Efecto de los tratamientos con S, olrl y Br sobre peso ovárico y sobre los niveles de progesterona, LH y Prl séricas en ratas inmaduras pseudopreñadas.

	Peso Ovarico (mg)	Progesterona (ng/ul)	LH (ng/ml)	lrl (ng/ml)
Control (salina)(16)	65 \pm 4	68 \pm 7	10,6 \pm 3,2	12 \pm 1
Sulpiride (30mg/kg peso)(13)	65 \pm 6	76 \pm 11	14,2 \pm 1,5	48 \pm 3*
o Prolactina (1mg/kg peso)(12)	61 \pm 5	56 \pm 4	11,4 \pm 1,6	-
Bromocriptina (3mg/kg peso)(16)	60 \pm 5	5,5 \pm 0,8*	6,9 \pm 2,1	no detectable

Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales por grupo. Los valores muestran como promedios \pm ES (* $\bar{p} < 0,001$).

Los animales fueron sacrificados luego de 7 días de tratamiento.

bromocriptina produjo valores no detectables. Los niveles séricos de LH de todos los grupos no difieren significativamente de los valores del grupo C.

b) Se realizaron incubaciones de células luteales aisladas de ovarios de los cuatro grupos experimentales en presencia o ausencia de hCG (1 nM). Esto se realizó para verificar si se podía correlacionar esta respuesta "in vitro" con los valores séricos de P. La Figura 32 muestra la producción de progesterona y AMPc en incubaciones de células luteales de los cuatro grupos experimentales en presencia de 10^{-9} M de hCG. Los datos fueron expresados como porcentajes de estimulación referidos al aumento sobre los valores basales. Estos fueron C= $8,0 \pm 0,2$, S= $15,6 \pm 0,5$, F= $18,9 \pm 1,0$, Br= $9,7 \pm 0,4$ ng progesterona/ 2×10^6 células. Los grupos S y F producen valores de P basal significativamente mayores que los controles ($P < 0,001$). Los valores basales de AMPc no difieren significativamente entre los grupos experimentales y oscilan entre 9-12 pmoles/ 2×10^6 células.

La capacidad de hCG de estimular la producción de P y AMPc se encontró marcadamente reducida en el grupo Br y significativamente aumentada en los grupos Pr1 y S.

La posible acción directa de la sulpirida o bromocriptina sobre la respuesta de la célula luteal se determinó mediante incubaciones "in vitro" con dichas drogas. Ninguna de ambas, dentro del rango de 0,03-3 ug/ml tuvo efecto alguno sobre la

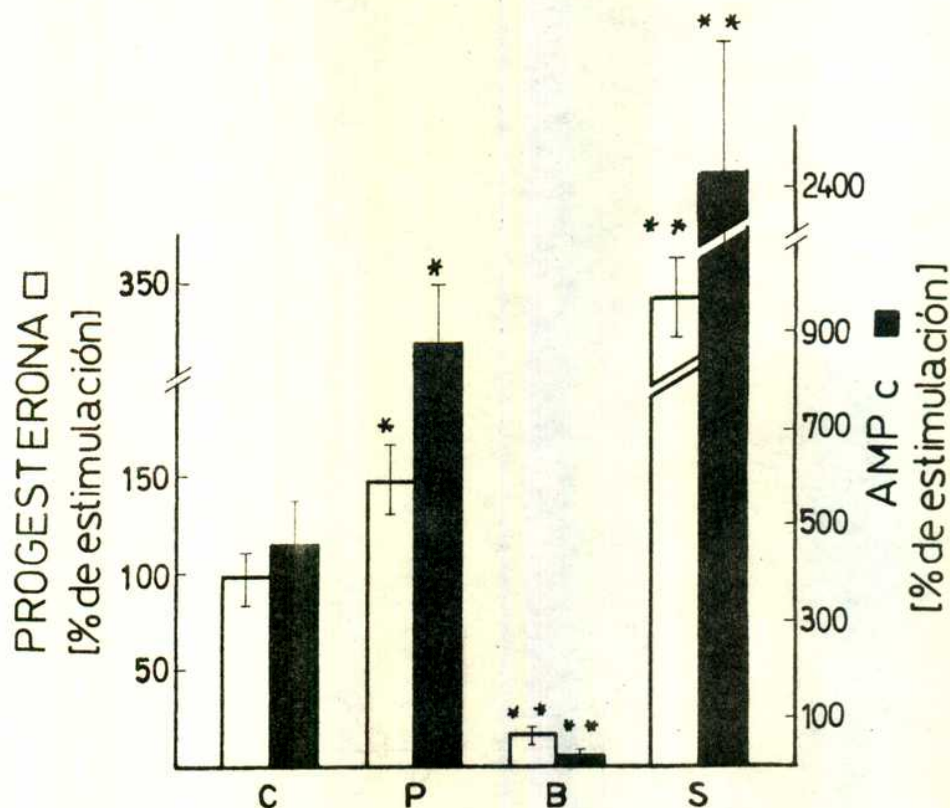


Fig. 32: Producción de AMPc y progesterona de células luteales de ratas pseudopreñadas estimuladas con hCG, Grupo C: ratas control, Prl tratadas con Prl, S: tratadas con sulpiride, Br: tratadas con bromocriptina. Los tratamientos comenzaron el 3er día luego de la administración de PMSG y se prolongaron durante 7 días; se incubaron alícuotas de 2×10^6 células luteales de cada grupo en presencia de hCG $10^{-9}M$ con MIX (0,1 mM) a $37^{\circ}C$ durante 3 hs. Se determinó la P y AMPc como se describe en Métodos. Los datos se expresan como % de estimulación sobre los valores en ausencia de hCG (basales). Cada barra es el promedio \pm ES. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ con el test-t múltiple de Dunnet) comparados con el control.

producción basal de P o AMPc luego de 3 horas de incubación en ausencia de hormonas estimuladoras.

En una aproximación inicial al intento de explicar las diferentes capacidades de respuesta "in vitro" de células luteales de animales hipo o hiperprolactinémicos se determinaron los sitios de unión a LH en membranas de ovario de los cuatro grupos experimentales. La figura 33 muestra un incremento significativo en los grupos S y Prl (95 y 60% respectivamente), de los sitios de unión a h-LH mientras que en el grupo Br se manifiesta una marcada disminución (4 veces). El análisis de Scatchard de estos datos no muestra diferencias significativas en los valores de las constantes K_a entre los grupos (el valor promedio entre ellos es $K_a = 3,8 \pm 0,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$).

c) Acción "in vitro" de la Prl en células luteales.

Para evaluar la posible acción directa de la Prl sobre células luteales se realizaron incubaciones en presencia de diferentes concentraciones de hCG (0,001-10 nM) o-Pr1 (0,002-20 nM) ó hCG + o-Pr1 (0,2 nM). Se determinó la P liberada al medio de incubación y el AMPc total. La figura 34 muestra los porcentajes de estimulación sobre los valores basales del AMPc producido. Los niveles del nucleótido cíclico llegan al máximo con 10^{-10} M hCG. Sin embargo la o-Pr1 no estimuló la producción de AMPc ni aumentó la respuesta de la hCG. La producción "in vitro" de P se muestra en la figura 35. La o-Pr1 estimuló la producción

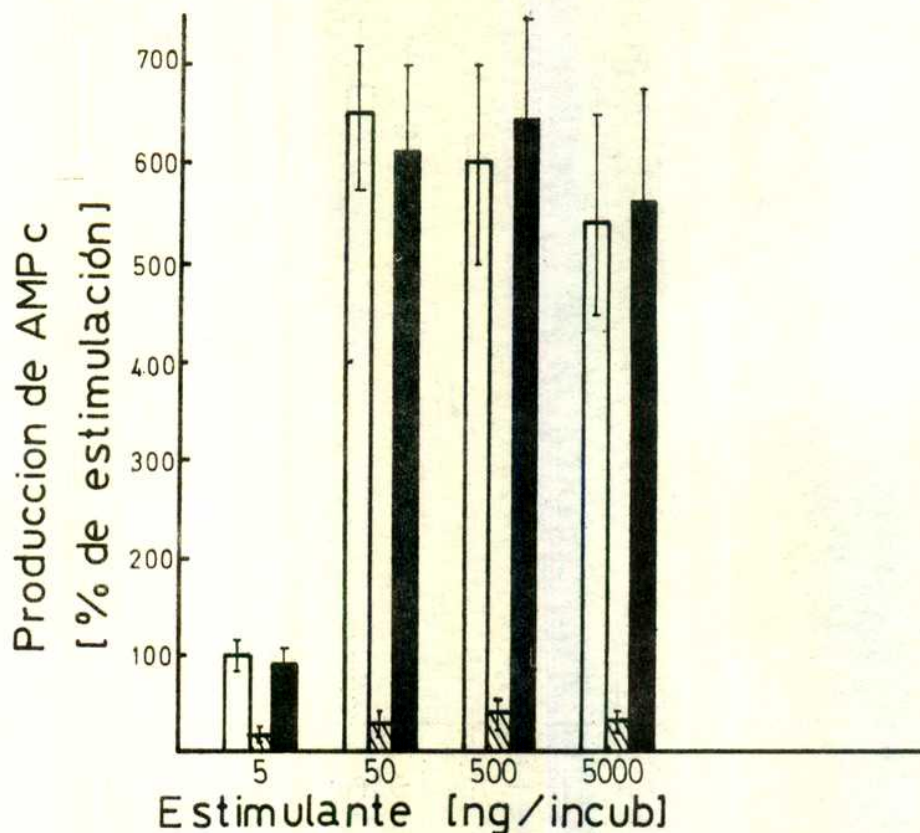


Fig. 33: Efecto de dosis crecientes de hCG, o-Prl o hCG + 10 ng o-Prl sobre la producción de AMPc por células luteales aisladas. Las células fueron incubadas en las mismas condiciones descritas en la Fig. 32. Luego de la incubación se tomaron alícuotas de 1 μ l y se calentaron a 100° C durante 15 min. que se guardaron a -20° C hasta la determinación del AMPc total. Cada barra representa el promedio \pm ES. de determinaciones realizadas por triplicado de tres experimentos diferentes. Los valores basales fueron: 11.3 ± 1.4 pmoles/ 2×10^6 células

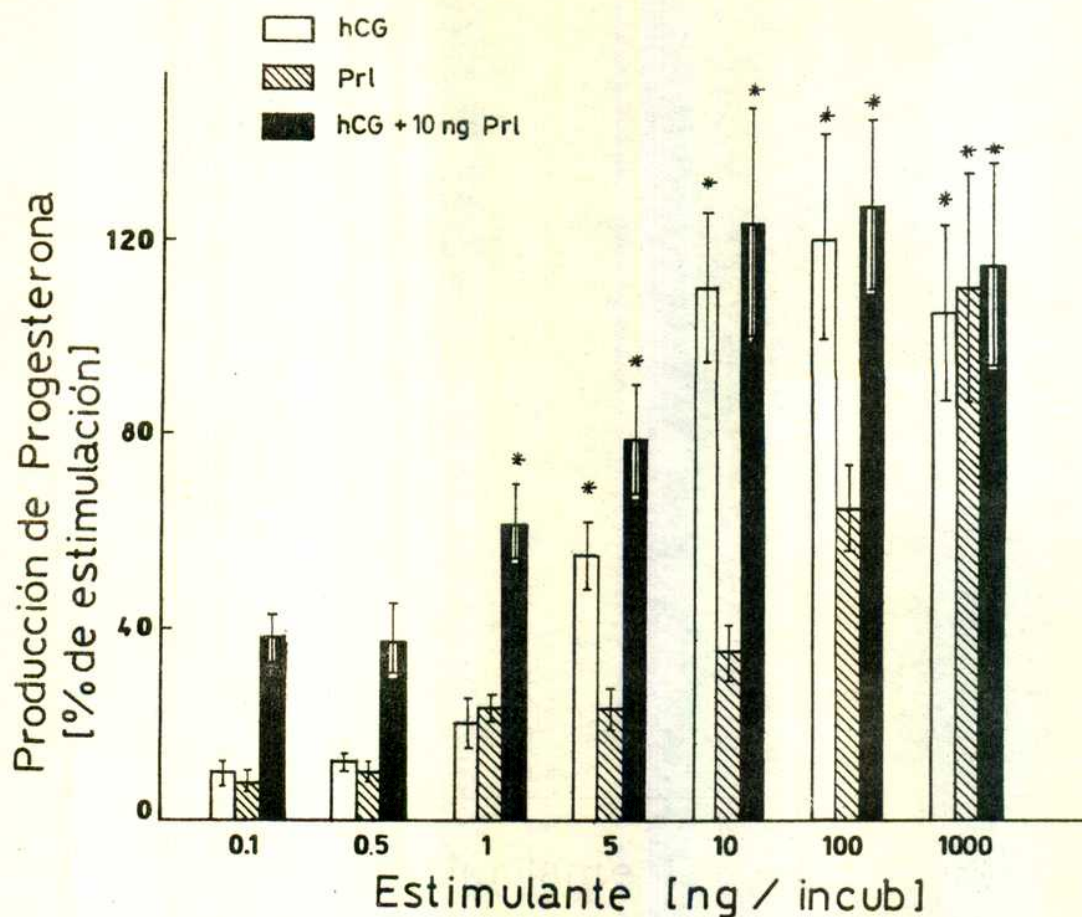


Fig. 34: Efecto de dosis crecientes de hCG, o-Prl ó hCG + 10 ng o-Prl sobre la producción de progesterona en células luteales aisladas. Las células se incubaron en las mismas condiciones indicadas en la Fig. 32. Se tomaron alícuotas de 1 ml, se centrifugaron a 800 xg (10 min. a 4° C) y se guardó el sobrenadante a -20° C hasta la determinación de P por RIA. Cada barra corresponde al promedio \pm ES de determinaciones por triplicado de tres experimentos diferentes. Las comparaciones estadísticas fueron hechas en relación a los valores con control (* p < 0,01). Los valores basales fueron de $10,3 \pm 1$ ng/2 x 10⁶ células.

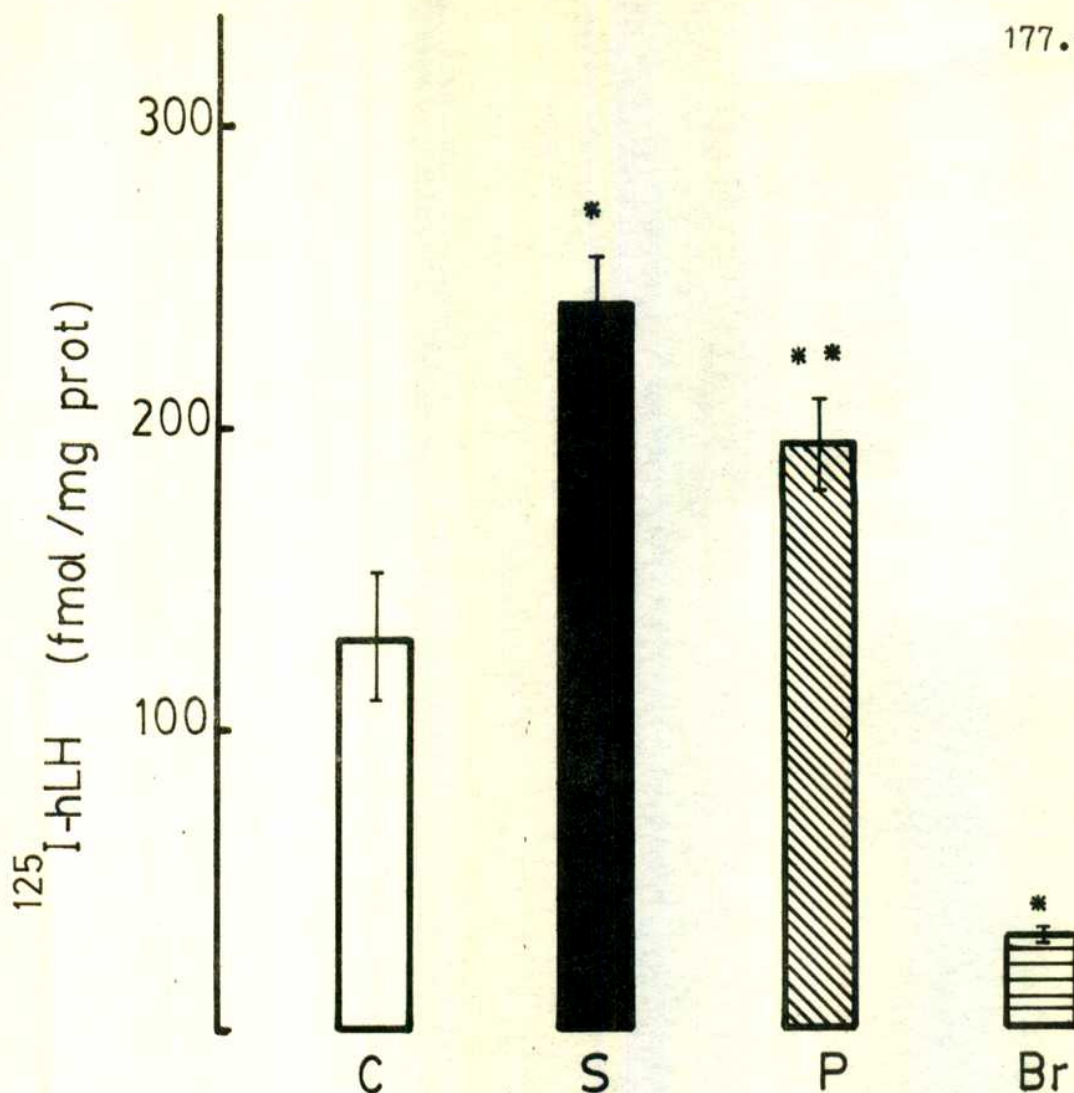


Fig. 35: Efecto de estados hiper o hipoprolactinémicos sobre la unión de ^{125}I - h-LH a fracción de membrana de ovarios de ratas inmaduras tratadas con PMSG/hCG. Los grupos experimentales son los indicados en la leyenda a la Fig. 32. Cada barra representa el promedio \pm ES del número de sitios Q de unión a LH obtenido de gráficos de Scatchard de tres experimentos diferentes. Las comparaciones estadísticas se hicieron respecto al grupo C (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) mediante el test-t de comparaciones múltiples de Dunnett.

máxima de las concentraciones mayores de 10 nM mientras que la hCG produjo estimulación máxima con 0,1 nM. Por otra parte, se observó un efecto sinérgico cuando se agregó oPrl (0,2 nM) a las incubaciones con hCG, en concentraciones tales que la hCG no produce máxima estimulación. La respuesta máxima no aumentó, aún en presencia de altas concentraciones de ambas hormonas.

D I S C U S I O N

Los resultados presentados demuestran que la modificación de los niveles periféricos de Prl induce una variación en la sensibilidad de las células luteales al estímulo de LH/hCG. El estado hiperprolactinémico incrementa la producción "in vitro" de AMPc y P en células luteales estimuladas por LH/hCG mientras que las condiciones de hipoprolactinemia producen el efecto opuesto. Esto podría explicarse, al menos en parte, por los cambios observados en los niveles del receptor de LH/hCG, los cuales a su vez confirman para el modelo de rata superovulada la regulación descrita de los receptores de LH por Prl (360, 342). Por otra parte, ha sido sugerido que el aumento en el receptor de LH y la producción de P podrían ser eventos independientes, ambos mediados por la acción luteotrófica de la Prl (342). Los datos presentados en este trabajo en ensayos realizados "in vitro" demostrando una capacidad estimuladora aguda directa de la Prl sobre la producción de P en células luteales, respaldan dicha hipótesis. Estos resultados refuerzan, además, la dependencia de la Prl como luteotrofina en la preñez temprana y pseudopreñez (341).

La acción directa de la Prl se manifiesta sin una elevado

ción detectable de los niveles de AMPc. Esta disociación es coherente en relación a la ya descrita acción inhibitoria de la Prl sobre la actividad de la 20α - HSD (335), los efectos estimulatorios sobre la colesterol esterasa y sobre la biosíntesis del colesterol en cuerpo lúteo (347, 348), que aumentan la disponibilidad de sustrato para la SCC.

La Prl y hPL (y no FSH, rGH o hLH) son capaces de inducir la luteinización completa (observada por microscopía electrónica) de las células de la granulosa y de aumentar la secreción de P (366). En este estudio el dibutiril AMPc no mimetiza los efectos de la Prl o hPL, sugiriendo la intervención de otro mecanismo mediador de la acción de la hormona. Veldhuis y col (367) demostraron que la Prl ejerce un efecto inhibitorio sobre las células de la granulosa porcinas de folículos pequeños inmaduros mientras que estimula la producción de P de folículos maduros "in vitro", en concordancia, aunque con otro modelo experimental, con los resultados presentados en este estudio. Aparentemente, la Prl tendría una función dual, siendo inhibitoria de la esteroidogénesis en células inmaduras de la granulosa y estimulatoria en células de la granulosa maduras o luteales.

La posible acción directa de las drogas utilizadas (sulpiride y bromocriptina) sobre el ovario quedan descartadas ya que se observó una respuesta de producción de P y AMPc "in

vitro" inalterada en presencia de cualquiera de ellas. La similitud entre los resultados obtenidos mediante el tratamiento con sulpiride o o-Prl también descartaría la posible acción directa de esta droga.

La posibilidad de una contaminación con LH de la Prl utilizada fue descartada utilizando un ensayo radio-receptor para la determinación de LH y adicionalmente por la inhabilidad de la Prl, en las concentraciones utilizadas en este estudio, para estimular la producción "in vitro" de testosterona en células de Leydig.

Los valores de F circulantes en los grupos hiperprolactinémicos no difieren de los controles. Sin embargo la F basal producida por células luteales aisladas "in vitro" es superior a la liberada por células de animales control. Por otro lado se observan valores de P basales idénticos al C en incubaciones con células luteales aisladas del grupo Br, a pesar de que este grupo posee valores circulantes disminuidos de P. Esto sugiere la intervención de otro/s factor/es "in vivo" que regulan la secreción/producción de P.

Otro factor remarcable es la obtención de valores séricos de LH medidos por RIA en los grupos hipo-hiperprolactinémicos que no difieren significativamente del grupo C. Sin embargo es conocido el efecto de la Prl como inhibidora de la secreción de LH. Se ha sugerido que esto ocurre a través de un incremento a nivel hipotalámico del turnover de dopamina (368)

que a su vez inhibe la secreción de LHRH mediante de un mecanismo de sensibilización del hipotálamo a la retroalimentación negativa de los esteroides. Habría que profundizar estos estudios para la elucidación de este punto en el modelo experimental utilizado. Por otro lado sería importante realizar estudios acerca de la bioactividad de la LH en estos grupos experimentales.

En la Introducción (sección B) ha sido descrita la inhibición producida por el estado de hiperprolactinemia sobre la producción de estrógenos en células de la granulosa humanas y de rata que conlleva a la formación de una fase lútea inadecuada (369). Por otro lado la ausencia completa de Prl inhibe la esteroidogénesis en células de la granulosa humanas (369). Existe por lo tanto, un efecto bifásico de la Prl dependiendo de la dosis (estimuladorio a bajas concentraciones e inhibitorio a altas concentraciones). Sin embargo, tanto en humano como en numerosas especies (vaca, oveja, mono, etc.) la hiperprolactinemia no es inhibitoria de la esteroidogénesis luteal, en concordancia con los resultados presentados en la rata. Estas consideraciones, unidas a las observaciones en células ováricas porcinas y a los resultados presentados en este trabajo, confieren a la Prl un papel modulador del normal funcionamiento ovárico.

C O N C L U S I O N E S

Los resultados presentados han demostrado que la insulina juega un papel fundamental en la fisiología de la célula luteal, ya que esta hormona:

- a) Posee receptores específicos y de alta afinidad en células luteales.
- b) Estimula la producción de P de células luteales en presencia de MIX y amplifica la estimulación producida por la hCG a concentraciones de Ins dentro del rango fisiológico.
- c) Estimula la enzima PDE de células luteales a dichas concentraciones (dos formas enzimáticas diferentes).

El papel de la Ins en el funcionamiento ovárico se evidencia ^{asimismo} en los trastornos observados en el estado diabético inducido por STR ya que:

- d) Las células luteales de animales diabéticos son menos sensibles al estímulo gonadotrófico.
- e) Los valores de P circulantes son menores en estos animales.
- f) Los receptores de LH en ovario y células luteales están disminuidos.
- g) Estas alteraciones se revierten por tratamiento de los animales diabéticos con Ins.

Por otro lado se ha demostrado serias alteraciones a nivel del eje hipotálamo - hipofisario en ratas diabéticas:

- a) Reducción de la LH plasmática liberada en respuesta a la castración.
- b) Sensibilidad normal al estímulo con LHRH en cuanto a la LH medida por RIA.
- c) Disminución de la actividad biológica de la LH en animales diabéticos (tanto en respuesta a la castración como la administración de LHRH).
- d) Restablecimiento del cociente B- LH/ I - LH por tratamiento con Eb.
- e) Reducción de los valores de Prl circulantes basales en respuesta al tratamiento con Eb.
- f) Disminución de la respuesta prolactínica a la TRH (en ratas estrogenizadas).
- g) Disminución de los receptores de E citoplasmáticos hipofisarios e hipotalámicos en ratas ovx.
- h) Disminución de los receptores nucleares de E en hipófisis (menos marcada) e hipotálamo en ratas ovx tratadas con Eb.

Por otro lado la terapia insulínica:

- i) No restablece la B - LH en respuesta a LHRH.
- j) No normaliza los niveles de receptor nuclear hipofisario de E en ratas estrogenizadas, mientras que se recuperan los hipotalámicos.

k) Restablece en hipófisis e hipotálamo los receptores de E citoplasmáticos en ratas ovx.

l) No logra recuperar totalmente la respuesta de Prl a la administración de TRH.

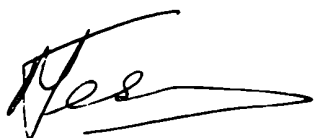
Los resultados presentados en la sección B de este trabajo muestran:

a) Que la Prl circulante regula la esteroidogénesis ovárica en ratas pseudopreñadas, observándose un aumento de la producción de P en células luteales de ratas hiperprolactinémicas y una disminución asociada a la hipoprolactinemia.

b) Este efecto podría estar mediado por los cambios observados en los niveles de receptor de LH, los cuales se correlacionan positivamente con la Prl circulante.

c) Los experimentos "in vitro" demuestran que la Prl tiene un efecto directo sobre la estimulación aguda de la esteroidogénesis luteal. Este efecto podría también explicar en parte los datos indicados en el punto a.

Las evidencias presentadas hacen incuestionable el papel que juega la Ins y la Prl sobre el normal funcionamiento del sistema reproductivo. Dentro de la compleja red de señales involucradas en el desarrollo de la función ovárica, las gonadotrofinas tienen una acción fundamental, sin embargo, dicha acción se encuentra modulada por las hormonas objeto de este estudio, cuya precisa acción queda por dilucidar.



B I B L I O G R A F I A

- (1).- TURNER CD, BAGNARA JT, *Endocrinología General*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1971.
- (2).- PETERS H, BYSKOV AG, HIMELSTEIN, BRAW R, FABER M; *J Reprod Fertil* 45: 559, 1975.
- (3).- EDWARDS RG, FOWLER RE, GORELANGTON RE, GODSEN RG, JONES EC, READ HEAD C, STEPTOE PC; *J Reprod Fertil* 51: 237, 1977.
- (4).- FEDERSON T; *Acta Endocrinol* 64: 304, 1970.
- (5).- FADDY MJ, JONES EC, EDWARDS RG; *J Exp Zool* 197: 173, 1976.
- (6).- DORRINGTON JH, MOON YS, ARMSTRONG DT; *Endocrinology* 97: 1328, 1975.
- (7).- DORRINGTON JH, ARMSTRONG DT; *Recent Prog Horm Res* 35: 301, 1979.
- (8).- MC NATTY KP, MACRIS A, DE GRAZIA C, OSATHANONDH R, RYANK J; *J C in Endocrinol Metab* 46: 687, 1979.
- (9).- NIMROD A, ERICKSON GF, RYAN J; *Endocrinology* 97: 244, 1975.
- (10).- IRELAND JJ, RICHARDS JS; *Endocrinology* 102: 876, 1978.
- (11).- GOLDENBERG RL, VAITUKAITIS JL, ROSS GT; *Endocrinology* 90: 1492, 1972.
- (12).- RICHARDS JS, IRELAND JJ, RAO MC, BERNATH GA, MIDGLEY Jr AR, REICHERT Jr LE; *Endocrinology* 99: 1562, 1976.
- (13).- SCHREIBER JR, ROSS GT; *Endocrinology* 99: 590, 1976.
- (14).- DANIEL SAJ, ARMSTRONG DT; *Endocrinology* 107: 1027, 1980.
- (15).- HILLIER SG, DE ZWART FA; *Endocrinology* 109: 1303, 1981.
- (16).- LONVET JP, HARMAN SA, ROSS GT; *Endocrinology* 96: 1179, 1975.

- (17).- FAROOKHI R; Endocrinology 106: 1216, 1980.
- (18).- SA IDUDDIN S, ZESSENHANS HP; Endocrinology 102: 1069, 1978.
- (19).- SCHWARTZ NB; Res Front Fertil Reg 2: 1, 1982.
- (20).- ZOLLER LC, WEISZ J; Histochemistry 62: 125, 1979.
- (21).- ZOLLER LC, WEISZ J; Endocrinology 103: 310, 1979.
- (22).- PRAVHN VKK, WEISZ J; Endocrinology 87: 481, 1970.
- (23).- FORTUNE JE, ARMSTRONG P; Endocrinology 100: 1341, 1977.
- (24).- BJERSING L, CARSTENSEN H; J Reprod Fertil 14: 101, 1967.
- (25).- SHORT RV; J Endocrinol 24: 59, 1962.
- (26).- ROSS GT, CARGILLE CM, LIPSETT MB, RAYFORT PL, MARSHALL JR, STROTT CA, RODBARD D; Recent Prog Horm Res 26: 1, 1970.
- (27).- MC NATTY KP, HUNTER WM, MC NEILLY AS, SAWERS PS, J Endocrinol 64: 1, 1975.
- (28).- HILLIER SG, ZELEZNIK AJ, KNAZEK RA, ROSS GT; J Reprod Fertil 60: 219, 1980.
- (29).- HSUEH AJW, ADASHI EY, JONES PBC, WELSH Jr TH; Endocri Rev 5: 76, 1984.
- (30).- DUNAIF AE, ZIMMERMAN EA, FRIESEN HG, FRANTZ AG; Endocrinology 110: 1465, 1982.
- (31).- ZELEZNIK AJ, MIDDLEBY AR, REICHERT LE; Endocrinology 95: 818, 1974.
- (32).- RANI CSS, SELHANICK AR, ARMSTRONG DT; Endocrinology 108: 1379, 1981.
- (33).- WANG C, HSUEH AJW, ERICKSON GF; J Biol Chem 254: 11, 1979.
- (34).- NINROD A, BEDRAK E, LAMPRECHT SA; Biochem Biophys Res Commun 78: 977, 1977.

- (35).- ST-ARNOUD R, WELKER P, KELLY PA, LABRIE F; Mol Cell Endocrinol 31: 43, 1983.
- (36).- MARKKENEN SO, RAJANIEMI HJ; Endocrinology 107: 1153, 1980.
- (37).- RICHARDS JS, SEHGAL N, TESH JS; J Biol Chem 258: 5227, 1983.
- (38).- CARNEGIE JA, TSANG BK; Am J Obstet Gynecol 145: 223, 1983.
- (39).- STRAUSS JF III, MAC GREGOR LO, GWYNE JT; J Steroid Biochem 16: 525, 1982.
- (40).- TERESAWA E, RODRIGUEZ-SIERRA JF, DIERSCHKE DJ, BRIDSON WE, GOY W; J Clin Endocrinol Metab 51: 1245, 1980.
- (41).- TSAFRIRI A, LINDNER HR, ZOR U, LAMPRECHT SA; J Reprod Fertil 31: 39, 1972.
- (42).- SCHREIBER JR, HSUEH AJW; Endocrinology 105: 915, 1979.
- (43).- GEBANER H, LINDER HR, AMSTERDAM A; Biol Reprod 18: 350, 1978.
- (44).- MUELLER PL, SCHREIBER JR, LUCHKY AW, SCHULMAN JD, RODBARD D, ROSS GT; Endocrinology 102: 824, 1978.
- (45).- EPPIG JJ; J Exp Zool 208: 111, 1979.
- (46).- EPPIG JJ; Endocrinology 108: 1992, 1982.
- (47).- ROTHCHILD I; Rec Prog Hor Res 37: 183, 1981.
- (48).- CHANNING CP, BRINKLEY HJ, YOUNG EP; Endocrinology 106: 317, 1980.
- (49).- ENDERS AC; Biol Reprod 8: 158, 1973.
- (50).- CRISP TM, DESSONKY DA, DENYS FR; Am J Anat 127: 37, 1970.
- (51).- PAAVOLA LG; Am J Anat 150: 565, 1977.
- (52).- SAVARD K; Biol Reprod 8: 183, 1973.
- (53).- CHANNING CP, TSAFRIRI A; Metabolism 26: 413, 1977.

- (54).- BERHMAN HR; Ann. Rev Physiol 41: 685, 1979.
- (55).- SHEMESH M; J Endocrinol 82: 27, 1979.
- (56).- UCHIDA K, KADOWAKI, MIYAKE T; Endocrinol J pn 17: 509. 1970.
- (57).- GREENWALD GS, ROTHCHILD I; J Anim Sci 27: 139, 197 .
- (58).- HOUEBINE LM; Ann Endocrinol (Paris) 44: 85, 1983.
- (59).- ROWLANDS IW; J Endocrinol 3: 384, 1944.
- (60).- ROBINSON J, STEVENSON PM, BOYD GS, ARMSTRONG DT, Moll Cell Endocrinol 2: 149, 1975.
- (61).- HUNZICKER-DUNN M, BRINBAUMER L; Endocrinology 99: 211, 1976.
- (62).- HUNZICKER-DUNN M, BRINBAUMER RL; Endocrinology 99: 198, 1976.
- (63).- DAY SL, KIRCHICK HJ, BRINBAUMER L; Endocrinology 106: 1265, 1980.
- (64).- MARSH JM; Biol Reprod 14: 30, 1976.
- (65).- MARSH JM, SAVARD K; Steroids 8: 133, 1966.
- (66).- MORISHIGE WK, PEPE GJ, ROTHCHILD I; Endocrinology 92: 1527, 1973.
- (67).- ARMSTRONG DT, O'BRIEN J, GREEP RO; Endocrinology 75: 488, 1964.
- (68).- KNOBIL E; Biol Reprod 8: 246, 1973.
- (69).- HILLIARD J; Bil Reprod 8: 203, 1973.
- (70).- HENSEL W, CONCANNON PW, LUKASZEWSKA JH; Biol Reprod 8: 222, 1973.
- (71).- MORISHIGE WK, ROTHCHILD I; Endocrinology 95: 260, 1974.
- (72).- HIXON JE, ARMSTRONG DT; Biol Reprod 10: 111, 1974.
- (73).- ROTHCHILD I, SCHWARTZ NB; Acta Endocrinology 49: 120, 1965.

- (74).- SPIES HG, COON LL, GIER HT; Endocrinology 94: 1595, 1974.
- (75).- DOHLER KD, WUTTKE W; Endocrinology 94: 1595, 1974.
- (76).- SMITH MS, MC LEAN BK, NEILL JD; Endocrinology 98: 1370, 1976.
- (77).- ROTHCHILD I, PEPE GJ, MORISHIGE WK; Endocrinology 95: 280, 1974.
- (78).- RICHARDS JS, WILLIAMS JJ; Endocrinology 99: 1571, 1976.
- (79).- HOLT JA, RICHARDS JS, MIGDLEY Jr AR, REICHERT Jr LE; Endocrinology 98: 1005, 1976.
- (80).- MAC DONALD GJ, YOSHINAGA K, GREEP RO; Proc Soc Exp Biol Med 143: 1031, 1973.
- (81).- BEHRMAN HR, GRINWICH DL, HICHENS M, MAC DONALD GL; Endocrinology 103: 349, 1978.
- (82).- GIBORI G, ROTHCHILD I, PEPE GJ, MORISHIGE WK, LAM P; Endocrinology 95: 1113, 1974.
- (83).- BASURAY R, JAFFE RA, GIBORI G; Biol Reprod 28: 551, 1983.
- (84).- GIBORI G, BASURAY R, MC REYNOLDS B; Endocrinology 108: 2060, 1981.
- (85).- GIBORI G, HALISON B, BASURAY R, RAO MC, HUNZICKER-DUNN M; Endocrinology 115: 1157, 1984.
- (86).- ELBAUM DJ, KEYES PL; Endocrinology 99: 573, 1976.
- (87).- WEISS JR, BRINKLEY HJ, JOUNG EP; J Anim Sci 42: 121, 1976.
- (88).- WILLIAMS RF, JOHNSON DK, HODGEN GD; Steroids 32: 539, 1978.
- (89).- HAMMERSTEIN J, RICE BF, SAVARD K; J Clin Endocrinol Metab 24: 597, 1964.
- (90).- ALLEN WM, HECKEL GP; Science 84: 161, 1936.
- (91).- ROBSON JM; J Physiol 90: 435, 1937.

- (92).- DE GREEF WS, VILENBROEK JTJ, DE YONG FH; J Endocrinol 94: 369, 1982.
- (93).- BENDER EM, MILLER JB, POSSLEY RM, KEYES FL; Endocrinology 107: 1937, 1978.
- (94).- MEAD RA, SWANNACK A; Biol Reprod 22: 560, 1980.
- (95).- KARSCH FJ, SUTTON GP; Endocrinology 98: 553, 1976.
- (96).- SCHULER LA, SCAVO L, KIRSCH TM, FLICKINGER GL, STRAUSS JF III; J Biol Chem 254: 8662, 1979.
- (97).- TAGATZ GE, GURFIDE E, Handbook of Physiology II: 603, 1973; Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- (98).- SCHULER LA, TOAFF ME, STRAUSS JF III; Endocrinology 108: 1476, 1981.
- (99).- CHRISTIE MH, STRAUSS JF III, FLICKINGER GL; Endocrinology 105: 92, 1979.
- (100).- STRAUSS JF III, SCHULER LA, ROSENBLUM MF, TANAKA T; Adv in Lipid Res 18: 99, 1981.
- (101).- BROWN MS, GOLDSTEIN JL; Science 191: 150, 1976.
- (102).- BEHRMAN HR, ARMSTRONG DT; Endocrinology 85: 474, 1969.
- (103).- COFFREY JL, FLETCHER IW, DIEKMAN MA, O'CALLAGHAN FL, NISWENDER GD; Biol Reprod 21: 601, 1979.
- (104).- WILLIAMS MT, MARSH JM; Advances in Experimental Medical Biology 112: 549, 1979; Plenum, New York.
- (105).- SILAVIN SL, MOSS GE, NISWENDER GD; Steroids 36: 232, 1980.
- (106).- CRIVELLO JF, JEFCOATE CR; J Biol Chem 255: 8144, 1980.
- (107).- SIMPSON ER, BILHEIMER DW, MAC DONALD PC, PORTER JC; Endocrinology 104: 8, 1979.
- (108).- LEAVEN HA, BOYD GS; J Endocrinology 91: 123, 1981.
- (109).- LAMBERT JD, KEMIN H, SEYVERT DW; J Biol Chem 255: 8282, 1980.

- (110).- NAUMOFF PA, STEVENSON PM; *Biochim Biophys Acta* 673: 359, 1981.
- (111).- MORI M, MARSH JM; *J Biol Chem* 257: 6178, 1982.
- (112).- DEXTER RW, FISHMAN LM, NEY KL, LIDDLE GW; *I Clin Endocrinol Metab* 27: 473, 1967.
- (113).- HEKSAR A, ROMANOFF EB; *Biochem Biophys Res Commun* 43: 246, 1971.
- (114).- DIMINO MJ, CAMPBELL MD; *Proc Soc Exp Biol Med* 152: 54, 1976.
- (115).- RODWAY RG, KUHN NJ; *Biochem J* 152: 433, 1975.
- (116).- LAHAV M, LAMPRECHT SA, ARMSTERDAM A, LINDNER HR; *Mol Cell Endocrinol* 6: 293, 1977.
- (117).- SCHOMBERG DW, CONDERT SP, SHORT RV; *J Reprod Fertil* 14: 277, 1967.
- (118).- ARMSTRONG DT, O'BRIEN J, GREEP RO; *Endocrinology* 75: 488, 1967.
- (119).- MOROH JM; *Biol Reprod* 14: 30, 1976.
- (120).- MARSH JM; *J Biol Chem* 245: 1596, 1970.
- (121).- REICHERT ND, RYAN RJ; *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4857, 1977.
- (122).- ZOR U; *Endocr Rev* 4: 1, 1983.
- (123).- VELDHUIS JD, KLASE PA; *Endocrinology* 111: 1982.
- (124).- VAITUKAITIS JL, LEE CY, EBERSOLE ER, LERARIO AC; *Endocrinology* 97: 215, 1975.
- (125).- DARBON J-M, URSELY J, LEYMARIE P; *Eur J Biochem* 119: 237, 1981.
- (126).- FARESE RV; *Endocr Rev* 4: 78, 1983.
- (127).- DAVIES JS, FARESE RV, MARSH JM; *Endocrinology* 109: 469, 1981.
- (128).- LEUNG FCK, RAYMOND U, LABRIE F; *Endocrinology* 112: 1138, 1983.

- (129).- STRAUSS JF III, TANAKA T, MAC GREGOR L, TURECK RW; Adv Exp Med Biol 147: 303, 1982.
- (130).- RERUP CC; Pharmacol Rev 22: 485, 1970.
- (131).- DEBELYUK L, ROZADOS R, DASKAL H, VILLEGAS VELEY C, MANCINI AM; Proc Soc Exp Biol Med 148: 550, 1975.
- (132).- DEL POZO E, BRUNDEL R, VARGA R, FRIESEN HG; J Clin Endocrinol 35: 766, 1972.
- (133).- CCNTI M, HARWOOD JP, DUFAU ML, CATT KJ; J Biol Chem 252: 8869, 1977.
- (134).- THORELL JI, JOHANSSON BG; Biochem Biophys Acta 251: 363, 1971.
- (135).- CHARREAU EH, ATTRAMADAL A, TORJESEN PA, CALANDRA R, PURVIS K, HANSSON V; Moll cell Endocrinol 7: 1, 1977.
- (136).- CALVO JC, RADICELLA JP, CHARREAU EH; Biochem J 212: 259, 1983.
- (137).- SCATCHARD G; Ann NY Acad Sci 51: 660, 1949.
- (138).- ROY EJ, MC EWEN BS; Steroids 30: 657-669, 1977.
- (139).- BURTON KA; Biochem J 62: 315, 1956.
- (140).- LOWRY OH, CLEMENS JA, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ; J Biol Chem 193: 265, 1951.
- (141).- THOMPSON WJ, APPLEMAN MM; Biochemistry 10: 311, 1971.
- (142).- LONDESBOROUGH J; Anal Biochem 71: 623, 1976.
- (143).- ABRAHAM GE, SWERDLOFF R, TULCHINSKY D, ODELL WD; J Endocrinol Metab 32: 619, 1971.
- (144).- BROWN BL, ALBANO JDM, EKINS RP, SGHERZI AM; Biochem J 121: 561, 1971.
- (145).- LIBERTUN C (Editor). Radioinmunoanálisis. López Editores. Buenos Aires 1980.
- (146).- NISWENDER GD, MIDGLEY AR, MONROE SE, REICHERT LE; Proc Soc Exp Biol Med 128: 807, 1968.
- (147).- SOLANO AR, DUFAU ML, CATT KJ; Endocrinology 105: 372, 1979.

- (148).- CALVO JC; Tesis de doctorado, 1979.
- (149).- CHARREAU EH, CALVO JC, TESONE M, DE SOUZA VALLE, BARAÑÓ JLS; J Biol Chem 253: 2504-2506, 1978.
- (150).- RODBARD D; Clin Chem 20: 1255, 1974.
- (151).- LI CC, Introduction to Experimental Statistics Mc Graw Hill (edt). New York, 1964.
- (152).- THAKUR AK, JAFFE ML, RODBARD D; Anal Biochem 107: 279, 1980.
- (153).- FAIN JN; Biochemistry of Hormones 8: 1, 1974, Butterworth London.
- (154).- PILKIS SJ, PARK CR; Ann Rev Pharmacol 14: 365, 1974.
- (155).- FREYCHET P; Diabetologia 12: 83, 1976.
- (156).- KAHN CR; Trends in Biochem Sci 4: 263, 1979.
- (157).- KAHN CR; Proc Soc Exp Biol Med 162: 13, 1979.
- (158).- DE MEYTS P, BIANCO AR, ROTH J; J Biol Chem 251: 1877, 1976.
- (159).- KAHN CR; J Cell Biol 70: 261, 1976.
- (160).- CUATRECASAS P; Ann Rev Biochem 43: 169, 1974.
- (161).- CZECH MP, MASSAGUE J, PILCH PF; Tibs 6: 222, 1981.
- (162).- BARON MD, SONKSEN PH, Biochem J 212: 79, 1983.
- (163).- KASUGA M, KARLSSON FA, KAHN CR; Science 215: 185, 1982.
- (164).- DENTON RM, BROWNSEY RW, BELSHAM GJ; Diabetologia 21: 347, 1981.
- (165).- FEHLMAN M, CARPENTIER JL, VAN OBBERGHEN E, FREYCHET P, THAMM P, SAUNDERS D, BRANDENBURG D, ORCI L; Proc Natl Acad Sci USA 79: 5921, 1982.
- (166).- TERRIS S, STEINER DF; J Biol Chem 250: 10052, 1980.
- (167).- HOUSLAY MD; Biochemical Educ. 12: 49, 1984.

- (168).- HCUSLAY MD, HEYWORTH CM; *Trends Biochem Sci* 8: 449, 1983.
- (169).- CUSHMAN SW, WARDZALA LJ, SIMPSON IA, KARNIELLI E, HISSIN PJ, WHEELER TJ, HINKLE PC, BALANS LB: *Hormones and Cell Regulation* 7: 73, 1983 Dumont JE, Núñez J. Denton RM, Elsevier Biomedical Press Amsterdam.
- (170).- KASUGA M, ZICK Y, BLITH DL, KARLSSON FA, HARING HU, KAHN CR; *J Biol Chem* 257: 9891, 1982.
- (171).- VAN OBERGHEN E, ROSSI B, KOWALSKI A, GAZZANO H, PONZIO G; *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 945, 1983.
- (172).- ZICK Y, WHITTAKER J, ROTH J; *J Biol Chem* 258: 3431, 1983.
- (173).- KASUGA M, FUJITA-YAMAGUCHI Y, BLITHE DL, KAHN CR; *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2137, 1983.
- (174).- STADTMANER LA, ROSEN OM; *J Biol Chem* 258: 6682, 1983.
- (175).- FLUCKIGER E, DEL POZO E, VON WERDER K; *Prolactin. Physiology Pharmacology and Clinical Findings* 1-41, 1982 Editado por Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- (176).- SANDIER J, DUBE JY, TREMBLAY RR; *Endocrinology* 109: 2220, 1981.
- (177).- REIN MS, SCHOMBERG DW; *Biol Reprod* 26: 113 A (Abstr), 1982.
- (178).- HAVIANKOVA J, ROTH J, BROWNSTEIN M; *Nature* 242: 827, 1978.
- (179).- GOODNER CJ, FREINKEL N; *J Clin Invest* 40: 261, 1961.
- (180).- ADASHI EY, HSUEH AJW, YEN SSC; *Endocrinology* 108: 1441, 1981.
- (181).- ADASHI EY, FABRIES C, HSUEH AJW; *Biol Reprod* 26: 270, 1982.
- (182).- AIDELLS BD, KONRAD MW, GLASER DA; *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1862, 1979.
- (183).- MAY JV, SCHOMBERG DW; *Biol Reprod* 25: 421-431, 1981.
- (184).- JOHNSON CC, DAWSON WE, TURNER JT, WYCHE JH; *J Cell Biol* 86: 483, 1980.
- (185).- KALRA SP, KABRA PS; *End Rev* 4: 311, 1983.

- (186).- DANNIES PS; Biochem Pharmacol 31: 2845, 1982.
- (187).- SAVION N, LUI GM, LAHERTY R, GOSPODAROWICZ D; Endocrinology 109: 409, 1981.
- (188).- CHANNING CP, TSAI V, SACHS D; Biol Reprod 15: 235, 1976.
- (189).- MAY JV, MC CARTY K Jr, REICHERT LE, SCHOMBERG DW; Endocrinology 107: 1041, 1980.
- (190).- MAY JV; Endocrinology Suppl 112: 359, 1983.
- (191).- ALLEN WR, NILSEN-HAMILTON M, HAMILTON RT; J Cell Physiol 108: 15, 1981.
- (192).- BARBIERI RL, MAKRIS A, RYAN KJ; Fertil Steril 40: 237, 1983.
- (193).- BARBIERI RL, RYAN KJ; Am J Obstet Gynecol 147: 90, 1983.
- (194).- GARZO VG, DORRINGTON JH, Am J Obstet Gynecol 148: 657, 1984.
- (195).- BEN DAVOREN J, HSUEH AJW; Moll Cell Endocrinol 35: 97, 1984.
- (196).- SKYLER JS, CAHILL GF; Am J Med 70: 101, 1981.
- (197).- MARX JL; Science 225: 4668, 1984.
- (198).- BERGVIST N; Acta Endocr (Suppl) 18: 1, 1954.
- (199).- FOGLIA VG; Brit Med J II: 844, 1958.
- (200).- BABBOT D, RUBIN A, GINSBURG SJ; Diabetes 7: 33, 1958.
- (201).- SCHOFFLING K, FEDULING K, SCHMITT W, PFEIFFER E; Acta Endocrinol 54: 335, 1967.
- (202).- IRISANA SH, SHIRAI M, MATSUSHITA SH, KAGAYAMA M, ICHIJO S, TOHOKU J; Exp Med 88: 311, 1966.
- (203).- HORTSMANN L; Acta Endocr 5: 261, 1958.
- (204).- BERGQVIST N; Acta Endocrinol 19: 3, 1954.
- (205).- TRZECIAK B; Ginekol Pol 49: 119, 1978.
- (206).- PINGET M, KRUNNEL Y, GONDAR R, DORNER M; Monv Presse Med 44: 3664, 1979.
- (207).- DJURSING H, NYHOLM HC, HAGEN C, CARSHENSEN I, PEDERSEN LM; Am J Obstet Gynecol 143: 876, 1982.

- (208).- CHIERI RA, PIVETTA OH, FOGLIA VG; Fertil Steril 20: 661, 1969.
- (209).- GRAY CH; Ciba Found Coll Endocr 6: 330, 1953.
- (210).- SHIPLEY EG, DANLEY KS; Ann J Physiol 150: 84, 1947.
- (211).- GABBE SG; Am J Med 70: 613, 1981.
- (212).- VON MERING J, MINKOWSKI O; Arch Exper Path 26:371, 1889.
- (213).- BANTING FG; BEST CH; J Lab Clin Med 7: 464, 1922.
- (214).- HOUSSAY BA, BIASOTTI A; Endocrinology 15: 511, 1931.
- (215).- BASABE JC; CHIERI RA, FOGLIA VG; Proc Soc Exp Biol Med 130: 1159, 1969.
- (216).- BLUMENKRANTZ N, PERALTA RAMOS MC, GONZALEZ N, CALAMERA JC, IBARRA R, FOGLIA VG; Acta Physiol Latinoamer 20: 331, 1970.
- (217).- BORGHELLI RF, SPINELLI I, FOGLIA VG; Rev Soc Arg Biol 37: 106, 1961.
- (218).- FELDS E, FOGLIA VG; Rev Soc Argent Biol 24: 51, 1948.
- (219).- FERNANDEZ-COLLAZO EL, FOGLIA VG; Physiol Behav 5: 1451, 1970.
- (220).- FOGLIA VG, FERNANDEZ-COLLAZO EL, GRANILLO R, WERTELECKI W, WESELY OR; Sesiones Científicas de Biología Mendoza Argentina 1960 F 38.
- (221).- LEMA BE, FOGLIA VG, FERNANDEZ-COLLAZO EL; Rev Soc Argen Biol 41: 197, 1965.
- (222).- TESONE M, BIELLA DE SOUZA VALLE L, FOGLIA VG, CHARREAU EH; Acta Physiol Latinoamer 26: 387, 1976.
- (223).- FOGLIA VG; Rev. Soc Argent Biol 10: 21, 1944.
- (224).- FOGLIA VG; Rev Soc Argent Biol 25: 250, 1945.
- (225).- FOGLIA VG; Acta Physiol Latioamer 12: 22, 1962.
- (226).- FOGLIA VG; J Diabet Hotel Dieu 249, 1971.

- (227).- FOGLIA VG, FERNANDEZ-COLLAZO EL, GRANILLO R, WERTELECKI W, WESELY OR; Sesiones Científicas de Biología, Mendoza Argentina 38, 1960.
- (228).- FOGLIA VG, FERNANDEZ-COLLAZO EL, WESELY O, WERTCLECKI N, GRANILLO R; Rev Soc Argent Biol 37: 127, 1961.
- (229).- FOGLIA VG, FERNANDEZ-COLLAZO EL, WERTELECKI N, WESELY O, GRANILLO R; Rev Invest (Méx) 2: 1, 1962,
- (230).- FOGLIA VG, PENHOS JC; Rev Soc Argent Biol 28: 143, 1952.
- (231).- FOGLIA VG, PERALTA RAMOS MC, IBARRA R, RIVERA CORTES I; Rev Soc Argent Biol 43: 158, 1967.
- (232).- FOGLIA VG, PERALTA RAMOS MC, IBARRA R, RIVERA CORTES I; Rev Soc Argent Biol 43: 188, 1967.
- (233).- FOGLIA VG, RIVERA CORTES L, PERALTA RAMOS MC, LEMA BE; 23rd Congr Intern Physiol Tokyo 286, 1965.
- (234).- FOGLIA VG, ROSNER J, PERALTA RAMOS MC, LEMA BE; Horm Metab Res 1: 72, 1969.
- (235).- FOGLIA VG, SCHUSTER N, RODRIGUEZ R; Endocrinology 41: 428, 1947.
- (236).- FOGLIA VC, SCHUSTER N, RODRIGUEZ R; Rev Soc Argent Biol 23: 202, 1947.
- (237).- FOGLIA VG, SPINDLER L, BORGHELLI R; Rev Soc Argent Biol 37: 106, 1961.
- (238).- TESONE M; Tesis de Doctorado 1979.
- (239).- IRUSTE D, FOGLIA VG; Rev Soc Argent Biol 49: 56, 1973.
- (240).- OKSANEN A, TUOHIMAA P; Hormone Res 6: 138, 1975.
- (241).- HOWLAND BE, ZEMBROWSKY EJ; Horm Metab Res 8: 465, 1976.
- (242).- CALVO JC, VALLE LBS, FOGLIA VG, CHARREAU EH; Horm Metab Res 11: 161, 1979.
- (243).- TESONE M, OLIVEIRA-FILHO RM, VALLE LBS, CALVO JC, BARAÑO JLS, FOGLIA VG, CHARREAU EH; Diabetologia 18: 385, 1980.

- (244).- BARAÑAO L; Tesis de Doctorado, 1981.-
- (245).- CALVO JC, BARAÑAO JL, TESONE M, CHARREAU EH; J Steroid Biochem 20: 769, 1984.
- (246).- ANGERWALL L; Acta Endocr 1 Suppl 44: 86, 1959.
- (247).- DAVIS ME, FUGO N, LAURENCE KC; Proc Soc Exp Biol Med 66: 638, 1947.-
- (248).- LINDON O, MORGNAS ME; J Endocri 6: 463, 1949.
- (249).- SOULAIRAC A, DESCLAUX P; Ann d'Endocr 9: 333, 1948.
- (250).- LAURENCE AM, CONTOPOULOS AV; Acta Endocrinol 33: 175, 1960.
- (251).- SINDEN JA, LONGWELL BR; Proc Soc Exp Biol Med 70: 607, 1949.
- (252).- LEVY JE, WEINBERG T; Proc Soc Exp Biol Med 72: 658, 1949.
- (253).- LIU FTY, LIU HS, JOHNSON DC; Endocrinology 91: 1172, 1972.
- (254).- DENARI JH, CHERI RA, FOGLIA VG; Rev Soc Argent Biol 44: 68, 1968.
- (255).- KIRKLAND JL, BARRET GN, STANCEL GM; Endocrinology 109: 316, 1981.
- (256).- WEISENBERG L, FRIDMAN O, LIBERTUN C, DE NICOLA AF; J Steroid Biochem 19: 1737, 1983.
- (257).- EKKA E, VANDERHEYDEN I, DE HERTOOGH R; Endocrinology 111: 456, 1982.
- (258).- EKKA E, VANDERHEYDEN I, DE HERTOOGH R; Endocrinology 114: 2272, 1984.
- (259).- HOWLAND BE, ZEBROWSKI EJ; Experientia 36: 610, 1980.
- (260).- FAZ G, HOMONNAI ZT, DRASNIN N, SCFER A, KAPLAN R, KRAICER PF; Andrología 10: 127, 1978.
- (261).- KIRCHICK HJ, KEYES PL, FRYE BE; Endocrinology 105: 1343, 1479.

- (262).- KI WHICK HJ, KEYES PL, FRYE BE; Acta Endocrinol 100: 266, 1982.
- (263).- JUNOD A, LAMBERT AE, ORCI L, PICTET R, GONET AF, RENOLD AE; Proc Soc Exp Biol Med 126: 201, 1967.
- (264).- MORDES JP, ROSSINI AA; Am J Med 70: 353, 1981.
- (265).- HOFFIEZER V, CARPENTER AM; Diabetologia 9, 178-184, 1973.
- (266).- BEAVO J, HARDMAN J, SUTHERLAND E; J Biol Chem 245: 5649, 1970.
- (267).- RUSSELL T, TERASKI W, APPLEMAN M; J Biol Chem 248: 1334, 1973.
- (268).- SCHUBERT U, UDEM S, ROSEN O; Moll Cell Endocrinol 1: 227, 1974.
- (269).- HUANG Y, KEMP R; Biochemistry 10: 2278, 1971.
- (270).- BROSTROM C, WOLFF D; Arch Biochem Biophys 165: 715, 1974.
- (271).- PLEDGER W, STANCEL G, THOMPSON W, STRADA S; Biochem Biophys 370: 242, 1974.
- (272).- KEKINCHI S, YAMAZAKI R, TESHIMA Y, VENISKI K, MIYAMOTO E; Biochem J 146: 109, 1975.
- (273).- DUDKIN SM, MIKCHAYLOVA LI, SEVERIN Jr ES; Adv Enzimol 21: 333, 1983.
- (274).- APPLEMAN MM, ALLAN EH, ARIANO MA, ONG KK, TUSANG CH, WEBER HW, WHITSON RH; Adv in Cyclic Nucl Prot Res 16: 149, 1984.
- (275).- HOUSLAY MD, WALLACE AV, MARCHMONT RJ, MARTIN BR, HEYWCRTH CM; Adv in Cyclic Nucl Prot Res 16: 159, 1984.
- (276).- SHIMA S, KAWASHIMA Y, HIRAI M; Acta Endocrinol (Copenh) 90: 139, 1979.
- (277).- SHIMA S, KAWASHIMA Y, HIRAI M; Endocrinology 103: 1361, 1978.
- (278).- DORRINGTON JH, FRITZ JB; Endocrinology 94: 395-403, 1974.

- (279).- DUFAY ML, TSURUHARA T, HORNER KA, PODESTA E, CATT KJ; Proc Natl Acad Sci (USA)74, 3419-3423, 1977.
- (280).- PURVIS K, HANSSON V; Int J Androl 3, 713-718, 1980.
- (281).- RICHARDS JS, SEGLA N, TASH JS; J Biol Chem 258: 5227, 1983.
- (282).- GEREMIA R, ROSSI P, PEZZOTTI R, CONTI M; Moll Cell Endochr 28: 37-53, 1982.
- (283).- GALLANT S, KAUFFMAN FC, BROWNIC AC; Life Sci 14: 937, 1974.
- (284).- CONTI M, KASSON B, HSUEH AJW; Endocrinology 114: 2361, 1984.
- (285).- PURVIS K, OLSEN A, HANSSON V; J Biol Chem 256: 11434, 1981.
- (286).- CONTI M, TOSCANO MV, PETRELLI L, GEREMIA R, STEFANINI M; Endocrinology 110: 1189, 1982.
- (287).- SCHMIDTKE J, MEYER H, EPPLEN JT; Acta Embriol Exp (Pa-lermo) 98: 404, 1980.
- (288).- KNECHT M, CATT KJ; Science 214: 1346.
- (289).- DE HERTOOGH R, VANDERHEYDEN I, DELAIT AM, EKKA E; J Steroid Biochem 21: 433, 1984.
- (290).- DUFAY ML, CATT KJ; Vitam Horm 36: 462, 1978.
- (291).- VESELY DL; Streptozotocin: Fundamentals and Therapy, Editado por M.K. Agarwal CNRS Paris, 247, 1981.
- (292).- DAS I Horm Metab Res 5: 330, 1973.
- (293).- LADENHEIM RG, TESONE M, CHARREAU; Soc Arg de Biología Noviembre, 1982 (Abtstr).
- (294).- DUFAY ML, MEANS AR, Current Topics in Molecular Endo-crinology 1:1, Plenum Press New York and London, 1974.
- (295).- SALA GB, DUFAY ML, CATT KJ; J Biol Chem 254: 2077, 1979.
- (296).- DUFAY LM, TSURUHARA T, HOMER KA, PODESTA E, CATT KJ; Proc Natl Acad Sci USA 74: 3419, 1977.

- (297).- MAKINO H, OSEGAWA M, KANATSUKA A, SUZUKI T; *Endocr* 113: 646, 1983.
- (298).- DE MEYTS P, BIANCO HR, ROTH J; *JBC* 251: 1877, 1976.
- (299).- OLEFSKY JM, JEN P, REAVEN GM; *Diabetes* 23: 565, 1974.
- (300).- FREYCHET P, KAHAN R, ROTH J, NEVILLE DM Jr; *J Biol Chem* 247: 3953, 1972.
- (301).- KAHN CR, NEVILLE DM Jr, GORDEN P, FREYCHET P, ROTH J; *Biochem Biophys Res Commun* 48: 135, 1972.
- (302).- JACOBS S, CUATRECASAS P; *Endocr Rev* 2: 3, 1981.
- (303).- CUATRECASAS P; *J Biol Chem* 246: 6532.
- (304).- HEYWORTH CM, RAWAL S, HOUSLAY MD; *FEBS Lett* 154: 87, 1983.
- (305).- CARLSON JC, GRUBER MY, THOMPSON JE; *Endocrinology* 113: 190, 1983.
- (306).- VELDHUIS JD, KOLP LA, TOAFF ME, STRAUSS III SF, DEMERS LM; *J Clin Invest* 72: 1046, 1983.
- (307).- VELDHUIS JD, KOLP L; *Endocrinology* 116: 651, 1985.
- (308).- BARAÑAO JLS, HAMMOND JM; *BBRC* 124: 484, 1984.
- (309).- VELDHUIS JD, TAMURA S, KOLP L, FURLANETTO SW, LARNER JBB; *BBRC* 120: 144, 1984.
- (310).- SMITH GL; *Moll Cell Endocr* 34: 83, 1984.
- (311).- WEBER HW, APPLEMAN MM; *J Biol Chem* 257: 5339, 1982.
- (312).- BAHL OP; *Federation Proc* 36: 2119, 1977.
- (313).- CHEN HC, SHIMOHIGASHI Y; *Febs Letters* 150: 64, 1982.
- (314).- CHEN HC, SHIMOHIGASHI Y, DUFAY ML, CATT KJ; *J Biol Chem* 257: 1446, 1982.
- (315).- SOLANO AR, VELA AG, CATT KJ, DUFAY ML; *Febs Letters* 122: 184, 1980.

- (316).- DUFAL ML, NOYU K, DEHEJIA A, GARCIA VELA A, SOLANO AR, FRAIOLI F, CATT KJ; Pituitary Hormones and Related Peptides 1982, M Motta, M Zanisi and F Piva Ac Press, London and New York.
- (317).- HOUSSAY BA, FOGLIA VG, RODRIGUEZ RR; Acta Endocr Copenh 17: 146, 1954.
- (318).- KIRCHICK HJ, KEYES PL, FRYE BE; Endocrinology 102: 1867, 1978.
- (319).- KATAYAMA S, BROWNSCHIEDLE OM, WOOTTEN V, SHIMAOKA K, Diabetes, 33: 324, 1984.
- (320).- VOMACHKA MS, JOHNSON DC; Proc Soc Exp Biol Med: 171, 1982.
- (321).- WALKER AM, FARQUHAR MG; Endocr 107: 1095, 1980.
- (322).- CLARCK CR; TIBS 9: 207, 1984.
- (323).- RISKINA PN, MILLARD WJ, MARTIN JB; Endocrinology 115: 312, 1984.
- (324).- LEONG DA, FRAWLEY LS, NEILL JD; Ann Rev Physiol 45: 109, 1983.
- (325).- FINK G, KOCH Y, BEN AROYA N; Brain Research 243: 186, 1982.
- (326).- MAURER RA, GORSKI J; Endocrinology 101: 76, 1977.
- (327).- LIEBERMAN ML, MAURER RA, BORSKI J; Proc Natl Acad Sci (USA) 75: 5946, 1978.
- (328).- STONE RT, MAURER RA, GORSKI J; Biochemistry 16: 4925, 1977.
- (329).- MAURER RA; J Biol Chem 257: 2133, 1982.
- (330).- SHULL JD, GORSKI J; Endocrinology 114: 1550, 1984.
- (331).- RAYMOND V, BEADLIEU M, LARIE F, BOISSIER J; Science 200: 1173, 1978.
- (332).- FARQUHAR MG, REID JJ, DANIELL LW; Endocr 102, 296 (19+8)
- (333).- SINKA YN, GILLIGAN TA; Endocrinology 107: 1959, 1980.
- (334).- SHIN SH, REIFEL CW; Neuroendocrinology 32: 139, 1981.

- (335).- JONES PBC, HSUEH AJW; *Endocrinology* 109: 1347, 1981.
- (340).- BARAÑO JLS, TESONE M, OLIVEIRA-FILHO RM, CHIAUZZI VA, CALVO JC, CHARREAU EH, CALANDRA RS; *J Andrology* 3: 281, 1982.
- (341).- GARRIS DR, ROTHCHILD I; *Endocrinology* 107: 112, 1980.
- (342).- HOLT JA, RICHARDS JS, MIDGLEY Jr AR, REICHERT Jr LE; *Endocrinology* 98: 1005, 1976.
- (343).- DAY SL, BIRNBAUMER L; *Endocrinology* 106: 382, 1980.
- (344).- STRAUSS III JF, STAMBENGH RL; *Prostaglandins* 5: 73, 1974.
- (345).- GIBON G, RICHARDS JS, KEYES PL; *Biol Reprod* 21: 419, 1979.
- (346).- GIBON G, KEYES PL; *Endocrinology* 106: 1584, 1980.
- (347).- ARMSTRONG DT, MILLER LS, KUNDSEK A; *Endocrinology* 85: 393, 1969.
- (348).- KLEMEKE HG, BRINKLEY JH; *Biol Reprod* 22: 1022, 1980.
- (349).- BILLETTER E, FLUCKIGER E; *Experientia* 27: 464, 1971.
- (350).- WUTTKE W, MEITES J; *Proc Soc Exp Biol Med* 137: 988, 1971.
- (351).- MC NEILLY AS, GLASIER A, JONASEN J, HOWIE PW; *J Re prod Fertil* 65: 559, 1982.
- (352).- DORRINGTON J, GORE-LANGTON RE; *Nature* 290: 600, 1981.
- (353).- DORRINGTON JH, GORE-LANGTON RE; *Endocrinology* 110: 1701, 1982.
- (354).- MAGOFFIN DA, ERICKSON GF; *Endocrinology* 111: 1085, 1982.
- (355).- TAKADA M, TERAKAWA N, AONO T, KARACHI K, TSUJI M, MATSUMOTO K; *J Steroid Biochem* 20: 657, 1984.
- (356).- POLAN ML, OHKAWA R, BOTERO-RUIS W, LANFER N, DE CHERNEY AH; *Endocrinology (Suppl)* 112: 309, 1983.
- (357).- RANI CSS, SALHANICK AR, ARMSTRONG DT; *Endocrinology* 108: 1379, 1981.

- (358).- VELDHUIS JD, KLASE P, HAMMOND JM; *Endocrinology* 107: 42, 1981.
- (359).- MC NATTY KP; *Fert Steril* 32: 433, 1979.
- (360).- RICHARDS JS, WILLIAMS JJ; *Endocrinology* 99: 1571, 1976.
- (361).- KNECHT M, AMSTERDAM A, CATT K; *J Biol Chem* 256: 1062P, 1981.
- (362).- HARWOOD JP, CLAYTON RN, CHEN TT, KNOX G, CATT KJ; *Endocrinology* 107: 414, 1980.
- (363).- NEVICKIS RJ, JONES PBC, HSUEH AJW; *Moll Cell Endocrinol* 27: 77, 1982.
- (364).- BONIFACINO JS, DUFAU ML; *Hormone Receptors in Growth and Reproduction 1984*, BB Sazena at al Raven Press New York.
- (365).- BONIFACINO JS, DUFAU ML; *J. Biol Chem* 259: 4542, 1984.
- (366).- CRISP TM; *Endocr* 101: 1286, 1977.
- (367).- VELDHUIS JD, KLASE P, HAMMOND JM; *Endocr* 107: 42, 1980.
- (368).- MC NEILLY AS; *J Reprod Fert* 58: 537, 1980.
- (369).- MC NEILLY AS, GLASIER A, JONASSEN J, HOWIE PW; *J Reprod Fert* 65: 559, 1982.
- (370).- CONTI M, GEREMIA R, ADAMO S, STEFANINI M; *BERG* 98: 1044-1050, 1981.
- (371).- VERHOVEN G, CAILLEAU I, de MOOR P, *Moll Cell. Endocr* 24 41-51, 1981.
- (372).- KAHN RC, FREYCHET P, ROTH J, NEVILLE Jr DM; *J Biol Chem* 249:2249, 1974.
- (373).- DUCKWORTH WC, KITABCHI AE; *Endocr. Rev* 2:210, 1981.