

Tesis de Posgrado

Receptores para hormonas sexuales en pituitaria y sistema nervioso central

Weisenberg, Liliana Sara

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:

Weisenberg, Liliana Sara. (1985). Receptores para hormonas sexuales en pituitaria y sistema nervioso central. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1930_Weisenberg.pdf

Cita tipo Chicago:

Weisenberg, Liliana Sara. "Receptores para hormonas sexuales en pituitaria y sistema nervioso central". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1930_Weisenberg.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis 1930

ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**RECEPTORES PARA HORMONAS SEXUALES EN
PITUITARIA Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Autor: Liliana Sara Weisenberg

Director: Dr. Alejandro F. De Nicola

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

Instituto de Biología y Medicina Experimental

— 1985 —

Tesis 1930
ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

RECEPTORES PARA HORMONAS SEXUALES EN
PITUITARIA Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Autor: Liliana Sara Weisenberg

Director: Dr. Alejandro F. De Nicola

Tesis presentada para optar al título
de Doctor en Ciencias Químicas

Instituto de Biología y Medicina Experimental

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro F. De Nicola agradezco especialmente el aporte de sus conocimientos y su constante apoyo y estímulo que hicieron posible la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por su colaboración, comprensión y buen humor permanente.

A la Sra. Elsa de Matteo por la ayuda técnica brindada.

Al Dr. Carlos Libertun y sus colaboradores por el trabajo compartido.

A todos los integrantes del Instituto de Biología y Medicina Experimental.

A Aldo

A Nicolás y Daniela

INDICE

<u>CAPITULO I</u>	pag.
<u>INTRODUCCION</u>	2
I. Reseña Anatómica y Fisiológica sobre la Unidad Hipotálamo- Hipofisaria	
1. Hipófisis. Datos Anátomo-Fisiológicos	4
a) Irrigación	6
b) Citofisiología de la hipófisis	8
c) Hormonas hipofisarias. Función	10
2. Reseña Anatómica del Hipotálamo	14
a) Hormonas hipotalámicas	16
II. Hormonas y Receptores	20
1. Concepto de receptor y tejido blanco	20
2. Dinámica del receptor hormonal	21
3. Receptores neurales e hipofisarios para el estradiol	27
4. Mecanismos alternativos de acción estrogénica	30
III. Acciones Fisiológicas de los Estrógenos	33
 <u>CAPITULO II</u>	
<u>EFFECTOS DE LA LESION DE LA EMINENCIA MEDIA DEL HIPOTALAMO SOBRE LA UNION Y CAPTACION DE ESTRADIOL EN LA HIPOFISIS ANTERIOR</u>	39
Introducción	40

Material es y Métodos	pag.
- Animales	43
- Lesión de eminencia media	43
- Recolección de sangre	44
- Disección de zonas cerebrales	44
- Receptores	
Ensayo de receptor citoplasmático para estradiol	45
- Captación de (³ H) estradiol por la pituitaria anterior y zonas del sistema nervioso central	47
- Determinación de proteínas	48
- Determinación de la síntesis proteica	48
- Determinación de los niveles séricos de hormonas hipofisarias	49
- Análisis estadísticos	50
Resultados	51
Discusión	59

CAPITULO III

EFFECTO DE LA BROMOCRIPTINA Y LHRH SOBRE LOS

RECEPTORES ESTROGENICOS DE LA ANTEROHIPOFISIS

Introducción	65
Material es y Métodos	
- Animales	

	pag.
Lesión de la eminencia media	68
Transplante de la hipófisis debajo de la cápsula renal	68
- Tratamiento con drogas que modifican la secreción de prolactina	70
- Tratamiento con el factor liberador de gonadotrofinas	70
- Receptores	
Ensayo del receptor citoplasmático para estradiol	71
Ensayo de intercambio nuclear para estradiol	71
- Incubación "in vitro" de pituitaria anterior	73
- Determinación de los niveles séricos de hormonas hipofisarias	73
- Análisis estadísticos	73
Resultados	74
Discusión	88

CAPITULO IV

EFFECTOS DE LA DIABETES SOBRE LA UNION DEL ESTRADIOL

EN EL CITOSOL DE LA PITUITARIA ANTERIOR E HIPOTALAMO 93

Introducción 94

Materiales y Métodos

- Animales 96

- Inducción de la diabetes 96

- Receptores

Ensayo del receptor citoplasmático para estradiol 96

	pag.
- Captación nuclear de (³ H) estradiol por la pituitaria anterior e hipotálamo	97
- Incorporación de ¹⁴ C-aminoácidos a proteínas hipofisarias	98
- Análisis estadísticos	99
Resultados	100
Discusión	104

CAPITULO V

CAMBIOS EN LA TRANSLOCACION NUCLEAR DEL COMPLEJO (³H)-E₂

<u>RECEPTOR EN LA PITUITARIA ANTERIOR DE RATAS DIABETICAS</u>	106
Introducción	107
Materiales y Métodos	
- Animales	109
- Inducción de la diabetes	109
- Inducción del receptor progestacional	109
- Recolección de sangre	110
- Receptores	
Ensayo de intercambio nuclear para estradiol en la pituitaria anterior	110
Ensayo de receptor citosólico progestacional en la pituitaria anterior	110
Ensayo de intercambio nuclear para estradiol en el útero	111

	pag.
- Determinación de los niveles séricos de hormonas	112
- Análisis estadísticos	112
Resultados	113
Discusión	120
<u>CAPITULO VI</u>	
<u>EFFECTOS HORMONALES SOBRE LOS RECEPTORES ESTROGENICOS</u>	
<u>LIBRES EN NUCLEOS CELULARES DE LA PITUITARIA ANTERIOR</u>	124
Introducción	125
Materiales y Métodos	
- Animales	128
- Tratamientos hormonales	128
- Receptores	
Determinación de receptores libres nucleares para estradiol	130
Ensayo del receptor citosólico progestacional en la pituitaria anterior	130
- Unión a ADN-celulosa	130
- Análisis estadísticos	131
Resultados	132
Discusión	144
<u>CONCLUSIONES FINALES</u>	148
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	153

C A P I T U L O I

INTRODUCCION

Las biomoléculas pueden clasificarse en informacionales y no informacionales. En este último grupo se encuentran los azúcares y las grasas mientras que las moléculas informacionales son: las proteínas, los ácidos nucleicos y las hormonas esteroides. La gran versatilidad y especificidad de las hormonas esteroides implica que un cambio tan sutil como la introducción o carencia de un oxígeno o un hidrógeno modifique sustancialmente su actividad biológica.

En el caso de los estrógenos su elaboración por los ovarios es compleja y su carácter fenólico los distingue claramente del resto de las hormonas. Por este motivo son moléculas capaces de modificar la actividad genética (son conductoras de información) en cantidades circulantes extremadamente pequeñas, del orden de picogramos, mientras que otros esteroides tales como corticoides o progestágenos necesitan concentraciones 10 a 100 veces mayores para inducir cambios a nivel de sus células efectoras. Estas características posiblemente se relacionen con algunas peculiaridades de los receptores estrogénicos que en el curso evolutivo han sido sometidos a variaciones cíclicas: diurnas, estrales, menstruales o aún más prolongadas.

De allí el carácter altamente regulatorio de los receptores estrogénicos que sirvió de base a los trabajos aquí presentados, y que

utilizamos como hipótesis para explorar la modulación de los receptores en diversas situaciones experimentales.

I. RESEÑA ANATOMICA Y FISIOLOGICA SOBRE LA UNIDAD HIPOTALAMO-HIPOFISARIA

1. Hipófisis. Datos anatomo-fisiológicos

La hipófisis es una glándula endocrina de origen ectodérmico, situada en la silla turca del esfenoides y separada del cráneo por una delgada membrana (diafragma hipofisario), la cual es atravesada por un tallo delgado (tallo hipofisario) que une la glándula con el hipotálamo. La hipófisis tiene un doble origen embriológico: el ectodermo general y el ectodermo neural. Esto origina dos partes principales completamente distintas: a) la adenohipófisis, de origen epitelial, que deriva de la bolsa de Rathke (evaginación del ectodermo de la región bucofaríngea primitiva) y b) la neurohipófisis, que proviene de una evaginación del piso del diencéfalo. La adenohipófisis está formada por la pars distalis, la pars intermedia y la pars tuberalis (que es una pequeña porción del lóbulo anterior que se extiende hacia arriba para adosarse en forma de collar al piso del diencéfalo). La neurohipófisis comprende el proceso infundibular y el tallo neural o infundíbulo. Éste, a su vez, se halla constituido por el tallo infundibular y la eminencia media, que cierra por su cara ventral al receso infundibular del tercer ventrículo. El tallo hipofisario está formado por el tallo neural junto con las porciones de la adenohipófisis que lo rodean (Figura 1-1).

El siguiente es un esquema de las principales divisiones:

Adenohipófisis {
1) Pars distalis
2) Pars tuberalis
3) Pars intermedia

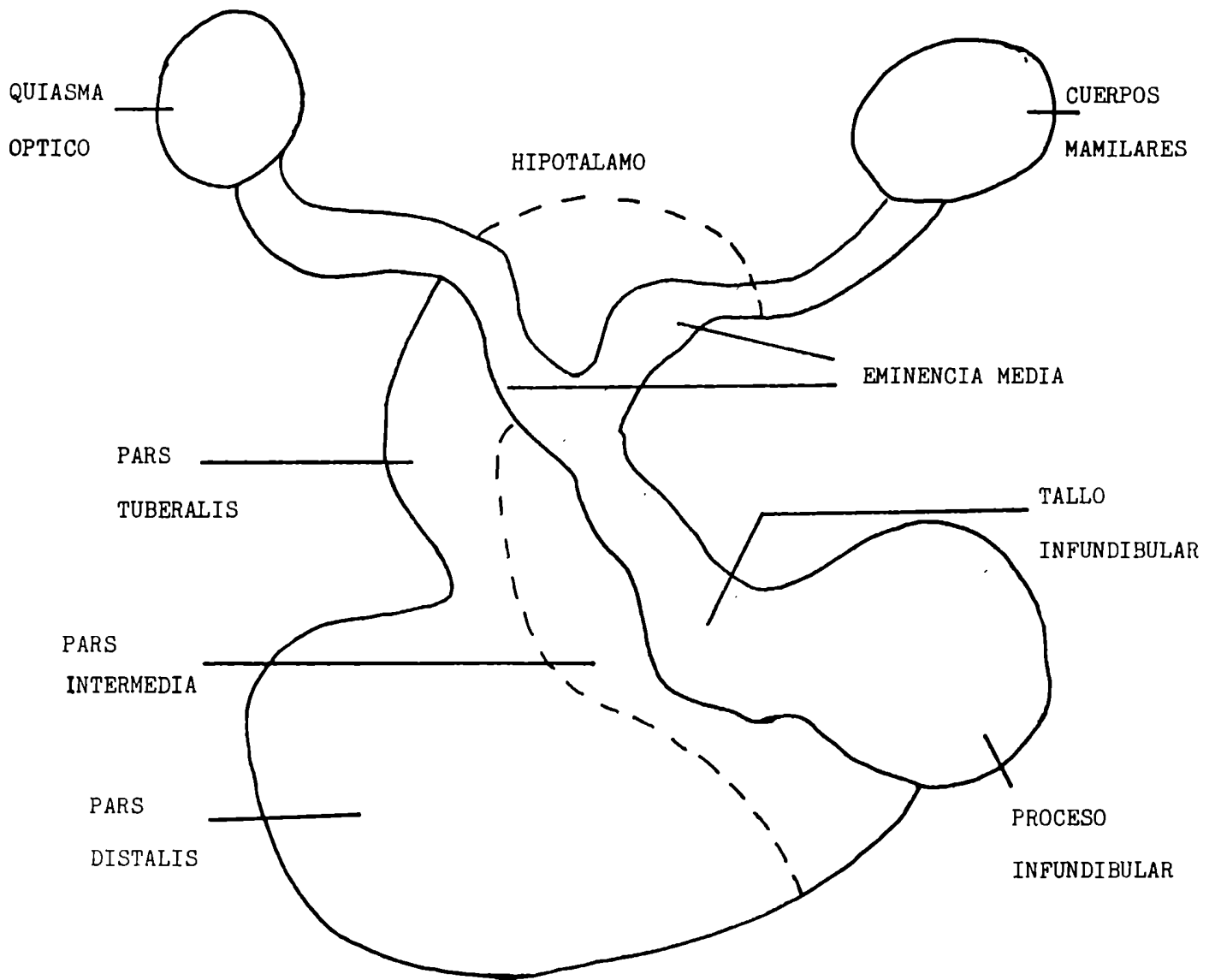
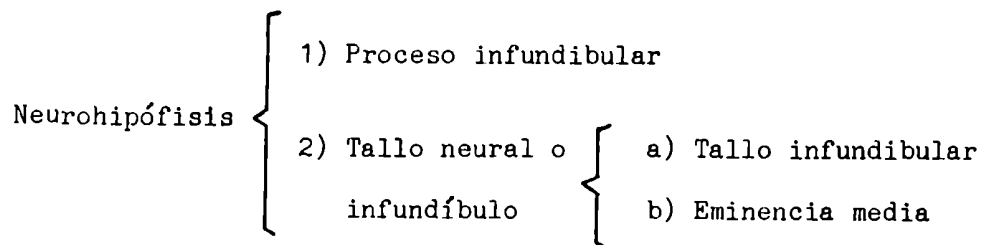


Figura 1-1: Esquema de las divisiones de la hipófisis. La adenohipófisis está formada por: la pars tuberalis, la pars intermedia y la pars distalis. La neurohipófisis comprende el proceso infundibular y el tallo neural o infundíbulo, formado a su vez por el tallo infundibular y la eminencia media. El tallo neural y la porción de adenohipófisis que lo rodea constituyen el tallo hipofisario (1).



La neurohipófisis se encuentra directamente conectada con el hipotálamo por medio de los axones nerviosos que vienen desde los núcleos supraóptico y paraventricular y corren a lo largo del tallo hipofisario. A través de estas vías se trasladan productos hormonales que segregan las neuronas (neurosecreción) para ser almacenados y liberados en la neurohipófisis.

a) Irrigación

La hipófisis recibe una rica irrigación sanguínea por una serie de arterias que nacen de la carótida interna (Figura 1-2). La neurohipófisis es irrigada directamente por medio de las arterias hipofisarias inferiores que se capilarizan en la glándula. En estos capilares terminan los axones del sistema supraóptico y paraventricular. La pars distalis y la pars intermedia reciben sangre de las arterias hipofisarias superiores, que se capilarizan a nivel de la eminencia media y constituyen el plexo capilar primario del sistema porta hipofisario. Estos capilares contactan con axones de neuronas del hipotálamo basal medio (área hipofisotropa y núcleo arcuato). De estos capilares se forman los vasos portales largos, que descienden a lo largo del tallo

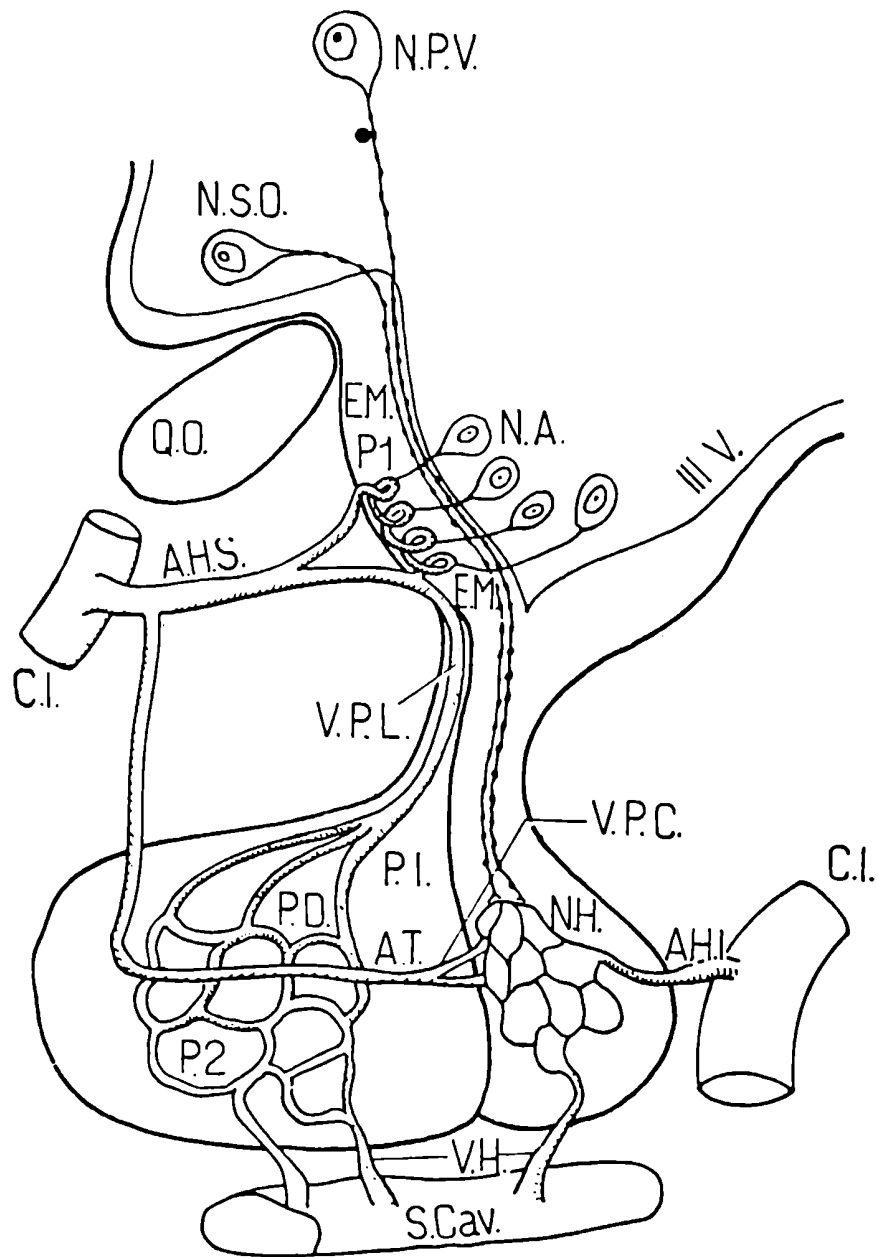


Figura 1-2: Irrigación de la hipófisis. Carótida interna (C.I.), arterias hipotalámicas superiores (A.H.S.), eminencia media (E.M.), plexo capilar primario del sistema porta hipofisario (P.1), núcleo arcuato (N.A.), vasos porta largos (V.P.L.), pars distalis (P.D.), pars intermedia (P.I.), plexo capilar secundario del sistema porta hipofisario (P.2), venas hipofisarias (V.H.), senos cavernosos (S.C.), arterias hipotalámicas inferiores (A.H.I.), núcleo supraóptico (N.S.O.), núcleo paraventricular (N.P.V.), arteria de la trabécula (A.T.), vasos porta cortos (V.P.C.), quiasma óptico (Q.O.), tercer ventrículo (III V.) (1).

hipofisario y se capilarizan en la pars distalis y pars intermedia formando un plexo capilar secundario del sistema porta hipofisario. De este sistema capilar y del sistema de la neurohipófisis salen las venas hipofisarias que drenan en los senos cavernosos. Los vasos portales cortos pasan de la neurohipófisis hacia la pars distalis donde terminan anastomosándose con los capilares adenohipofisarios.

b) Citofisiología de la hipófisis

Las células adenohipofisarias se pueden clasificar según diversos criterios: afinidad tincorial, inmunofluorescencia y microscopía electrónica. Actualmente se sustenta la idea que cada hormona se secreta por un tipo de célula especializada.

Las células se dividen en cromófilas o cromófobas, según tengan o no afinidad por los colorantes. Dentro de las cromófilas, aquellas que se tiñen con colorantes ácidos, acidófilas o eosinófilas, o con colorantes básicos, basófilas.

Las células acidófilas, que son las predominantes, segregan somatotrofina, contienen gránulos entre 300 y 400 μ de diámetro y aumentan durante el crecimiento. En la rata y en la vaca existen células parecidas, con menos gránulos y más grandes, entre 600 y 700 μ , encargadas de secretar prolactina. Estas células aumentan en número y tamaño durante el embarazo y lactancia. Las células basófilas con gránulos de 150 μ , se han relacionado con la secreción de tirotrófina, constituyen

el 2-4% de las células parenquimatosas de la adenohipófisis de la rata y aumentan en número y tamaño luego de la tiroidectomía. Otras basófilas con gránulos algo mayores, 200 mu, se relacionan con la secreción de gonadotrofinas: hormonas luteinizante y folículoestimulante. Las células luteinizantes aumentan de tamaño al finalizar la fase estrogénica y persisten en la progestacional; las foliculoestimulantes aumentan de tamaño en la primera fase del ciclo sexual. Las células corticotropas son probablemente basófilas, aunque en algunas situaciones patológicas la hormona podría ser segregada por células cromóforas; constituyen el 4% de la población total y aumentan durante el estrés crónico.

Las células de la pars tuberalis no se diferencian de aquellas de la pars distalis.

En la pars intermedia existen células productoras de hormona melanocitoestimulante (MSH) con gránulos secretorios pálidos. Estudios de Porte y col. (2) demostraron la presencia de células de corticotrofina en la pars intermedia de varias especies de mamíferos.

La neurohipófisis está constituida por neuroglía, fibras y células nerviosas. Las fibras amielínicas comunican la neurohipófisis con las neuronas de los núcleos hipotalámicos, supraóptico y paraventricular. Estos axones transportan las neurohormonas: vasopresina o antidiurética y oxitocina.

Las hormonas adenohipofisarias son sintetizadas en los ri-

bosomas del retículo endoplasmático rugoso, pasan por las cisternas del retículo y son transportadas al aparato de Golgi en vesículas pequeñas. En las cisternas de los sáculos aplanados del aparato de Golgi se condensan los productos secretorios, desde donde, los gránulos rodeados de membrana se mueven al citoplasma y se funden con otros para formar un gran gránulo maduro. Cuando se produce una liberación masiva de hormona, se libera el producto secretorio en el espacio perivascular, con mantenimiento de su estado de agregación, mientras que la membrana limitante queda formando parte de la membrana plasmática. Este proceso se denomina exocitosis.

Una vez terminado el período de gran actividad, la célula regula el exceso de hormona acumulada y de organelas. Esto se lleva a cabo por autofagia. En las células prolactínicas de rata se describió un mecanismo de regulación del cual participan los lisosomas. Se detectó la presencia de fosfatasa ácida y enzimas hidrolíticas contenidas en estos organoides, que contribuyen a la degradación de la hormona acumulada y de las organelas celulares superficiales (Figura 1-3) (3).

c) Hormonas hipofisarias. Función

Las hormonas hipofisarias clasificadas en adeno y neurohipofisarias son las siguientes:

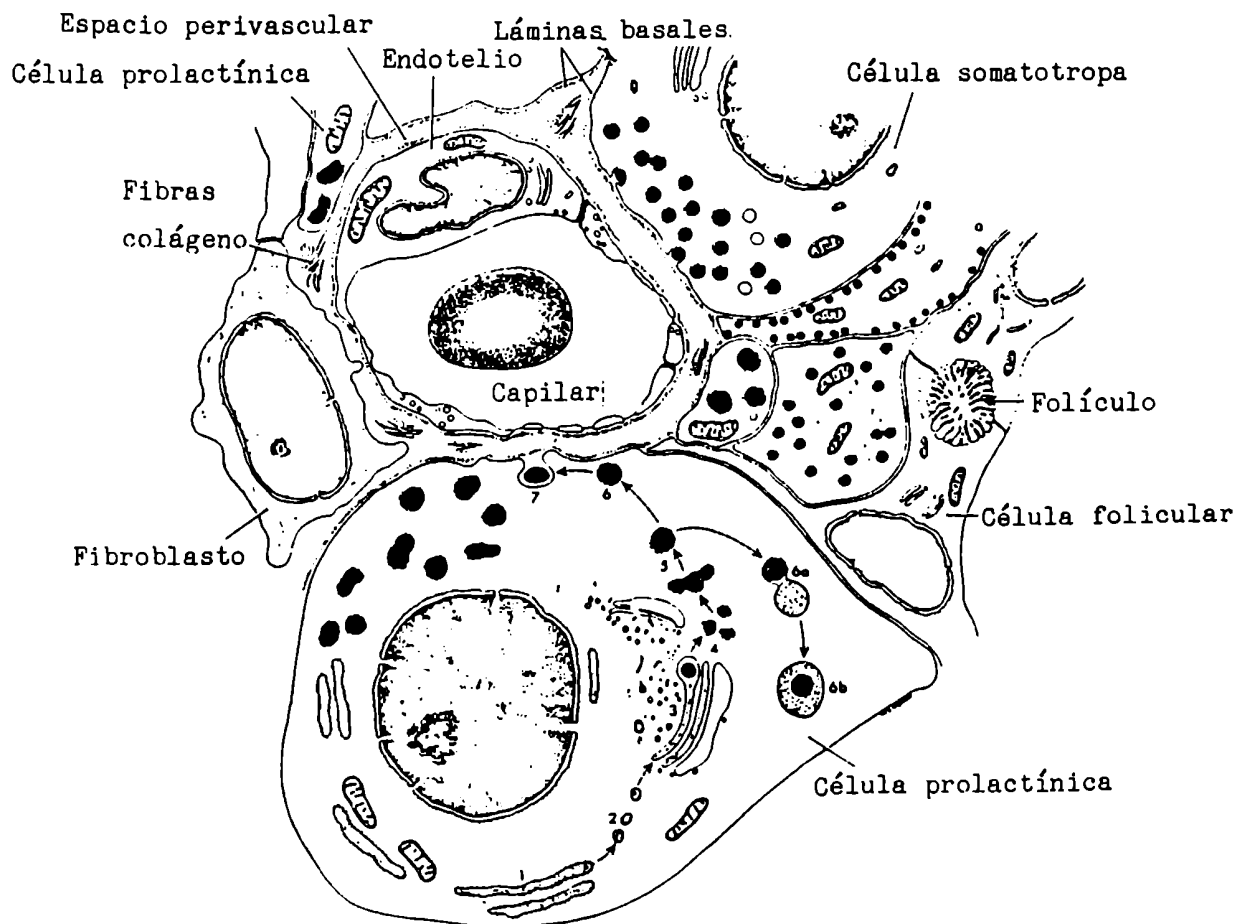


Figura 1-3: Diagrama que muestra la relación entre una célula secretoria y un capilar en hipófisis de ratona. El proceso secretorio se ilustra en una célula prolactínica: 1) deposición de los polipéptidos en las cisternas del retículo endoplasmático; 2) transporte de los polipéptidos en vesículas al aparato de Golgi; 3) condensación de los polipéptidos y formación de gránulos en los sáculos de Golgi; 4) liberación desde el aparato de Golgi de los gránulos rodeados por membranas; 5) coalescencia de los gránulos; 6) movimiento de gránulos hacia la periferia; 7) extrusión de los gránulos por exocitosis. 6a) y 6b) autofagia (4).

- A) Adenohipofisarias {
 - a) Corticotrofina (ACTH)
 - b) Gonadotrofinas {
 - b₁) Foliculoestimulante (FSH)
 - b₂) Luteinizante (LH)
 - c) Prolactina (PRL)
 - d) Somatotrofina (STH)
 - e) Tirotrofina (TSH)
 - f) Melanocitoestimulante (MSH)

- B) Neurohipofisarias {
 - a) Vasopresina
 - b) Oxitocina

a) Corticotrofina: Es un polipéptido de cadena lineal con un peso molecular de 4 500 conteniendo 39 aminoácidos. Actúa estimulando la fracción glucocorticoide y androgénica de la corteza suprarrenal e incrementando la síntesis de proteínas totales, o sea que la ACTH produce un efecto trópico sobre la producción de esteroides y trófico sobre el tejido adrenal.

b) Gonadotrofinas: Producen la maduración de los testiculos infantiles, impulsando tanto la espermatogénesis como la migración testicular y en la mujer influyen sobre la función y maduración del ovario. Ambas son glucoproteínas con pesos moleculares aproximados de 30 000 (FSH) y 40 000 (LH), que varían según las especies. La FSH estimula en la mujer la ovulación y la maduración folicular y en el varón la espermatogénesis. La LH desarrolla el cuerpo lúteo y en el hombre la producción de testos-

terona por el testículo, la cual a su vez mantiene la espermatogénesis y activa el desarrollo de los órganos sexuales accesorios, tales como el conducto deferente, próstata y vesículas seminales.

c) Prolactina: Es una proteína de peso molecular 23 000 y de gran variedad de funciones. Una de las principales acciones fisiológicas consiste en estimular la producción láctea. Su secreción se estimula por un reflejo neurohormonal a partir de la succión del pezón mamario.

d) Somatotrofina: Es un polipéptido de 190 aminoácidos y peso molecular 21 500. Tiene marcados efectos anabólicos y sobre el crecimiento óseo y en consecuencia determina el incremento sobre el crecimiento total. Estimula la síntesis global de proteínas lo cual da como resultado una retención nitrogenada. Retiene además potasio, sodio, cloro y fósforo. Es ligeramente lipolítica y tiene efectos diabetógenos.

e) Tirotrófina: Es una glucoproteína con un peso molecular aproximado de 28 000. Estimula el crecimiento de la tiroides favoreciendo una mayor absorción de yodo y la síntesis de las hormonas tiroideas.

f) Melanocitoestimulante: Es un péptido de estructura similar al ACTH. Según su estructura química se distinguen dos tipos de hormona: α -MSH con una secuencia idéntica al ACTH en sus primeros trece aminoácidos y la β -MSH. Es estimulante de la pigmentación cutánea melanógena.

La vasopresina y la oxitocina son octapéptidos con un peso molecular aproximado de 1 200. La vasopresina u hormona antidiurética

reduce la secreción urinaria por reabsorción acuosa a nivel de los túbulos renales. En dosis farmacológicas eleva la tensión arterial por su efecto constrictor sobre los vasos sanguíneos perisféricos.

La oxitocina provoca la contracción del útero y la expulsión de la leche por contracción de las células mioepiteliales de los acinos de la glándula mamaria.

2. RESEÑA ANATOMICA DEL HIPOTALAMO

El hipotálamo es la región ventral del diencéfalo que rodea a la cavidad del tercer ventrículo, en estrecha relación con la hipófisis. Su origen es diencefálico casi en su totalidad. Comprende la zona gris que rodea a las paredes del tercer ventrículo en su porción más ventral, por debajo del surco hipotalámico, que es una hendidura horizontal situada en la superficie del tercer ventrículo y que constituye el límite dorsal. El límite anterior está dado por un plano frontal que pasa por delante del quiasma óptico y el posterior por un plano vertical que pasa inmediatamente por detrás de los cuerpos mamilares. Lateralmente está limitado por un plano imaginario anteroposterior que pasa por fuera de los pilares anteriores del fornix. Ventralmente está delimitado por una delgada pared en forma de embudo (infundibulum) que se prolonga hacia abajo en el tallo hipofisario y en el proceso infundibular de la neurohipófisis. Entre el infundíbulo y el tallo pituitario existe una pequeña prominencia: la eminencia media del tuber cinereum.

Esta zona de tejido nervioso está constituida por una zona dorsal, subependimaria o interna que contiene los axones amielínicos neurosecretorios del sistema supraóptico-paraventriculo-neurohipofisario y una zona externa o fibrosa que contacta con los capilares primarios del sistema porta-hipofisario.

Las neuronas hipotalámicas que forman agrupaciones celulares bien caracterizadas reciben el nombre de núcleos mientras que los sectores con una clara delimitación citoarquitectónica se denominan áreas.

Según Le Gros Clark (5 , 6) se puede dividir el hipotálamo en tres regiones frontales en las cuales se incluyen los núcleos y áreas hipotalámicas. Estas son: la zona preóptica, la zona tuberalis y la zona mamilaris. La región preóptica incluye: las áreas preóptica e hipotalámica anterior con pequeñas neuronas de escaso material basófilo y gran cantidad de vesículas visibles al microscopio electrónico: el núcleo supraóptico que cabalgando sobre el extremo lateral del quiasma se extiende anteroposteriormente y está compuesto por grandes neuronas con material Gomori positivo. Los axones que se originan en estas células atraviesan la zona interna de la eminencia media y terminan en la neurohipófisis (haz supraóptico-neurohipofisario). El núcleo paraventricular se halla en posición dorsal y posterior con respecto al supraóptico; las fibras amielínicas que se originan en este núcleo (haz paraventriculo-neurohipofisario) se dirigen también a la eminencia media. El núcleo supraquiasmático está constituido por neuronas con citoplas-

ma claro que se extiende lateralmente al extremo ventral del tercer ventrículo. Éste se encuentra rodeado por un conjunto de pequeñas neuronas que constituyen el núcleo parvocelular periventricular (Figura 1-4).

En la región tuberal hipotalámica se encuentran las áreas hipotalámicas lateral y dorsal, con neuronas medianas. Por fuera de la capa endimaria del tercer ventrículo se sitúan los núcleos dorsomediano y ventromediano. El núcleo arcuato contiene neuronas, ricas en catecolaminas, a ambos lados del extremo ventral del tercer ventrículo a nivel del infundíbulo (7); éstas envían fibras que terminan en la eminencia media en contacto con los capilares primarios del sistema porta-hipofisario.

En la región hipotalámica mamilar se destaca el área supra-mamilar y el complejo mamilar con una porción lateral de células pequeñas dispuestas en forma compacta y una medial de neuronas grandes y medianas. Las restantes agrupaciones mamilares están constituidas por neuronas medianas y pequeñas.

a) Hormonas hipotalámicas

Las neuronas hipotalámicas encargadas de regular la adenohipófisis sintetizan una serie de sustancias con función hormonal, más conocidas como factores liberadores e inhibidores. Cada hormona anterohipofisaria tendría una o más hormona hipotalámica que la regula. Actualmente se utiliza el nombre de hormona para aquellas sustancias hipotalá-

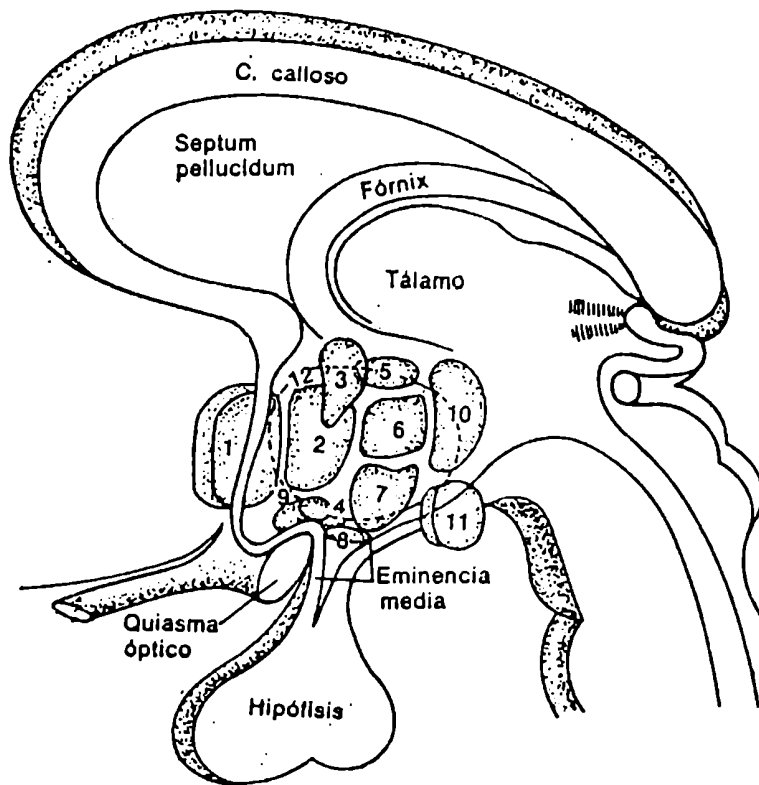


Figura 1-4: Áreas y núcleos hipotalámicos: 1) área preóptica (medial y lateral); 2) área hipotalámica anterior; 3) núcleo paraventricular; 4) núcleo supraóptico; 5) área hipotalámica dorsal; 6) núcleo dorsomediano; 7) núcleo ventromediano; 8) núcleo arcuato; 9) núcleo supraquiasmático; 10) área hipotalámica posterior; 11) cuerpos mamilares; 12) área hipotalámica lateral (1).

micas cuya estructura se conoce y que ha sido demostrada como el regulador fisiológico de la correspondiente hormona anterohipofisaria; en cambio se mantiene el término factor para otros reguladores hipotalámicos cuya estructura no ha sido determinada y en consecuencia su actividad fisiológica no puede relacionarse con una estructura específica. Se recomienda llamarlos con un prefijo que indica la hormona hipofisaria a la que regula y un sufijo que indica el efecto liberador (liberina) o inhibidor (estatina). Actualmente se conoce la composición química de somatostatina (GH-RIH), luteoliberina (LHRH), tiroliberina (TRH) y prolactostatina (PIF). Con respecto al PIF muchos aceptan a la dopamina, aunque otros autores creen que la dopamina actúa estimulando la secreción de otro factor inhibidor (107).

Entre los factores que aún se desconoce su estructura figuran: factor liberador de corticotrofina (CRF), factor liberador de la hormona de crecimiento (GH-RF), factor liberador de prolactina (PRF), factor inhibidor de la liberación de la hormona estimulante del melanocito (MIF) y factor liberador de la hormona estimulante del melanocito (MRF) (8).

Según la teoría postulada por Harris (9), las fibras nerviosas hipotalámicas liberan sustancias hormonales en los capilares del plexo capilar primario del sistema vascular porta-hipofisario, en la eminencia media. Estas sustancias serían transportadas a través de los vasos porta largos a los sinusoides de la glándula pituitaria donde regularían la secreción o inhibición de las distintas hormonas.

Estas hormonas podrían sintetizarse también en regiones extrahipotalámicas para ser vertidas al líquido cefalorraquídeo. Esta es la teoría postulada por Knigge (10). Desde allí serían captados por los tanicitos, células ependimarias especializadas, que debido a una bipolaridad funcional, la liberarían hacia el plexo capilar primario.

II. HORMONAS Y RECEPTORES

Las hormonas esteroides son moléculas pequeñas y con actividad biológica muy específica. Incluyen los estrógenos, progestágenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides. Estas moléculas ejercen su efecto sobre las células blanco actuando principalmente a nivel de la transcripción genética (11 , 12) y su efecto se manifiesta a través de cambios a nivel metabólico, morfológico y de conducta. Discutiremos a continuación algunos conceptos, enfatizando la relación de los mismos con los estrógenos.

1. Concepto de receptor y tejido blanco

Definiéndolo de una manera simple, el receptor (R) es una proteína citoplasmática especial que puede unir selectivamente una determinada hormona, llevar a su acumulación en el tejido blanco y como consecuencia de esa unión, iniciar una serie de procesos a nivel celular que finalmente determinan una respuesta fisiológica. Jensen fue el primero en sintetizar un esteroide altamente radioactivo y probar la existencia de un receptor en el útero utilizando (³H)-E₂ (13). A partir de estos trabajos se originaron una serie de estudios que demostraron que a nivel del sistema reproductivo, el útero, la vagina y las mamas eran órganos blanco para los estrógenos, como así también regiones del

sistema nervioso central que regulan la secreción de hormonas hipofisarias e influyen sobre la conducta sexual, y la hipófisis. Sin embargo con determinaciones más sensibles se describieron receptores para estrógenos en hígado (14), riñón (15), adrenal (16 , 17) y ovario (18).

2. Dinámica del receptor hormonal

El modelo aceptado del modo de acción de los esteroides en las células blanco podría resumirse en la Figura 1-5. La hormona entra a la célula, según la mayoría de los autores, por simple difusión. Después que la hormona se unió al receptor, éstos sufren un cambio enzimático o conformacional antes de entrar al núcleo. Este proceso denominado "transformación" implica la conversión del complejo receptor-hormona citoplasmático en una forma con alta afinidad por el núcleo y capacidad para la inducción de respuesta biológica. Este concepto se basa en observaciones realizadas "in vitro" en las cuales se vio que el receptor nativo en preparaciones crudas de citosol era incapaz de unirse al núcleo o al ácido desoxirribonucleico (ADN) a menos que fuera calentado o manipulado de otra manera. Durante la "transformación" se producen cambios que dependen de la hormona, la temperatura, sal o dilución y producen variaciones en el peso molecular, estructura cuaternaria o en las propiedades de sedimentación; a veces los cambios son más sutiles y la única consecuencia visible es la capacidad para unirse al ADN. Con respecto al receptor estrogénico, Jensen y colaboradores (19 , 20 , 21) al incubar ci-

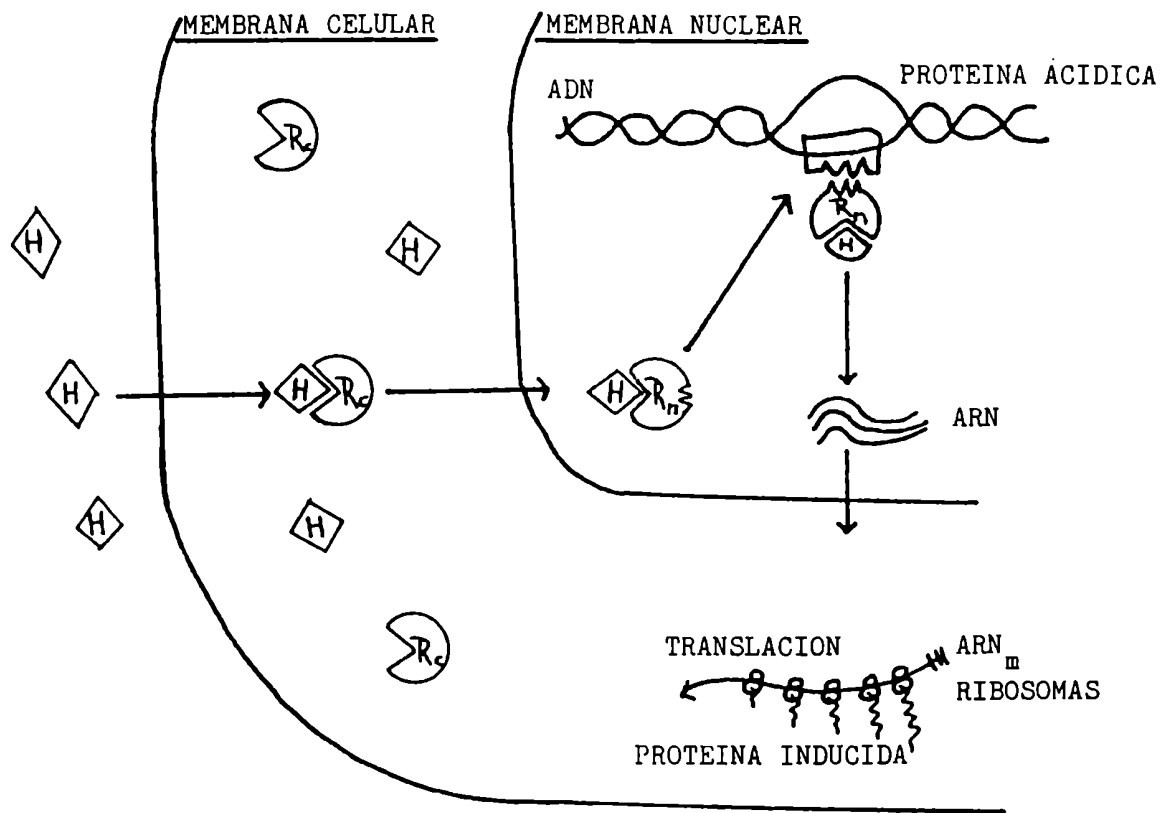


Figura 1-5: Modelo general de la acción de las hormonas esteroideas que muestra la unión de la hormona (H) al receptor citoplasmático (R_c), la translocación al núcleo y la inducción de la transcripción genética por el receptor nuclear (R_n) para producir ARN mensajero (ARN_m) que es trasladado a los ribosomas citoplasmáticos para sintetizar una proteína inducida.

tosol uterino de rata con (^3H)- E_2 a 4°C obtenían un complejo hormona-receptor de 8S y que no se unía al núcleo. Cuando se aumentaba la fuerza iónica (0.4 M KCl) se convertía el complejo 8S a 4S y éste era un paso reversible. El complejo 4S no se unía al núcleo a menos que se calentara brevemente a 37°C y en este caso se transformaba en un complejo que sedimentaba en 5S. Este paso requería que la hormona estuviera unida al receptor, mientras que esto no era necesario en la transformación del 8S al 4S (21). La forma 5S mostraba alta afinidad por los núcleos uterinos y era capaz de incrementar la actividad de la ARN polimerasa (22).

Son muy variados los procedimientos que llevan a la transformación de los receptores y esto lleva a pensar que no es un único mecanismo sino que existe una amplia variedad de formas, algunas de las cuales serían: a) Asociación o disociación de subunidades. Esto sería obvio para aquellos receptores que sufren un corrimiento de su coeficiente de sedimentación durante la transformación. Según Notides (23) habría una dimerización o asociación del receptor, inducida por estrógenos, con una proteína distinta y éste transformaría el complejo inicial 4S (PM^{u} 75 000) en otro 5S (PM^{u} 140 000); esta proteína tiene habilidad para unirse al ADN o bien confiere esta habilidad al receptor de 75 000 y podría ser equivalente a la "proteína activadora del receptor estrogénico" identificada por Thampan y Clark (24). b) Cambios conformacionales. Existen receptores que aparentemente no sufren cambios en el estado de agregación. El calor, la sal y la dilución inducirían cambios conformacio-

nales cuyo efecto sería exponer cargas positivas adicionales en la molécula, lo cual aumentaría la afinidad por el ADN, fosfocelulosa y otros polianiones (25). c) Adición o remoción de un factor citosólico. Podría ser que la pérdida de algún factor fuera la causa de las transformaciones debidas a simple dilución o diálisis. Existen evidencias de una molécula inhibitoria de la transformación del receptor estrogénico y sería una molécula de bajo peso molecular, ya que es dializable y se describió en citosol de útero de rata (26).

No se sabe con seguridad si la transformación ocurre "in vivo" en el citoplasma o en el núcleo celular. Mientras que la transformación del R por temperatura ocurre "in vitro" en el citoplasma, Yamamoto (27) reportó que la conversión de 4S en 5S ocurre más rápidamente en presencia de ADN. La porción del receptor que une al esteroide es distinguible de la porción que se une al material nuclear. Una proteólisis suave del receptor citoplasmático para una variedad de esteroides genera un fragmento pequeño de receptor ($\approx 2-4 \times 10^4$) llamado el mero-receptor, que retiene la facultad de ligar el esteroide pero pierde la capacidad de unirse al núcleo (28).

Más información sobre la relación de las formas nucleares y citoplasmática del R estrogénico proviene de los estudios inmunológicos de Jensen (29) que produjo anticuerpos a la forma nuclear del complejo receptor-estradiol de útero de ternero, que también reaccionaba con el complejo extranuclear y también con R estrogénico de tejidos reproducti-

vos y tumores de cada especie estudiada, incluidos tejidos de no mamíferos.

Una vez que el complejo hormona-receptor ha sido transformado entra al núcleo en un proceso llamado "translocación". Este esquema se basa en el modelo de "dos pasos" el cual postula que el receptor no unido sólo se encuentra en el citoplasma, aunque este concepto está actualmente en discusión (30 ,31). Una vez en el núcleo, el complejo hormona-receptor se une a sitios específicos de la cromatina celular de las células blanco, llamados "sitios aceptores" (32 ,33). Probablemente estos sitios se encuentren cerca de secuencias de ADN cuya transcripción va a ser inducida por la hormona. Un punto interesante de dilucidar una vez que el complejo se une en el núcleo, es la relación que existe entre esta unión y la inducción de la respuesta. La estimulación de la oxidación de la glucosa por estrógeno es máxima con niveles muy bajos de ocupación del receptor nuclear (34); en cambio existe una relación lineal entre la inducción de una proteína específica inducida por estradiol (IP) y la relativa saturación de los receptores (35) cuando se analiza el efecto de estrógenos de diferente potencia biológica y concentraciones distintas de estradiol tanto "in vivo" como "in vitro".

Si bien los receptores por célula se calcularon en aproximadamente 15 000-20 000, no se sabe si todos son necesarios para la respuesta hormonal (36). Aparentemente habría una relación lineal entre la unión del receptor y la magnitud de la inducción de la respuesta bio-

lógica temprana, aunque la producción de respuestas más tardías no necesitaría la ocupación de todos ellos. Dosis bajas de estradiol, que resultan en la ocupación del receptor nuclear del 20% y el mantenimiento de estos niveles de receptor por cierto período crítico de tiempo, son capaces de producir una respuesta máxima del crecimiento uterino, aunque no la estimulación máxima de respuestas más tempranas (37). Más aún, sin importar el número inicial de complejos estrógeno-receptor que translocan al núcleo por diferentes dosis de estradiol, sólo 2 000-3 000 permanecen en el núcleo por más de 6 horas.

Una vez que se produjo el efecto de la inducción genética, no se conoce el destino del receptor. Si efectivamente, la presencia de la hormona es necesaria para la unión y retención del receptor en el núcleo (19 ,38 - 41), una manera simple de terminar el mecanismo sería la pérdida del ligando y la migración pasiva del receptor no unido de vuelta al citoplasma. Después de una inyección de estrógeno que produce la disminución del receptor citosólico uterino, aproximadamente un 40% del receptor reaparece en el citoplasma a pesar de agregarse inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas (42 ,43 ,44), lo cual implica que se trata de un reciclaje del receptor desde el núcleo. El 60% restante se presume que es nuevamente sintetizado. En pituitaria anterior e hipotálamo, dos órganos blanco para estrógenos, se describió una regulación similar para el receptor citoplasmático en relación a la dependencia de la síntesis proteica (45). Existe la posibilidad que el receptor sea

degradado en el núcleo, ya que se ha descrito (46) la existencia de una proteasa muy abundante en núcleos de oviductos y con un fuerte K_m por el receptor de progesterona. La ruptura del receptor por esta enzima "in vitro" lleva a fragmentos proteolíticos que ya no se unen al ADN (47), podría especularse entonces, que la enzima puede funcionar en el núcleo para liberar el receptor del material genético y degradarlo.

3. Receptores neurales e hipofisarios para el estradiol

Los receptores neurales e hipofisarios para el estradiol tienen características similares a los receptores perisféricos y al igual que ellos actúan regulando la actividad genómica.

Con respecto al receptor estrogénico existe una diferencia importante entre los receptores nerviosos e hipofisarios y los uterinos. En útero se describieron dos clases de sitios de unión tanto en el citoplasma como en núcleo. El sitio I tiene las características del clásico receptor estrogénico citosólico, con un $K_d = 0.8$ nM y una concentración aproximada de 0.6 pmol/útero y se transloca al núcleo después de una inyección de estradiol. El receptor tipo II tiene menor afinidad por el estradiol ($K_d \approx 30$ nM) y están presentes en mayor concentración que el tipo I (2.0 pmol/útero) (48), aunque esta sugerencia está en revisión (49). Estos receptores tipo II, no disminuyen después de una inyección de estradiol y podrían servir para concentrar estrógenos en las

células blanco.

Con respecto al núcleo, el receptor tipo I aumenta después de una inyección de estrógeno y acompaña la disminución del receptor citosólico. El receptor tipo II nuclear se detecta en los núcleos después de exponer tejido tumoral uterino o mamario a estrógenos "in vivo" y se detectaron por intercambio nuclear usando altas concentraciones de (³H)-estradiol (50). En cambio con respecto al receptor de sistema nervioso central e hipófisis, se ha descrito un único tipo citosólico que aparece como 8S en buffer de baja fuerza iónica y 4S en buffer de alta fuerza iónica y transloca al núcleo, de donde se extrae como 5S, después de una inyección de estradiol.

El sistema del receptor estrogénico en la pituitaria y el cerebro de rata es funcionalmente heterogéneo. Esto se comprueba por los siguientes datos: a) El estradiol induce el receptor progestacional en pituitaria y en menor medida en área preóptica e hipotálamo, pero no en amígdala. Cabe mencionar sin embargo, que el receptor progestacional no está presente exclusivamente en células que contienen receptores estrogénicos, ya que existe en corteza, una zona relativamente pobre en células estrofilicas. b) El estradiol afecta la actividad de diversas enzimas de tejido nervioso (MAO, tirosin-hidroxilasa, etc.) pero en ninguna de las regiones estudiadas afecta a todas ellas. c) Sólo existe aromatización de testosterona en el tejido nervioso, con niveles mayores en amígdala y menores en área preóptica e hipotálamo, y

más aún: la actividad de aromatasa no tiene una distribución uniforme en estas áreas. La pituitaria no es capaz de aromatizar testosterona; cuando se inyecta (^3H)-testosterona se puede recobrar (^3H)-estradiol en núcleos purificados de células de área preóptica, hipotálamo y amígdala, pero no de pituitaria (51). d) De algún modo la acción del estradiol en la pituitaria está asociada con una variedad de funciones celulares específicas más que con funciones comunes a todas esas células (52).

La ontogenia de los receptores hormonales en cerebro e hipófisis es muy importante ya que su presencia implica la aparición de la sensibilidad en estas zonas a los esteroides sexuales. Una de las consecuencias es la diferenciación sexual en el cerebro durante un primer período crítico muy temprano y que va a definir el futuro comportamiento sexual del adulto. En la rata, los receptores estrogénicos son ya detectados unos días antes del nacimiento (53-55) y aumentan rápidamente durante la primera semana de vida, adquiriendo una distribución similar al animal adulto en área preóptica, hipotálamo y amígdala. La mayor diferencia reside en la presencia de receptores estrogénicos en la corteza cerebral del recién nacido (53 , 56 , 57), que desaparecen entre la segunda y tercer semana de vida y están prácticamente ausentes en el animal adulto. Su función no está totalmente aclarada aunque seguramente no están involucrados en la respuesta al estrógeno derivado de testosterona, ya que la corteza cerebral no posee enzimas aromatizantes (52).

En la hipófisis anterior, todas las células se marcan después de una inyección de (^3H)- E_2 , aunque los índices de marcación revelan que las células que más concentran la hormona en animales castrados son las gonadotropas y lactotropas. Hasta 3 horas después de la inyección de (^3H)- E_2 , cerca del 100% de las células gonadotropas y lactotropas están marcadas y esta cifra disminuye a un 60-70% llegando a las 7 horas. Es importante destacar que si existen cambios en el medio hormonal, éstos pueden modular selectivamente la capacidad de captar (^3H)- E_2 de cierto tipo de células hipofisarias (58).

4. Mecanismos alternativos de acción estrogénica

Hasta ahora hemos discutido el concepto y la dinámica del receptor hormonal basándonos en un dogma mantenido a partir de los primeros estudios que se realizaron sobre receptores estrogénicos en citosol uterino: el receptor es una proteína citoplasmática, que unida a la hormona translocan al núcleo donde ejercen su acción. Estos conceptos originaron el llamado modelo de "los dos pasos". Sin embargo debe mencionarse que este concepto se encuentra actualmente en revisión.

Si bien habían aparecido algunos trabajos que sugerían alternativas del modelo clásico (59 -62), fueron los estudios de King (63) y Welshons (64) los que atrajeron nuevamente la atención sobre la localización intracelular de los receptores. King utilizó anticuerpos monoclonales

contra el receptor estrogénico de cultivos celulares y del tracto reproductivo y observó inmunoreactividad sólo en el núcleo, aunque no excluyó la existencia del receptor en el citoplasma. El segundo trabajo de Gorski y col. (64) utilizó una metodología muy diferente, reforzando de ese modo la teoría propuesta. Este grupo preparó células enucleadas a partir de células de un tumor hipofisario, tratándolas con citochalasin y observó que los receptores disminuían en los citoplasmas enucleados con respecto a la célula entera y que los receptores se recobraban en la fracción nuclear.

Se pueden plantear entonces varias posibilidades que se describen en la Figura 1-6. La primera opción incluye al modelo clásico de acción de hormonas esteroides en el cual el receptor en ausencia del ligando se encuentra en el citoplasma y en presencia del ligando forma un complejo hormona-receptor que transloca al núcleo. La segunda opción implica la presencia de receptores libres en el núcleo en ausencia del ligando. En este caso se presenta la posibilidad que coexistan el receptor libre nuclear junto al receptor citoplasmático vacío (A), como se demuestra en el Capítulo VI, o bien que la localización sea sólo nuclear (B)..

Queda entonces por dilucidar esta nueva alternativa, aunque el significado primario de la idea del modelo de "los dos pasos" se mantiene: los complejos hormona-receptor son elementos que regulan la actividad genómica sin importar donde ellos se originen.

Modelo clásico de la acción
de hormonas esteroides

Receptores libres nucleares
(sin ligando)

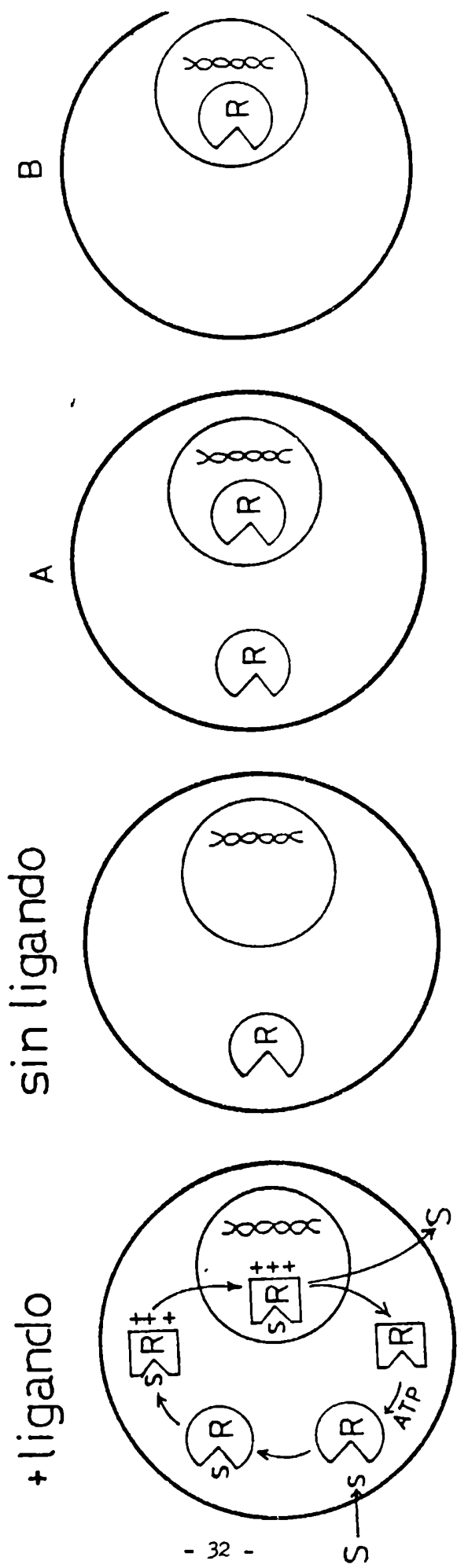


Figura 1-6: El modelo clásico de la acción de las hormonas esteroides implica la presencia del receptor (R) en el citoplasma en ausencia del ligando y su translocación al núcleo luego de unirse al esteroide (S). El segundo modelo implica la presencia del R en el núcleo en ausencia de hormona, con la posibilidad que coexista con el receptor citoplasmático (A) o no (B).

III. ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS ESTROGENOS

El 17- β -estradiol es un esteroide secretado por los ovarios y actúa principalmente sobre tejidos asociados a funciones sexuales tales como útero, mama y vagina. Este esteroide, sin embargo, está fuertemente involucrado en los mecanismos de retroalimentación del eje hipotálamo-hipofiso-ovárico y estimula el comportamiento sexual actuando sobre células nerviosas en el cerebro. A partir del uso de las técnicas de autorradiografía se ha podido identificar las zonas de mayor concentración de estrógeno en el cerebro de ratas adultas: el área preóptica, el hipotálamo y la amígdala junto a otra glándula muy relacionada con las estructuras nerviosas anteriormente citadas: la pituitaria. El 85% de las células de la pituitaria se marcan después de una inyección de (^3H)- E_2 y cada núcleo celular aislado contiene un promedio de 12 000 moléculas de (^3H)- E_2 , una capacidad similar a la célula uterina. En los tejidos nerviosos, en cambio, sólo el 50% de las células contiene receptores estrogénicos, y cada núcleo celular contiene entre 3 000 y 5 000 moléculas de (^3H)- E_2 (52).

El E_2 , como ya se comentó, está íntimamente relacionado con el funcionamiento del eje hipotálamo-hipofiso-ovárico. Una de las características de este eje es la ciclicidad con que ocurren los cambios en los distintos elementos que están involucrados en él, como variaciones hipotalámicas de la síntesis y liberación de LHRH, que produce una liberación cíclica de gonadotrofinas, ovulación y producción de

estrógenos y progesterona a nivel del ovario. Esta secuencia constituye el ciclo estral normal de las ratas, que lleva a las hembras a exhibir comportamiento sexual cada 4 días, en el atardecer que precede a la ovulación (Figura 1-7).

A través de los estudios realizados por Barraclough (65) en la rata se explican estos mecanismos en base a la existencia de centros hipotalámicos ubicados en las áreas anteriores de la estructura nerviosa, que se desarrollan únicamente en la hembra y tienen la capacidad de activar en forma cíclica a la adenohipófisis, la que segrega sus gonadotropinas con una secuencia característica de tiempo en cada especie. Esta descarga gonadotrófica cíclica produce la estimulación ovárica que se ve traducida por secreción de esteroides y ovulación.

Una de las características del centro cíclico es la de responder a los estrógenos con una descarga de LHRH y por lo tanto de gonadotropina, produciendo un mecanismo de retroalimentación positiva. Este mecanismo característico de la hembra, es el responsable de la ovulación y la conservación de los ciclos. Si este mecanismo de retroalimentación positivo se ve afectado ya sea por factores de origen nervioso (alteración de la concentración de neurotransmisores, influencias de otras estructuras nerviosas en la sensibilidad del centro cíclico), hormonales (modificación de los niveles circulantes de esteroides) o de otro tipo, entonces afectan directamente la ovulación y los ciclos sexuales (66). El estradiol facilita la secuencia de eventos elevando la sensi-

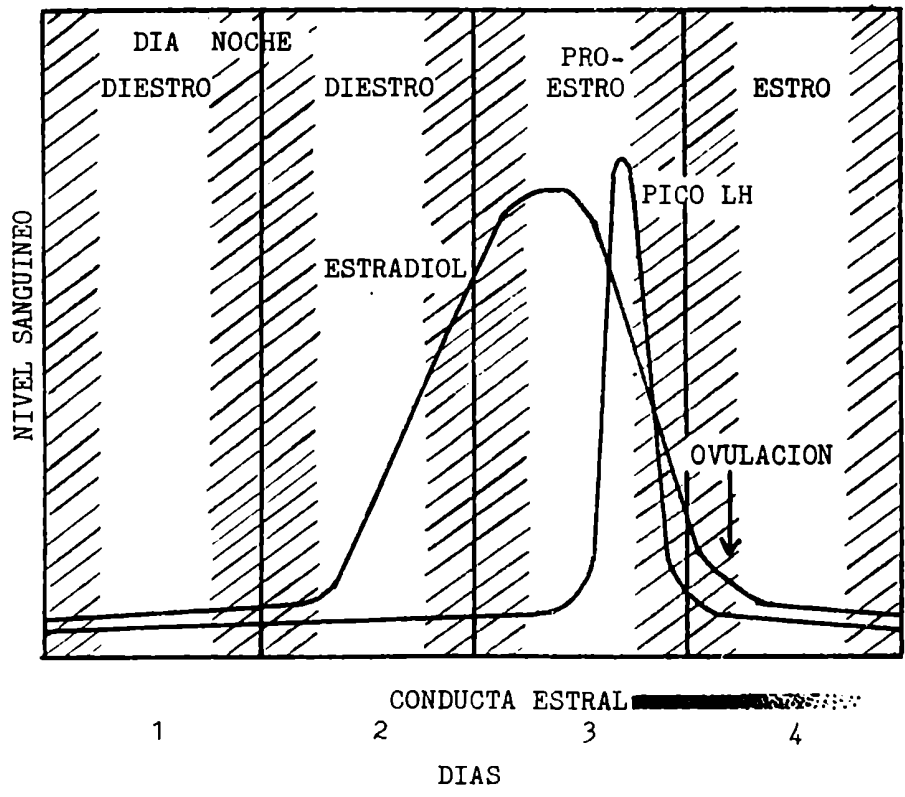


Figura 1-7: Ciclo estral normal de la rata que lleva a las hembras a exhibir estro o conducta sexual cada 4 días. Dos días después del comportamiento estral, en el día 2 del diestro, comienza a elevarse el nivel sanguíneo de estrógeno, alcanzando un pico en el proestro. El aumento del estrógeno provoca un pico en el nivel sanguíneo de LH en la tarde del proestro, produciendo la ovulación en la madrugada del día 4, estro (52).

bilidad de las células de la pituitaria al estímulo del LHRH.

En el ciclo normal de una rata, la pituitaria secreta grandes cantidades de LH en la tarde del proestro, aproximadamente 30 horas después del aumento inicial de E_2 secretado por los ovarios. El pico de LH provoca la ovulación aproximadamente 12 horas más tarde (Figura 1-7). Si se remueven los ovarios antes del aumento de E_2 , no aparece el pico de LH, pero la inyección de E_2 exógeno, revierte el efecto de la ovariectomía (52).

Como comentamos anteriormente, las hembras exhiben comportamiento sexual cada 4 días, en el atardecer que precede a la ovulación, aproximadamente 30 horas después del aumento de la secreción de E_2 por los ovarios. Si se ovariectomiza una rata unos días antes de probar su conducta sexual, entonces ésta se anula y la hembra responde al macho ya sea escapándole o presentándole pelea. Si en cambio, se inyecta E_2 exógeno a la rata ovariectomizada, los estímulos sensoriales llevan a la hembra a la lordosis. Esta es la postura de apareamiento y en ella tanto las nalgas como la cabeza de la hembra se elevan y se mantienen rígidas provocando la concavidad del lomo. El sistema efector en el cerebro para la lordosis es un circuito de neuronas que conecta las vías aferentes sensoriales de los flancos, el lomo y la pelvis con músculos en el lomo y los miembros. La información sensorial que se recibe sube a lo largo de la médula espinal y entra a la red de las neuronas sensibles al estradiol en el cerebro, el cual actúa como un mecanismo de conexión que envía de

vuelta una corriente de información a otro grupo de neuronas en la médula espinal, provocando la contracción muscular (Figura 1-8) (52).

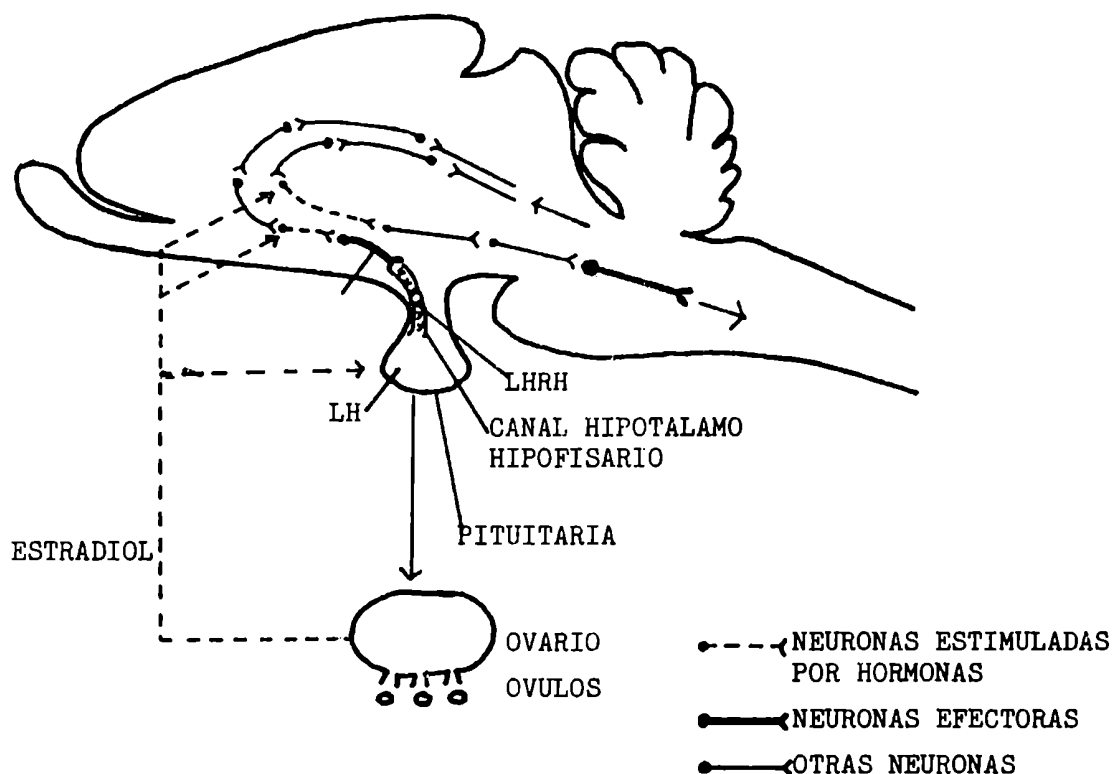


Figura 1-8: Esquema para describir el rol de las señales químicas y nerviosas en la regulación de la producción de E_2 y la lordosis, una forma de conducta sexual. En la base del cerebro, un grupo de células nerviosas, los efectores neuroendocrinos, es influenciado tanto por vías aferentes sensoriales como por el nivel de E_2 circulante en la sangre. El efector neuroendocrino secreta al lecho capilar en la base del hipotálamo, LHRH. Ésta llega a la hipófisis y produce liberación de LH. La sangre lleva LH al ovario, donde estimula la secreción de E_2 y si es suficiente LH, causa ovulación. El E_2 viaja por la sangre al cerebro y a la pituitaria donde actúa sobre receptores de las células blanco para modificar los circuitos neurales que controlan la secreción de LHRH y la lordosis (52).

C A P I T U L O I I

EFFECTOS DE LA LESION DE LA EMINENCIA MEDIA DEL HIPOTALAMO SOBRE

LA UNION Y CAPTACION DE ESTRADIOL EN LA HIPOFISIS ANTERIOR

INTRODUCCION

A través de los estudios que se han realizado sobre la regulación de los receptores a distintos niveles, se demuestra que estos no sólo son modificados por su hormona específica, sino que están bajo un control multihormonal. Además el efecto que un esteroide ejerce sobre un determinado receptor, sea el propio o no, varía en los diferentes tejidos.

Con respecto al receptor estrogénico se demostró que son varias las hormonas capaces de modificar algunas de sus características o bien alterar algún paso de su mecanismo de acción.

Se comprobó que la prolactina aumenta los niveles de receptores estrogénicos en glándula mamaria de rata tanto en condiciones "in vivo" (67) como "in vitro" (68) y también en tumores mamarios en humanos (69) y en rata (70).

La testosterona, un esteroide sintetizado en las células de Leydig, reduce significativamente la unión nuclear específica de (³H) estradiol en varias zonas cerebrales de ratas castradas adultas de ambos sexos (71).

La progesterona modula también los receptores para estrógenos. En el tracto reproductivo puede suprimir los niveles de receptor para estrógeno en presencia de elevadas concentraciones séricas de estradiol (72), como también disminuir la capacidad del estróge-

no para estimular el crecimiento uterino (73). Por otro lado, el pretratamiento "in vivo" con progesterona aumenta la retención de (^3H) estradiol por la pituitaria de ratas ovariectomizadas hasta 120 horas después del pretratamiento (74). Lisk y Reuter interpretaron que este aumento en la retención era debido a un aumento en la cantidad de receptor para estradiol disponible, como así también en el contenido nuclear de proteína receptora para estradiol. Paralelamente los efectos biológicos de los progestacionales dependen a menudo de su exposición previa a los estrógenos. Los estrógenos aumentan la concentración de receptores para progestágenos en oviducto, vagina, útero, pituitaria anterior e hipotálamo en una gran variedad de especies.

La administración de dexametasona, un corticoide sintético, lleva a una menor retención de (^3H) estradiol en varios tejidos blanco, ya sea que se midiera "in vivo" la retención por tejido total o "in vitro", la retención nuclear (75). Se interpretó que esto se debía principalmente a un cambio en la afinidad para el estradiol. Con respecto a los antiestrógenos, su efecto varía según el área que se estudie. En útero y pituitaria el CI-628 redujo la unión nuclear de (^3H) estradiol a un 5% del control y el efecto duraba por lo menos 96 horas, mientras que en el área preóptica-hipotálamo-amígdala a las 18 horas del tratamiento con CI-628 la unión disminuyó a un 13% del control y a las 96 horas se había recobrado un 70% (76).

Estudiando los ejemplos anteriores, comprobamos que no exis-

tían estudios sobre la posible regulación de la unión de estradiol en pituitaria anterior e hipotálamo por factores no hormonales. Podría esta unión estar influenciada por el sistema nervioso central?

Decidimos usar como modelo animales con lesión en la eminencia media (LEM). Con este procedimiento se desconecta la pituitaria de toda influencia neural.

Estudios preliminares habían demostrado que la LEM en ratas macho producía atrofia de los testículos y órganos sexuales accesorios, lo cual indicaba que había un impedimento en la secreción de gonadotrofinas (77 , 78); luego McCann y colaboradores comprobaron que en ratas hembras llevaba a una condición de constante diestro en el cual el flujo vaginal era leucocítico y los ovarios estaban llenos de cuerpos lúteos funcionantes (79). En un estudio muy completo, Bishop y colaboradores demostraron por primera vez los rápidos y dramáticos efectos de la lesión de eminencia media sobre la liberación de gonadotrofinas y prolactina (80).

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar (180-200g) instaladas en una habitación con aire acondicionado, luz desde 7 00 a 19 00 horas diariamente, alimentados con Farina y agua "ad libitum".

Todos los animales se ovariectomizaron por vía lumbar bajo anestesia con éter y se utilizaron 2-4 semanas después de la operación.

Lesión de eminencia media

Se destruyó la eminencia media del tuber cinereum mediante una corriente anódica. Se utilizó un aparato estereotáxico para ratas Krieg Johnson y electrodo de nicrome aislado excepto en la punta. Se pasó una corriente de 3 mAmp, durante 20 segundos. En todos los casos las lesiones fueron bilaterales con las siguientes coordenadas: 1.4 mm detrás del bregma, 0.3 mm sobre la base del cerebro y 0.5 mm lateralmente. Los animales estaban anestesiados con ketamina o embutal (33 mg/kg, intraperitoneal). La evaluación de las lesiones fue realizada por examen anatómico del hipotálamo y por el nivel de hormonas circulantes. Sólo fueron utilizados los datos de animales con menos de 1 ng/ml de LH sérico (80). Los animales controles fueron igualmente tratados

excepto que no se pasó corriente por los electrodos. Estas ratas se utilizaron 7-10 días después de la operación, salvo en aquellos casos que se especifican en "Resultados".

Recolección de sangre

Se toman las muestras por recolección de la sangre troncal luego de la decapitación.

Disección de zonas cerebrales

El animal se sacrificó por decapitación y se removió rápidamente el cerebro y se disecaron 6 zonas cerebrales de acuerdo al siguiente procedimiento: cuando se retiró el cerebro se encontró en el piso de la cavidad craneana la hipófisis, que se separó de la masa encefálica a nivel del tallo infundibular. La glándula se retiró con una pinza y se separó la adenohipófisis de la neurohipófisis, descartando esta última. El cerebro se ubicó con la zona ventral hacia arriba y se cortó con hoja de afeitar transversal y verticalmente, el primer corte a la altura del genu del cuerpo calloso y el segundo en el plano incluyendo el quiasma óptico y la comisura anterior. De este bloque A se disecó (a) el área trapezoidal que incluye la región preóptica, tubérculos olfatorios y banda diagonal de Broca (el área preóptica) y (b) el septum limitado por la comisura anterior, los dos ventrículos la-

terales y el cuerpo calloso. Se realizó luego un tercer corte transversal pero no verticalmente sino formando un ángulo de aproximadamente 45° dirigiendo el filo hacia abajo y atrás y comenzando el corte inmediatamente por detrás de los cuerpos mamilares. Se descartó la zona cerebelosa, quedando limitado el bloque B. Esta porción se recostó sobre el plano transversal anterior y se cortó sagitalmente, aproximadamente a 2 mm de la cara ventral. De esta porción se obtuvo el hipotálamo, cortando por las fisuras hipotalámicas, y las amígdalas con la corteza que las recubre a ambos lados del mismo. Del resto del bloque B se separó la corteza con pinzas de modo que quedó expuesta su cara interna y se sacó el hipocampo entero que quedó a la vista. Se obtuvieron las muestras de corteza cerebral cortando trozos de cada hemisferio (81).

Receptores

Ensayo de receptor citoplasmático para estradiol

Se sacrificaron los animales por decapitación y se removieron los tejidos a estudiar: la pituitaria y el hipotálamo. El lóbulo posterior de la pituitaria se separó y se descartó usando solamente en los experimentos el lóbulo anterior. El hipotálamo se limitó anteriormente por el quiasma óptico, lateralmente por las fisuras hipotalámicas, posteriormente por los cuerpos mamilares y por una profundi-

dad de aproximadamente 3 mm de la superficie ventral.

Se homogeneizaron los tejidos de varios animales (aproximadamente 1.5 mg de proteína/ ml de citosol) en buffer TEM (0.01 M Tris, 0.0015 M EDTA, 0.002 M mercaptoetanol, pH 7.4) y se centrifugaron a $105\ 000 \times g$ durante 60 minutos a $0-4^{\circ}$ C. Alícuotas del citosol (0.2 ml) se incubaron durante 20 minutos a 30° C, por duplicado con $2.2 \cdot 10^{-9}$ M de (2,4,6,7- 3 H) estradiol (New England Nuclear, 90-115 Ci/ mmol) y se hicieron incubaciones simultáneas, por duplicado con (3 H) estradiol más el agregado de $2.2 \cdot 10^{-6}$ M de estradiol no radioactivo para restar la unión no específica. El método usado para la incubación y la separación de la radioactividad libre y unida fue adaptada de Ginsburg y colaboradores (82). Finalizada la incubación, se separó el estradiol unido del libre por filtración en minicolumnas (0.6 cm x 10 cm) de Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden), el cual se preparó en el mismo buffer de incubación. La alícuota incubada se sembró y se eluyó con 1.05 ml de buffer TEM. Los eluidos se recogieron en viales de conteo y la radioactividad se extrajo con el agregado de 10 ml de una solución centelladora preparada con 4 g de Omnifluor (New England Nuclear) en 1 litro de tolueno y se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS 100C con un 83% de eficiencia para tritio. Para determinar el (3 H) estradiol unido específicamente a receptor citoplasmático se restó al valor de la radioactivi-

dad total unida el valor de la radioactividad presente aún después del agregado de estradiol no radioactivo o frío. Los resultados se expresaron en c.p.m./ mg proteína o femtomoles/ mg proteína.

Captación de (³H) estradiol por la pituitaria anterior y zonas del sistema nervioso central

Para realizar los estudios "in vivo" se inyectaron animales controles y con lesión de eminencia media con 10 uCi/ 150g de peso de (³H) estradiol disuelto en 0.2 ml de 20% etanol en salina, i.v.. Después de 1 hora los animales se anestesiaron con éter y se perfundieron con 60 ml de NaCl 0.9% vía cardíaca. Se extrajo el cerebro y la pituitaria anterior según se describió.

Los tejidos se pesaron y alícuotas de los mismos se colocaron en viales a los cuales se agregó 0.3 ml de solubilizador NCS (Amersham, Searle Corp., Arlington Heights). Después de una digestión a 50° C durante la noche, la mezcla se neutralizó con 0.1 ml de ácido acético glacial (Mallinckrodt Chemical Works, St Louis, Mo.), se agregaron 10 ml de solución centelladora y se determinó la radioactividad. La concentración tisular de (³H) estradiol se expresó como d.p.m./ 100 mg tejido y como la relación radioactividad/ 100 mg tejido/ radioactividad/ 100 mg corteza cerebral (T/C).

Determinación de proteínas

A una alícuota de citosol (0.2 ml) se le agregó un volumen igual de ácido tricloroacético 10% (Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis, Mo), se centrifugó y el precipitado proteico se resuspendió en 0.3 ml de NaOH 1 N. Se tomaron alícuotas de 40 ul de esta solución para determinar proteínas por el método de Lowry y colaboradores (83). Se usó albúmina de suero bovino como estandar.

Determinación de la síntesis proteica

Se determinó la síntesis de proteínas totales en pituitaria anterior e hipotálamo usando (^3H) glicina (2 uCi, 2 umol, 9.3 Ci/ mmol, New England Nuclear) como sustrato. Luego de una incubación de 15 minutos, los tejidos se incubaron durante 120 minutos a 37° C en un buffer Krebs-Ringer bicarbonato glucosa bajo atmósfera de carbógeno (95% O₂-5% CO₂). Bajo estas condiciones la velocidad de síntesis proteica permanece lineal hasta 180 minutos (84). Para purificar las proteínas y contar la radioactividad se utilizó un método ya descrito(85). Finalizado el tiempo de incubación se lavaron las pituitarias con 1 ml de KRBG y se purificaron las proteínas. Se homogeneizó cada pituitaria en 0.5 ml de 10% ácido tricloroacético (TCA) y se dejó en frío durante la noche; a la mañana siguiente se descartó el sobrenadante. Se agregó

0.5 ml de 5% TCA y se calentó durante 30 minutos a 90°C, descartando el sobrenadante. El precipitado se disolvió en 0.5 ml de etanol-éter (1:1, v/v) y se calentó a 40°C durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Después de lavar el precipitado con 0.5 ml de éter, se disolvió en 0.2 ml de NaOH 1 N y se tomó 20 ul para determinar proteínas según el método de Lowry (83). El volumen restante se pasó a un vial de conteo y se determinó la radioactividad. Los resultados se expresaron como c.p.m. incorporados/mg proteína.

Determinación de los niveles séricos de hormonas hipofisarias

Se tomaron muestras sanguíneas y se las mantuvo a 4°C hasta total retracción del coágulo. El suero se separó por centrifugación y se lo mantuvo a -20°C hasta el momento de la cuantificación radioinmunológica.

Para la medición de prolactina y hormona luteinizante se utilizó el radioinmunoanálisis por doble anticuerpo (86). Todas las determinaciones se efectuaron en alícuotas de 25 ul por duplicado.

La prolactina se cuantificó utilizando el juego de reactivos provistos por el NIAMDD, N.I.H., Maryland, E.E.U.U.. Para marcar se empleó prolactina obtenida de hipófisis de rata, el antisuero contra la prolactina de rata fue obtenido en conejos y como patrón se utilizó la hormona RP-1 (87).

La hormona luteinizante fue cuantificada por el método de Niswender, utilizando hormona luteinizante ovina para marcar y para la obtención de antisuero en conejos. Como patrón se usó la hormona NIH-LH-S1 (88). En ambos casos el segundo anticuerpo se logró en ovejas, contra globulina de conejo. Los resultados para ambas hormonas se expresaron en ng/ ml suero.

Análisis estadísticos

Los datos se expresaron como su media y error estandar. Para comparar resultados para diferencias grupales se empleó el test de "t" de Student. Para calcular la pendiente y el número máximo de sitios de unión en el análisis de Scatchard se utilizó el análisis de regresión lineal. Los datos se obtuvieron de una computadora Hewlett Packard modelo 9815A.

RESULTADOS

La Figura 2-1 muestra los resultados de varios experimentos cada uno de ellos llevado a cabo con 5 ratas controles y 5 ratas con lesión de eminencia media, sobre la unión de (^3H) estradiol en la pituitaria anterior e hipotálamo. En las ratas controles la unión a citosol de la pituitaria fue 59.7 ± 6.2 fmol/mg proteína, mientras que en el citosol de las pituitarias de animales lesionados en la eminencia media se obtuvo una disminución significativa: 36.9 ± 6.1 fmol/mg proteína ($p < 0.025$). En ratas controles el citosol de hipotálamo unió considerablemente menos estradiol que la pituitaria lo cual confirma lo hallado en otros laboratorios (89, 90). La lesión de eminencia media no alteró los ya bajos valores de unión encontrados en hipotálamos intactos. La prolactina sérica estaba significativamente aumentada por la lesión, mientras que los niveles de LH eran bajos (Figura 2-1).

Se investigó la influencia del tiempo de lesión de eminencia media sobre la unión del (^3H) estradiol en la pituitaria. Los resultados graficados en la Figura 2-2 demuestran que una hora después de la operación la unión fue un 34% menor que la control, la disminución fue más marcada a las 24 horas y alcanzó, aproximadamente, un 20% de su valor control a los 7 y 21 días de realizada la lesión. Concomitantemente, los valores de prolactina sérica, que eran 21 ± 2 ng/ml en los

UNION ^3H -ESTRADIOL EN CITOSOL

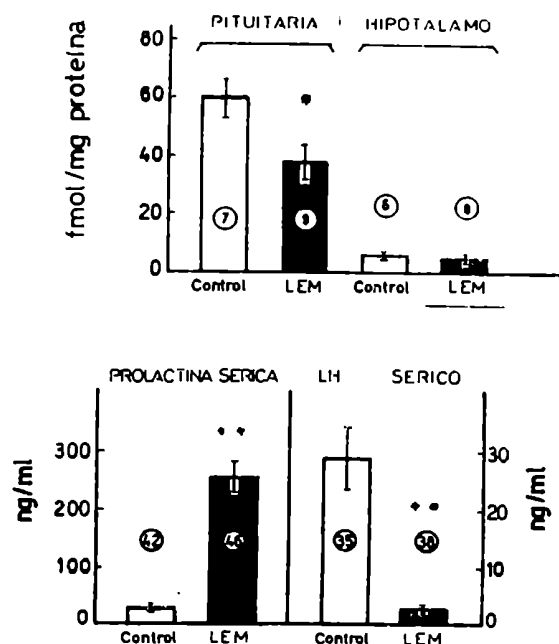


Figura 2-1. Gráfico superior: Unión de (^3H) estradiol a citosol de pituitaria anterior e hipotálamo en ratas controles con lesión simulada (columnas abiertas) y ratas con lesión de eminencia media (columnas oscuras). Las figuras dentro de las columnas representan el número de experimentos separados, cada uno de ellos llevado a cabo con 5 ratas controles y 5 lesionadas.

Gráfico inferior: Niveles de prolactina sérica (panel izquierdo) y hormona luteinizante (panel derecho) en ratas controles (columnas abiertas) y ratas con lesión de eminencia media (columnas oscuras). Las figuras dentro o sobre las columnas representan el número de animales estudiados. (* $p < 0.025$, ** $p < 0.001$).

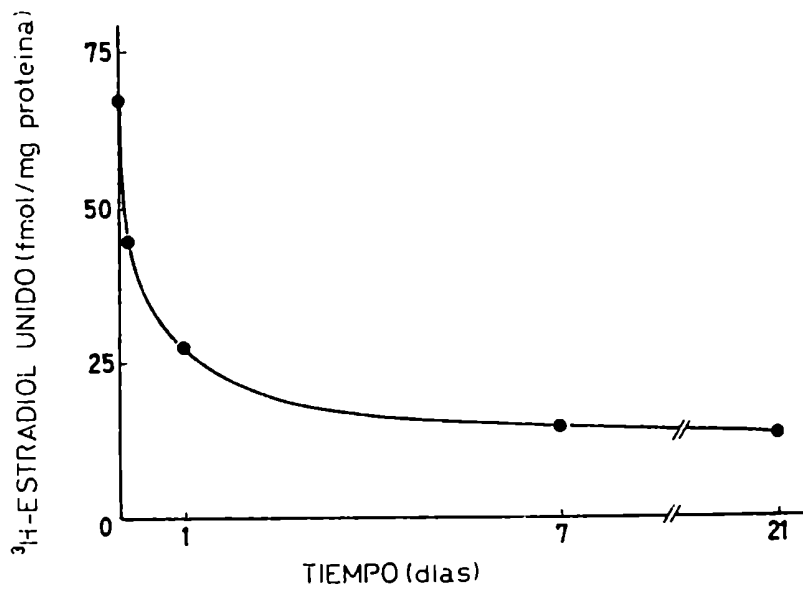


Figura 2-2. Unión de (³H) estradiol a citosol de pituitaria anterior en ratas controles con lesión simulada y ratas con lesión de eminencia media estudiadas 1 hora, y 1,7 y 21 días después de operadas.

controles se elevaron a 239 ± 60 ng/ml a la hora de lesión, 300 ± 94 ng/ml a las 24 horas, 279 ± 50 ng/ml a los 7 días y 236 ± 57 ng/ml a los 21 días de realizada la lesión. Estos valores son la media \pm estandar de 4 animales por punto.

Se investigaron los parámetros de la unión en el equilibrio de (^3H) estradiol a citosol de ratas controles y lesionadas en la eminencia media. Para ello se incubaron alícuotas de citosol de pituitarias de ambos grupos de animales con concentraciones crecientes de estradiol que cubrían un rango de 760 a 7600 femtomoles. Los resultados se graficaron según el método de Scatchard y se muestran en la Figura 2-3. El número máximo de sitios de unión disminuyó de 170 fmol/mg proteína en los animales control a 79 fmol/mg proteína en los lesionados; las constantes de asociación (K_a) en ambos grupos estaban en el mismo orden de magnitud ($1.72 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ en los controles, $3.58 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ en los grupos lesionados), a pesar que las rectas no fueron paralelas. Esto indica que las diferencias en la unión específica de (^3H) estradiol en las ratas lesionadas reflejaba mayormente cambios en la capacidad máxima de unión más que en la afinidad del receptor. En esta serie de experimentos, todas las ratas lesionadas eran hiperprolactinémicas y presentaban bajos valores de hormona luteinizante sérica, similares a los mostrados en la Figura 2-1.

En la Tabla 2-1 se muestra el efecto de la lesión de eminencia media sobre la distribución del (^3H) estradiol administrado "in vivo".

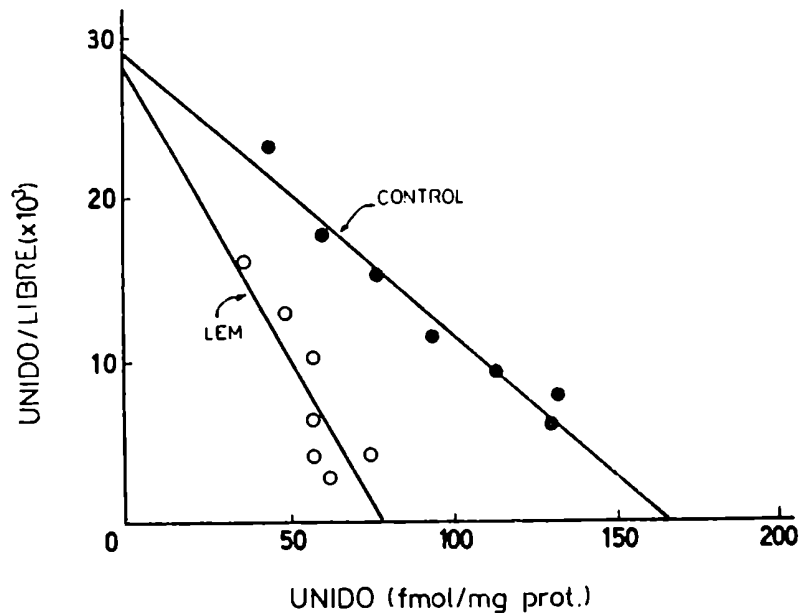


Figura 2-3. Análisis por el método de Scatchard de la unión de (³H) estradiol a citosol de pituitaria anterior en ratas controles (círculos negros) y ratas con lesión de la eminencia media (círculos abiertos). En controles la capacidad máxima de unión fue 170 fmol/mg proteína y K_a fue $1.72 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ (para la pendiente, $r: 0.97, p < 0.001$). En ratas lesionadas, la capacidad máxima de unión fue 79 fmol/mg proteína y K_a fue $3.58 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ (para la pendiente, $r: 0.85, p < 0.05$).

Tabla 2-1. Captación de (³H) estradiol por la pituitaria anterior y regiones cerebrales de ratas controles y ratas con lesión de eminencia media.

<u>Tejido</u>	<u>Ratas controles</u>		<u>Ratas lesionadas</u>	
	<u>d.p.m./100 mg tejido</u>	<u>T/C</u>	<u>d.p.m./100 mg tejido</u>	<u>T/C</u>
Pituitaria	36 044 [†] 3 597	37.1	20 514 [†] 1 766*	22.9
Hipotálamo	3 218 [†] 266	3.3	1 842 [†] 200*	2.1
Area preóptica	2 222 [†] 206	2.3	1 920 [†] 260	2.1
Septum	1 801 [†] 207	1.8	1 340 [†] 123	1.5
Amígdala	1 693 [†] 236	1.7	1 423 [†] 141	1.6
Hipocampo	1 243 [†] 134	1.3	908 [†] 131	1.0
Corteza	970 [†] 84	1.0	894 [†] 154	1.0

T/C: Radioactividad en tejido/ radioactividad en corteza.

Resultados expresados en promedio [†] error estandar; número de observaciones: 6 animales por grupo.

Difiere significativamente del tejido control * p < 0.01.

En ratas controles la mayor captación se encontró en la pituitaria seguida por el hipotálamo, mientras que el resto de las áreas examinadas en cerebro contenían menos radioactividad. La captación fue menor en la pituitaria e hipotálamo de ratas con 8 días de lesionadas, ya sea que los resultados se expresen como radioactividad tisular (d.p.m./100 mg) o como la relación tejido/corteza (T/C). No hubo diferencias entre ambos grupos en área preóptica, septum, amígdala, hipocampo o corteza cerebral.

En la última serie de experimentos se estudió la incorporación de (^3H) glicina a proteínas totales de pituitaria e hipotálamo. En ambos tejidos la síntesis proteica de los animales lesionados fue similar a los controles (Tabla 2-2).

Tabla 2.-2. Incorporación de (³H) glicina a proteínas de pituitaria anterior e hipotálamo de ratas controles y ratas con lesión de eminencia media.

<u>INCORPORACION (c.p.m./mg proteína)</u>			
<u>Grupo</u>	<u>N</u>	<u>Pituitaria anterior</u>	<u>Hipotálamo</u>
Controles	3	12 652 [±] 778	2 008 [±] 265
LEM	3	14 250 [±] 616	2 898 [±] 1051

Los resultados se expresaron como medias [±] ES; LEM: animales con lesión de eminencia media; N: número de animales.

DISCUSION

Los resultados obtenidos sugieren que los receptores citosólicos para estradiol en la pituitaria anterior podrían estar bajo la influencia del sistema nervioso central, ya que al interrumpir la normal relación entre el cerebro y la pituitaria, con la lesión de la eminencia media, se produce una disminución de la unión de estradiol "in vitro".

Esta disminución ya es notoria a la hora de destruída la eminencia media y continúa hasta alcanzar un "plateau" a los 7 días. Esto indica un efecto rápido y duradero de la destrucción electrolítica hipotalámica sobre los receptores para estradiol en la pituitaria anterior.

En los animales lesionados existe una disminución del 50% en la capacidad máxima de unión y la constante de asociación está en el mismo orden de magnitud que la hallada en los animales controles. Sin embargo la falta de paralelismo en las rectas obtenidas de los datos graficados según el método de Scatchard, sugieren que los animales lesionados podrían sumar a la reducción en el número de receptores, un cambio en la afinidad por el estradiol. Esta reducción en la capacidad de unión no se debe a un efecto generalizado de la lesión hipotalámica sobre la síntesis proteica en la pituitaria anterior ya que ésta se midió por la incorporación de glicina, y fue similar en ambos grupos

de animales.

Paralelamente a los estudios realizados "in vitro", se estudió la captación "in vivo" de (^3H) estradiol por los distintos tejidos. Los resultados demostraron que la lesión de la eminencia media produce una disminución en la retención de estradiol por la pituitaria anterior, de modo que se ratificó lo hallado "in vitro".

Los estudios "in vivo" demostraron a su vez una disminución de la captación de estradiol por el hipotálamo de los animales lesionados, dato que no se había detectado en los estudios "in vitro". Si bien este dato es sorprendente podría explicarse por el hecho que la captación "in vivo" de estradiol por el hipotálamo depende no sólo de los receptores sino de otros factores, por ejemplo, la irrigación sanguínea. Por otro lado, la captación hipotalámica de estradiol no fue un proceso completamente saturable (60%) y en consecuencia existe una contribución de retención no específica. Además podría ser que los cambios se produjeran en zonas discretas y que en los experimentos realizados "in vitro", no pudieran detectarse por la dilución que produce el empleo de hipotálamos totales.

El mecanismo por el cual la lesión de eminencia media reduce los receptores para estradiol en la pituitaria está abierto a la especulación, aunque pueden considerarse tanto efectos directos como indirectos.

El hipotálamo regula continuamente las propiedades y las

funciones secretorias de las células de la pituitaria a través de la liberación de neurohormonas y neurotransmisores que llegan a la pituitaria a través del sistema porta. La lesión hipotalámica posiblemente destruya el sitio de síntesis y/o tránsito de estos moduladores y así la pituitaria quedaría libre de la influencia neural. En consecuencia el efecto de la lesión de eminencia media reflejaría la ausencia de regulación sobre todas las funciones de las células hipofisarias, incluyendo los receptores para estrógenos.

Ya ha sido demostrado por otros laboratorios que la lesión de la eminencia media disminuye la producción y secreción de diversas hormonas hipofisarias: hormona foliculoestimulante, luteinizante, corticotrofina, tirotrófina y somatotrofina (80 , 91 , 92). Si bien no hay una demostración directa que las células de la hipófisis anterior responsables de la liberación de cada una de estas hormonas contiene receptores para estradiol, el trabajo de Stumpf (93) utilizando autorradiografía después de la administración de estradiol, demostró que el 85% de las células de la pituitaria retenían estradiol y las acidófilas contenían una mayor proporción del esteroide radioactivo.

Una interpretación alternativa de los experimentos es que los cambios en la situación endócrina que produce la lesión de la eminencia media, sean los responsables de la reducción de los receptores en la pituitaria. Todos los animales lesionados tenían altos niveles de prolactina y bajos los de hormona luteinizante sérica. A la hora de sacrifica-

dos, los animales estaban hiperprolactinémicos y esta situación se repetía en animales utilizados a los 1, 7, 8, 10 y 21 días de lesionados. Este dato corrobora el de Bishop y colaboradores (80). Este grupo demostró un aumento rápido de hormona luteinizante sérica a la hora de la lesión de la eminencia media, con una declinación posterior a niveles muy bajos. En consecuencia no parece haber un paralelismo entre los niveles de hormona luteinizante y los datos aquí presentados de la unión de estradiol, que sugiere en cambio, que la disminución en el número de receptores refleja la dirección ascendente de la liberación de prolactina.

La prolactina tiene efecto de retroalimentación negativa sobre la pituitaria anterior y el cerebro (94). Esta acción conduce a una disminución en el peso de la pituitaria anterior y en la concentración de prolactina después de la administración de esta hormona (95) o el trasplante de tumores secretantes de prolactina (96).

La hiperprolactinemia está también ligada a una disminución en la secreción de gonadotrofinas (97). Tanto la hipófisis anterior como el cerebro contienen receptores para prolactina (98 , 99) y podría especularse que uno de los efectos de la retroalimentación negativa de la prolactina se relaciona con la regulación de la unión de estradiol. Si así fuera, la disminución de la unión de estradiol podría ser uno de los posibles pasos por los cuales la prolactina limita su propia síntesis y secreción, en la medida que el estradiol aumenta la función y la actividad

secretora de las células productoras de prolactina en la hipófisis anterior (81 , 84).

En conclusión, la concentración de receptores para estradiol en la hipófisis anterior puede estar regulada directa o indirectamente por el cerebro. Los mediadores de este efecto podrían implicar sustancias neurales secretadas por el hipotálamo y/o niveles séricos de alguna hormona hipofisaria.

C A P I T U L O I I I

E F E C T O D E L A B R O M O C R I P T I N A Y L H R H S O B R E L O S

R E C E P T O R E S E S T R O G E N I C O S D E L A A N T E R O H I P O F I S I S

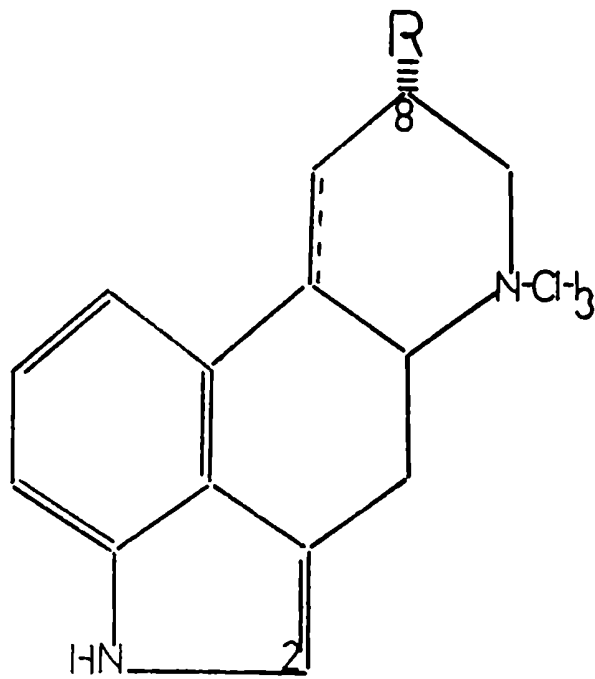
INTRODUCCION

En el capítulo anterior describimos los efectos que la lesión de la eminencia media producía sobre los receptores en la pituitaria anterior y los cambios hormonales que podrían estar involucrados. Enfatizamos asimismo la influencia directa que podría ejercer el sistema nervioso central sobre los receptores hipofisarios.

Para analizar aún más estos cambios decidimos ver qué efecto se obtenía sobre la unión de estradiol en pituitaria de ratas hiperprolactinélicas debidas a una lesión de la eminencia media, con el tratamiento con un agonista dopaminérgico. Actualmente la dopamina es aceptada como el principal factor inhibidor de la secreción de prolactina. Como agonista dopaminérgico se eligió bromocriptina por su fuerte acción inhibitoria sobre la prolactina.

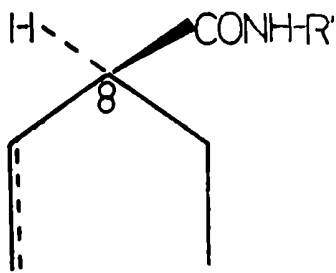
Los compuestos del ergot tienen una estructura de anillo tetracíclico llamada ergolina (6-metil-ergolina). Pueden diferenciarse 3 subgrupos importantes: a) derivados del ácido lisérgico, entre ellos la bromocriptina, b) derivados de las clavinas y c) compuestos caracterizados como amino ergolinas (Figura 4-1).

Ya en 1954 Everett (100) describió que la desconexión de la hipófisis de la influencia neural, mediante su transplante bajo la cápsula renal, produce una hipersecreción de prolactina. Nosotros utilizamos este modelo para probar los efectos de bromocriptina y comparar

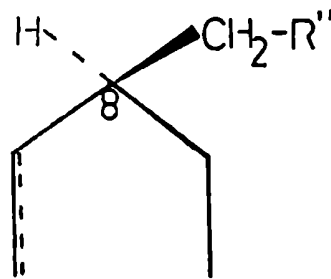


ergolinas

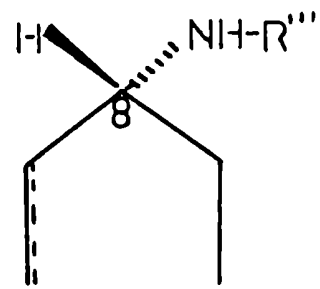
R:



amidas del
ácido lisérgico



clavinas



amino
ergolinas

Figura 4-1: Los compuestos del ergot tienen una estructura de anillo tetracíclico llamada ergolina. Pueden diferenciarse 3 subgrupos: a) derivados del ácido lisérgico, b) derivados de las clavinas, c) compuestos caracterizados como amino ergolinas.

los resultados en ambos modelos hiperprolactinémicos.

Por otra parte, consideramos que la acción de la dopamina podría ser directa sobre la hipófisis, a través de sus receptores específicos, o bien indirecta. En este caso, algunos autores postulan que la dopamina libera LHRH o factor liberador de las gonadotropinas (101). Por lo tanto, diseñamos experimentos en que la unión del (^3H) estradiol fue estudiada en animales con y sin tratamiento con LHRH.

El estudio sobre el efecto del LHRH fue completado con experimentos donde se estudió la posible acción de este factor sobre los receptores citosólicos para estradiol, y además sobre la translocación nuclear del complejo estradiol-receptor, evento de trascendental importancia para la expresión biológica de la acción de la hormona sobre la célula blanco.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Lesión de la eminencia media

El procedimiento utilizado fue descrito en el Capítulo III. Los animales lesionados fueron en todos los experimentos ratas hembras Wistar castradas (180-200 g).

Transplante de la hipófisis debajo de la cápsula renal

En animales bajo anestesia etérea se afeitó la zona renal izquierda y se cortó piel y músculo en busca del riñón. Se ojaló la cápsula renal y ayudándose con pinzas se insertaron 3-4 lóbulos anteriores entre el riñón y la cápsula renal alejando el tejido transplantado de la abertura. Se reubicó el riñón y se utilizaron los animales de 7-10 días después de la operación.

Las hipófisis transplantadas provinieron de ratas hembras Wistar enteras y se removieron inmediatamente después de sacrificado el animal donante. Se separó el lóbulo posterior, que se descartó y se procedió al transplante. Para evaluar el éxito de la operación se consideraron como parámetros a) la vascularización del transplante, por observación macroscópica y b) su funcionalidad a través de la hiperprolactinemia sé-

rica en los animales receptores.

Tratamiento con drogas que modifican la secreción de prolactina

Los animales fueron tratados con mesilato de bromocriptina (Sandoz, Suiza) con el fin de revertir la hiperprolactinemia causada por (a) la lesión de eminencia media o (b) los transplantes de hipófisis bajo cápsula renal.

La bromocriptina con el agregado de igual cantidad de ácido tartárico se disolvió en etanol 70%-solución fisiológica (30:70 v/v) hasta una concentración de 3mg/ml. Todos los animales recibieron el siguiente esquema de inyecciones subcutáneas: una dosis diaria total de 3mg/kg durante una semana en dos dosis igualmente divididas a las 9 00 y 16 00 horas. Al 8^o día los animales se inyectaron a las 9 00 horas y se sacrificaron a las 12 horas por decapitación. Los animales controles recibieron sólo vehículo.

Tratamiento con el factor liberador de gonadotrofinas

Se utilizaron dos preparados de LHRH: 1) LHRH natural sintético (Luteoliberina, Elea), obtenido por donación del Dr. Ibañez y 2) un agonista del LHRH, denominado Buserelin (D-Ser(Bu^t)⁶LHRH(1-9))etilamida, obtenido por donación del Dr. Fernand Labrie, Laboratory of Molecular En-

ocrinology, Le Centre Hospitalier de l'Université Laval, Quebec, Canadá.

En ambos casos, el LHRH se disolvió en 0.9% NaCl conteniendo 1% gelatina y se conservó a -4°C . Los esquemas terapéuticos fueron muy variados y se detallan en los distintos experimentos de la sección Resultados.

Receptores

Ensayo del receptor citoplasmático para estradiol

Los detalles del método utilizado fueron especificados en el Capítulo II.

Ensayo de intercambio nuclear para estradiol

Los animales fueron tratados previamente con estradiol de acuerdo a los protocolos especificados en la sección Resultados. Este procedimiento es necesario para lograr la translocación al núcleo de los receptores citoplasmáticos, aunque implica la determinación de los receptores totales, es decir, translocados más los libres existentes en el núcleo celular (102).

El método fue adaptado de Roy y McEwen (102). Se homogeneizaron los tejidos de 3 animales en un buffer 0.001 M KH_2PO_4 , pH 6.5 conteniendo 0.003 M MgCl_2 , 0.32 M sacarosa y 0.25% (v/v) Tritón X 100 (Mallinkrodt Chemical Works, St. Louis, U.S.A.). El homogenato se centrifugó durante 10 minutos a 3000 r.p.m. y 0°C y se obtuvo un primer sobrenadante (SN1) y un pellet nuclear crudo. Este pellet se resuspendió en un buffer

0.001 M KH_2PO_4 , pH 6.5 conteniendo 0.003 M MgCl_2 , 0.32 M sacarosa (sin Tritón) y se lavó dos veces centrifugando a 3 000 r.p.m. durante 10 minutos cada vez y descartando los sobrenadantes. Los núcleos purificados se resuspendieron en 0.2 ml de la solución 0.32 M sacarosa, sin Tritón, y se mezclaron con 1.05 ml de un buffer 0.001 M KH_2PO_4 , pH 6.5 que contenía 2.39 M de sacarosa, 0.001 M MgCl_2 para dar una concentración final de sacarosa 2 M. Esta mezcla se centrifugó a 0°C 12 000 r.p.m. durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y se obtuvo un pellet nuclear purificado. Se agregaron 150 μl de buffer TDB (0.01 M Tris-ClH, pH 7.6 que contenía 0.001 M ditiotreitól (DTT, Sigma Chemical Co), 0.0005 M bacitracina (Sigma Chemical Co)) y se resuspendieron los núcleos. En ese momento se agregó igual volumen de buffer TDBK.8 (TDB más 0.8 M KCl). Las muestras se mantuvieron en hielo durante 30 minutos con agitación ocasional y se centrifugaron a 12 500 r.p.m. durante 10 minutos a 0°C . Se decantaron los sobrenadantes y se determinó el ADN en los precipitados según el método de Burton (103). Los sobrenadantes se incubaron en dos series simultáneas: la primera contenía 2.5×10^{-9} M de (^3H) estradiol y la segunda 2.5×10^{-9} M de (^3H) estradiol más el agregado de 2.5×10^{-6} M de estradiol no radioactivo. Se incubaron durante 5 horas a 25°C y se filtraron por minicolumnas de Sephadex LH-20, previamente equilibrado en un buffer 0.01 M Tris-ClH, 0.4 M KCl, pH 7.6 (TK.4). Se sembraron 250 μl de la mezcla de incubación y se eluyeron con 1 ml de buffer TK.4. Se recogieron los eluidos en viales de conteo y se agregaron 10 ml de solución centelladora para extraer la radioactividad. Para determinar el (^3H) estradiol presente en los núcleos y unido específicamente a receptor, se resta al valor de la radio-

actividad total unida el valor de la radioactividad presente aún después del agregado de estradiol frío. Los resultados se expresaron como femtomoles/ mg ADN o c.p.m./ mg ADN.

Incubación "in vitro" de pituitaria anterior

Los trozos de tejido se colocaron en vasos de 10 ml y se agregó 1 ml de buffer Krebs Ringer bicarbonato glucosa burbujeado con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Se incubaron las muestras a 37°C durante distintos tiempos bajo atmósfera de carbógeno. Finalizada la incubación, los tejidos se pesaron y trataron de acuerdo al tipo de determinación a efectuar.

Determinación de los niveles séricos de hormonas hipofisarias

La descripción de los radioinmunoensayos de prolactina y LH fue detallada en el Capítulo II.

Análisis estadísticos

Los datos se expresaron como su media y error estandar. Para comparar resultados para diferencias grupales se empleó el test de "t" de Student. Los datos se obtuvieron de una computadora Hewlett Packard modelo 9815A.

RESULTADOS

Como ya demostramos en el Capítulo II las ratas con lesión en la eminencia media y sacrificadas 8 días después de la operación presentan una significativa reducción en la unión del (^3H) estradiol al citosol de pituitaria anterior y un incremento considerable en los niveles de prolactina sérica (Figura 3-1). Estos cambios se revirtieron por tratamiento de los animales lesionados con inyecciones diarias de bromocriptina a partir del día que se ubicó la lesión hasta el sacrificio, 8 días después. En este caso, la unión de (^3H) estradiol fue mayor en los animales lesionados y tratados con bromocriptina que en las ratas lesionadas y tratadas sólo con vehículo ($p < 0.02$). Con respecto a los animales con operación simulada, la unión fue ligeramente mayor aunque no significativa. Los niveles de prolactina se redujeron en los animales lesionados después del tratamiento con bromocriptina (Figura 3-1).

Posteriormente, quisimos investigar si el tratamiento con bromocriptina afectaba también la unión de (^3H) estradiol a citosol de pituitarias normales además de hacerlo en los animales lesionados. A tal efecto se trató un grupo de ratas ovariectomizadas, diariamente con la droga durante 8 días, al final de los cuales se hicieron ensayos de unión y determinaciones de niveles de prolactina. En la Figura 3-2 se muestran los resultados de 5 experimentos separados. El tratamiento con bromocriptina de las ratas controles tuvo un ligero efecto estimu-

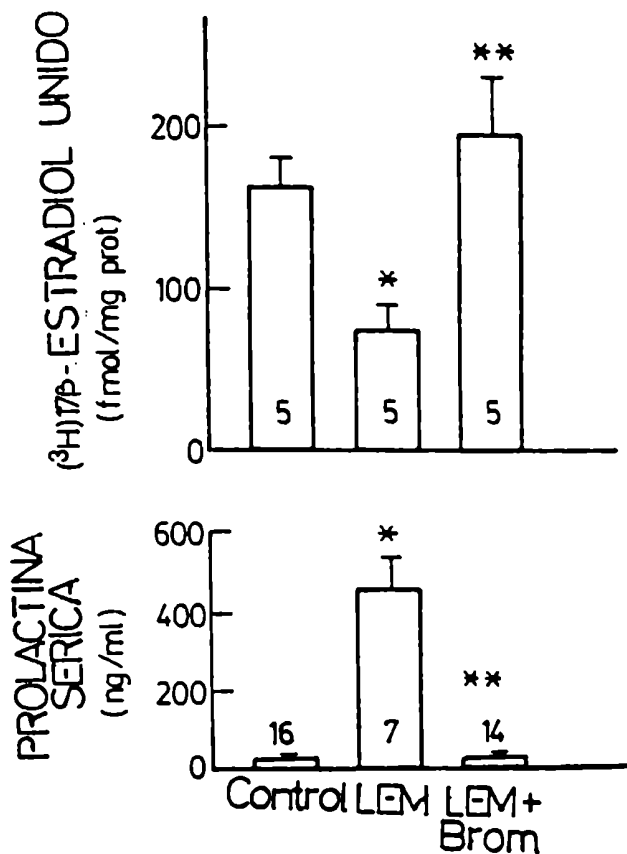


Figura 3-1. Gráfico superior: Unión de (^3H) estradiol a citosol de pituitaria anterior en ratas controles con lesión simulada, lesión en la eminencia media (LEM) y LEM tratadas con bromocriptina. Las figuras dentro de las columnas representan números de experimentos separados, cada uno de ellos llevado a cabo con 5 animales.

Gráfico inferior: Niveles de prolactina sérica en el mismo grupo de animales. Las figuras dentro o sobre las columnas representan el número de animales estudiados. Los resultados se expresaron como media \pm error estandar. (* $p < 0.001$ vs. controles, ** $p < 0.02$ vs. LEM).

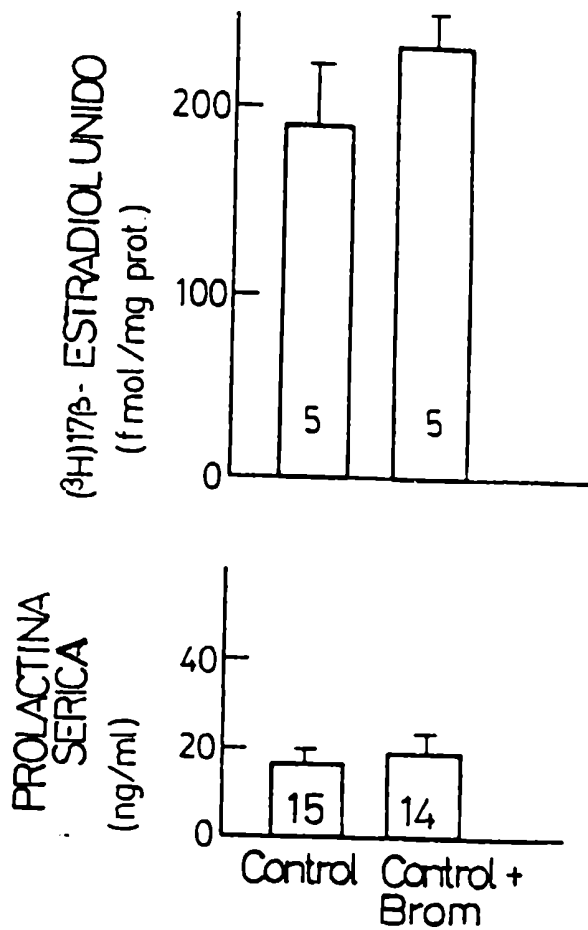


Figura 3-2. Gráfico superior: Unión de (^3H) estradiol a citosol de pituitaria anterior en ratas controles y ratas controles tratadas con bromocriptina.

Gráfico inferior: Niveles de prolactina sérica en los mismos grupos de animales. Los números dentro de las columnas representan el número de animales estudiados. En el gráfico superior los números representan experimentos separados, cada uno de ellos llevado a cabo con 5 animales.

latorio sobre la unión de (^3H) estradiol, pero que no fue significativamente diferente de los animales controles. Los niveles de prolactina sérica fueron similares en ambos grupos. El efecto de la bromocriptina fue considerado específico para pituitarias desconectadas del cerebro mediante lesión hipotalámica.

Otra serie de experimentos se llevaron a cabo usando otro modelo de rata hiperprolactinémica. En este caso el aumento de prolactina plasmática se logró mediante el transplante de glándulas pituitarias bajo la cápsula renal (100).

La Figura 3-3 muestra los resultados de la unión de (^3H) estradiol a pituitarias "in situ" de animales con transplante, a pituitarias transplantadas bajo la cápsula renal y a pituitarias transplantadas bajo la cápsula renal de animales tratados con bromocriptina. La unión de (^3H) estradiol a pituitarias "in situ" de animales con transplante dio valores de 157 ± 9 fmol/ mg proteína (media \pm error estandar, n=4 experimentos), en el rango de las pituitarias normales mostradas en las Figuras 3-1 y 3-2 (163 ± 16 y 189 ± 36 fmol/ mg proteína, respectivamente). La unión en las pituitarias transplantadas de ratas no tratadas fue sólo un 10% del valor hallado en las glándulas "in situ" del mismo grupo de animales.

En contraste con lo hallado en ratas con lesión de la eminencia media, esta reducción de los receptores estrogénicos no fue revertida por el tratamiento de los animales transplantados con bromocrip-

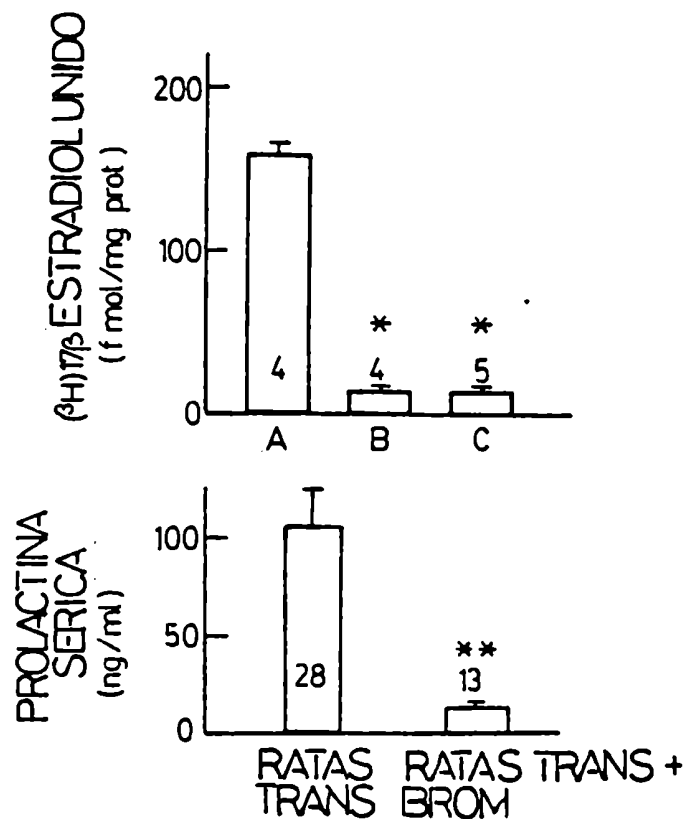


Figura 3-3. Gráfico superior: Unión de (^3H) estradiol a citosol de pituitarias "in situ" de animales con transplantes (A), de pituitarias transplantadas (B) y de pituitarias transplantadas en animales tratados con bromocriptina (C). (*p < 0.001 vs. pituitarias "in situ" , grupo (A))

Gráfico inferior: Niveles de prolactina sérica en animales con transplante tratados o no con bromocriptina. (**p < 0.001 vs. ratas transplantadas). Las figuras dentro o sobre las columnas representan el número de animales estudiados. En el gráfico superior, las figuras dentro de las columnas representan el número de experimentos separados, cada uno de ellos llevado a cabo con 5 animales.

tina por 8 días. Los niveles de prolactina sérica a consecuencia de los transplantes se elevaron aproximadamente 5 veces ($p < 0.001$) comparados con los niveles en ratas controles ovariectomizadas (Figuras 3-1 y 3-2). El tratamiento con bromocriptina redujo estos niveles significativamente en los animales con transplante. Este dato concuerda con lo demostrado por Flückiger y del Pozo (104), lo que sugiere que la bromocriptina actuaría no solamente a nivel hipotalámico sino también directamente sobre la pituitaria como agonista del receptor dopaminérgico.

Luego de demostrar que la bromocriptina regulaba los receptores citosólicos de la anterohipófisis, nos abocamos a dilucidar si otros factores hipotalámicos intervendrían en la regulación de estos receptores, por las razones discutidas en la Introducción de este capítulo.

En la Tabla 3-1 mostramos los resultados de varios experimentos donde tratamos animales con LHRH o estradiol. Utilizando dosis de 5 ug/ rata/día durante 5 días del análogo sintético denominado Buserelín, no observamos cambios en ratas hembras intactas o ratas castradas. En ratas castradas, tratadas con estradiol en la dosis de 0.125 ug/ 100 g durante 5 días, no obtuvimos cambios cuando el tratamiento incluyó LHRH (Tabla 3-1). El LHRH no modificó la unión del (^3H) estradiol aunque produjo aumentos del LH sérico.

La falta de regulación de los receptores citosólicos por LHRH nos llevó a considerar la posible influencia del factor liberador

Tabla 3-1. Evidencias que el LHRH administrado "in vivo" no modifica los receptores citosólicos estrogénicos de hipófisis incubadas "in vitro".

	<u>LHRH (ug)</u>	<u>E₂ (ug/100g PC)</u>	<u>LH (ng/ml)</u>	<u>fmol ³H-E₂unido/mg prot</u>
Grupo (a)	--	--	295.13 [†] -82.04	92.01 [†] -4.4
	5	--	720.48 [†] -151.36	123.34 [†] -28.75
Grupo (b)	--	--	407.3 [†] -143.73*	92.32 [†] -16.83
	5	--	938.28 [†] -139.26	93.08 [†] -16.68
Grupo (c)	--	--	2878.45 [†] -543.12	88.25 [†] - 2.46
	5	--	2406.95 [†] -595.83	111.42 [†] -10.03
Grupo (d)	--	0.125	1302.47 [†] -135.40**	83.92 [†] - 5.24
	5	0.125	2335.17 [†] -318.52	85.39 [†] - 9.00

Grupos: a) animales enteros tratados con 5 ug LHRH (Buserelin)/día durante 4 días y castrados el día anterior al experimento; b) animales castrados e inyectados durante 4 días con LHRH; c) grupo semejante al a), y d) animales castrados e inyectados con 0.125 ug/100 g de estradiol y LHRH 5ug/día durante 4 días.

*p < 0.025

**p < 0.02

sobre la unión nuclear de la hormona, en vista a los resultados del grupo de Muldoon (105) en este sentido. En esta serie de experimentos, ratas hembras castradas fueron divididas en dos grupos: el primero fue considerado control, y al segundo se le administró 1 ug de LHRH (Luteolibarina Elea) por día durante 7 días. Una hora antes del sacrificio, ambos grupos fueron estimulados con 20 ug de estradiol i.p. para inducir la translocación nuclear. La Figura 3-4 muestra los datos en los animales controles con y sin tratamiento con LHRH (columnas de la derecha): no se observó ninguna modificación por acción del LHRH. En una segunda serie de experimentos, utilizamos ratas con LEM que fueron similarmente tratadas con LHRH en la dosis de 1 ug/ día durante 7 días, mientras que otro grupo de ratas con LEM fueron inyectadas con vehículo. Los dos grupos fueron estimulados con 20 ug de estradiol i.p. 1 hora antes del experimento, en el que se determinaron los receptores nucleares para (³H) estradiol mediante la técnica de intercambio. La Figura 3-4 muestra que en forma similar a las ratas controles, los animales con lesión hipotalámica no respondieron al LHRH, en cuanto a que la translocación nuclear no fue modificada por el tratamiento.

En otros experimentos, empleamos diferentes esquemas terapéuticos para estudiar el posible efecto del LHRH sobre los receptores estrogénicos del núcleo. En los experimentos de la Figura 3-5, animales castrados fueron tratados con 10 ug de LHRH cada 30 minutos, en total 3 inyecciones, con sacrificio a los 60 minutos. Un primer grupo fue tratado con 500 ng de estradiol/ 100 g de peso y otro con 50 ng de hormona

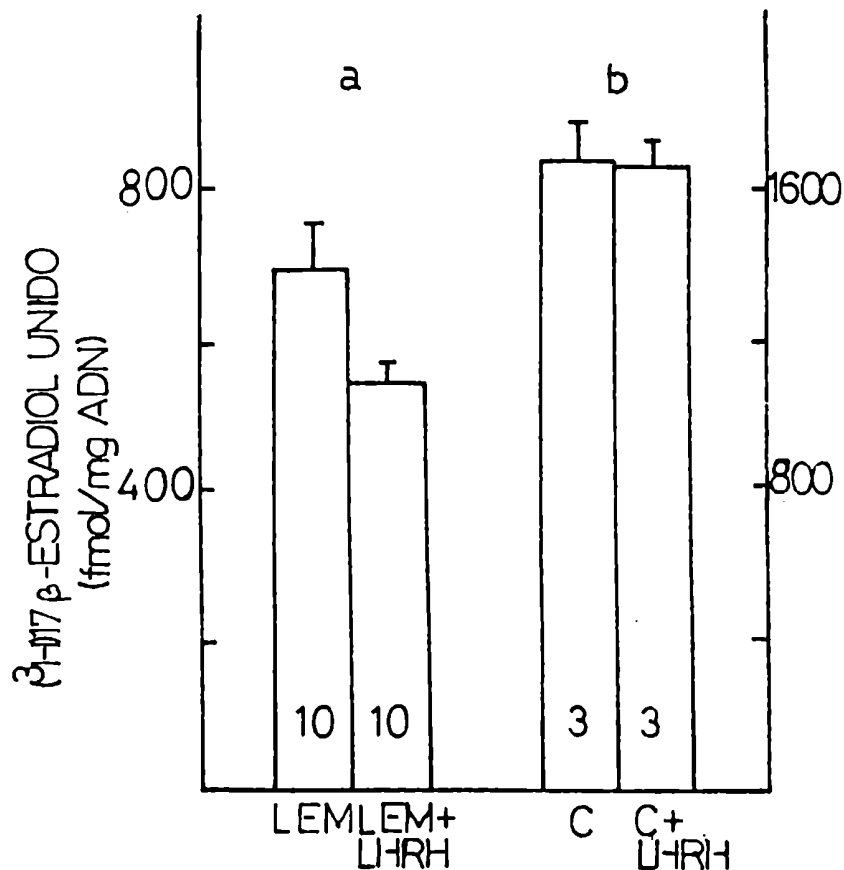


Figura 3-4. Ensayo de intercambio nuclear. Grupo (a): animales lesionados en la eminencia media (LEM) e inyectados o no, durante 7 días con 1ug LHRH/día, 2 días después de la operación. Grupo (b): idéntico esquema pero utilizándose las pituitarias de animales controles. Los números en las columnas representan el número de experimentos separados, cada uno de ellos llevado a cabo con 3 animales.

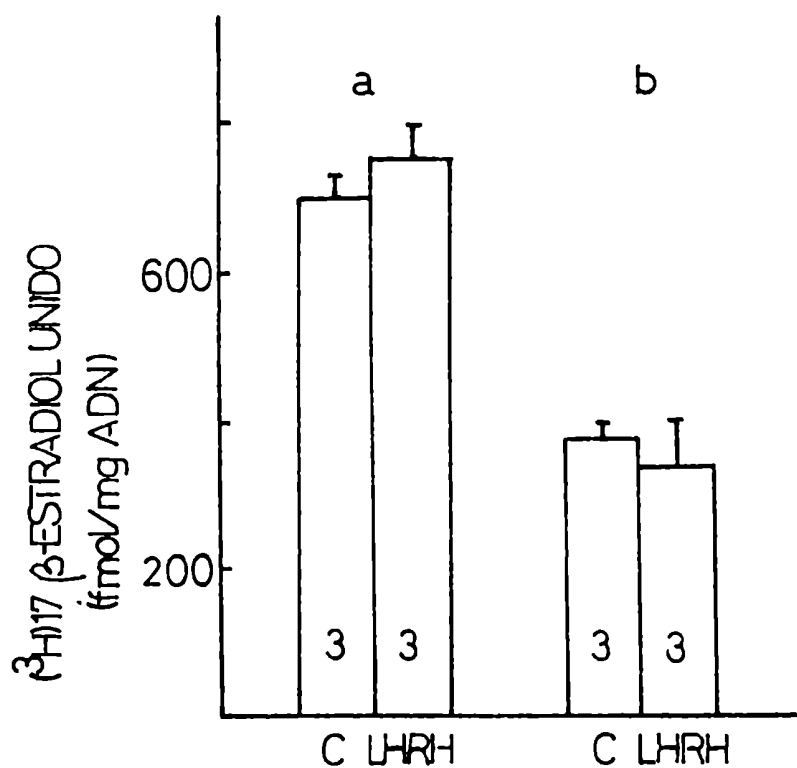


Figura 3-5. Ensayo de translocación nuclear "in vivo". Los animales se trataron con 3 inyecciones de LHRH (10ug) cada 30 minutos y se sacrificaron a la hora. Grupo (a): inyectados durante 2 días previos con 500 ng E_2 /100g PC. Grupo (b): inyectados durante 2 días previos con 50ng E_2 /100g PC. El número en las columnas representa cantidad de experimentos separados, cada uno de ellos llevado a cabo con 3 animales.

durante los dos días previos al experimento. La concentración de sitios receptores nucleares para (^3H) estradiol determinados por intercambio, no mostró diferencias entre los grupos tratados con LHRH y los no tratados.

La última posibilidad explorada fue que el LHRH actuara "in vitro" sobre la hipófisis regulando la translocación del receptor citoplasmático al núcleo. Para estudiar este mecanismo, se emplearon animales controles castrados, en el primer experimento (Tabla 3-2) y animales con lesión hipotalámica (Tabla 3-3). En el experimento de la Tabla 3-2, las pituitarias de ratas castradas se dividieron en cuatro grupos: a) sin tratamiento; b) con el agregado de LHRH (Buserelin) 50 ng/ml de medio; c) con estradiol, 150 pg/ml de medio y d) LHRH más estradiol. Luego de incubar las glándulas en estas condiciones durante 60 minutos, se analizaron los receptores nucleares por técnicas de intercambio. En la Tabla 3-2 se observa que en las pituitarias de animales castrados sin tratamiento, se obtiene una discreta pero medible unión nuclear, correspondiente a los receptores nucleares libres, ya descrito por otros autores (106). El LHRH no posee efectos en pituitarias no estimuladas (grupo b) ni en aquellas donde la translocación nuclear fue estimulada por el estradiol (grupo d). El agregado de estradiol "in vitro" fue sumamente efectivo para promover la translocación, y esta acción evidentemente no necesita del LHRH.

Cuando se utilizaron ratas con LEM (Tabla 3-3), y en todos los casos se estimuló la translocación nuclear con 150 pg/ml de estradiol en el medio de incubación, el grupo LEM presentó una ligera reducción de la

Tabla 3-2. Efecto del LHRH sobre la translocación nuclear del receptor estrogénico "in vitro".

	<u>LHRH (ng/ml)</u>	<u>E₂ (pg/ml)</u>	<u>(³H) estradiol unido/mg ADN</u> ^{f_{mol}}
Grupo (a)	--	--	190.44
	--	--	125.15
Grupo (b)	50	--	121.79
	50	--	120.64
Grupo (c)	--	150	481.06
	--	150	348.75
Grupo (d)	50	150	392.25
	50	150	349.71

Las hipófisis de ratas castradas se incubaron durante 60 minutos a 37°C en medio Krebs-Ringer bicarbonato glucosa, en ausencia de hormonas (grupo a), con LHRH (Buserelin, grupos b y d), o con 150 pg/ml de estradiol (grupos c y d). Finalizada la incubación se determinó la unión nuclear del (³H) estradiol mediante ensayo de intercambio.

Tabla 3-3. Efecto del LHRH sobre la translocación nuclear del receptor estrogénico "in vitro" de la hipófisis de ratas con lesión de eminencia media (LEM).

	<u>Estradiol</u> <u>(pg/ml)</u>	<u>Animales</u>	<u>LHRH</u> <u>(ng/ml)</u>	<u>(³H) estradiol unido</u> <u>(fmol/mg ADN)</u>	<u>n</u>
Grupo (a)	150	Controles	--	190.94 ± 26.61	3
Grupo (b)	150	LEM	--	141.36 ± 11.6	3
Grupo (c)	150	LEM	50	167.77 ± 19.76	3

Las hipófisis de ratas castradas controles (grupo a) y de ratas con LEM (grupos b y c) fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C en medio Krebs Ringer bicarbonato glucosa, en presencia de 150 pg/ml de estradiol y LHRH 50 ng/ml (grupo c). Al fin de la incubación se determinó la unión nuclear del (³H) estradiol mediante ensayo de intercambio. n: número de experimentos, cada uno llevado a cabo con 3 ratas.

translocación nuclear, concordantemente con la reducción de los receptores citoplasmáticos que muestran estos animales y que describimos en el Capítulo II. Estos valores no se modificaron por el agregado de LHRH.

DISCUSION

En este capítulo se confirma que las ratas con lesión en la eminencia media tienen menor capacidad para unir (^3H) estradiol en el citosol de la pituitaria anterior y un incremento pronunciado de los niveles de prolactina sérica. Nosotros postulamos que los cambios en la unión del estrógeno podrían deberse a: 1) pérdida de algún factor hipotalámico que normalmente mantenga el contenido de receptores estrogénicos, 2) a un efecto de los niveles elevados de prolactina circulante sobre la pituitaria anterior o 3) a algún otro factor desconocido.

De este modo, se llevaron a cabo experimentos para dilucidar estas posibilidades como así también para determinar si la menor capacidad de la glándula para unir estradiol podía restaurarse por tratamiento con un agonista de la dopamina, que está postulado como el factor inhibidor de la prolactina (107). El agonista usado fue bromocriptina, que inhibe la secreción de prolactina interactuando con receptores dopaminérgicos de alta afinidad de la pituitaria (108, 109).

En la primera serie de experimentos la pronunciada acción de bromocriptina para disminuir los niveles de prolactina en los animales lesionados fue también acompañada por un aumento de 2.6 veces de la unión del estradiol en la hipófisis anterior lo que sugería un efecto de prolactina en la regulación de los receptores para estradiol o bien una acción directa de bromocriptina sobre los receptores pituitarios.

Un segundo paso en los estudios llevó a comprobar el efecto que tenía bromocriptina sobre la unión del estradiol y los niveles de prolactina en ratas normales, o sea, sin lesión hipotalámica. El tratamiento no modificó los valores controles; la bromocriptina no fue capaz de aumentar significativamente el ya elevado número de receptores hipofisarios en ratas ovariectomizadas.

El tercer paso fue estudiar la unión de estradiol en pituitaria en otro modelo de rata hiperprolactinémica: animales con pituitarias transplantadas bajo la cápsula renal. La unión de estradiol por las pituitarias "in situ" de ratas transplantadas no fue afectada por la presencia del trasplante, lo cual descartaría a la prolactina como el principal factor que regularía los receptores estrogénicos. Las ratas que llevaban el trasplante estaban hiperprolactinémicas y esto se redujo notablemente luego del tratamiento con bromocriptina como ocurría con las ratas con lesión en la eminencia media. Es interesante hacer notar que los sitios de unión para estradiol en las pituitarias transplantadas fueron muy bajos y no se recuperaron con el tratamiento con bromocriptina en contraposición con el efecto de bromocriptina en animales con lesión en la eminencia media. Sin embargo, la droga llega hasta las células lactotropas, ya que se reducen los niveles de prolactina. La ineffectividad del agonista en recuperar los receptores en las pituitarias transplantadas a valores normales puede explicarse por otras diferencias: las ratas con lesión en la eminencia media tienen mayores niveles de prolactina sérica, una síntesis aumentada de prolactina y un re-

ducido nivel del resto de las hormonas hipofisarias. Las ratas con glándulas transplantadas tienen menor nivel de prolactina con respecto al modelo anterior, la síntesis de prolactina está disminuída y la hipofunción de la glándula es más severa (80, 94, 110-112).

Con respecto a la posibilidad que la dopamina estuviera actuando a través de otro factor, nuestros resultados demuestran que tanto el LHRH natural como su análogo sintético (Buserelín), no modificaron los receptores para estradiol en la pituitaria anterior de rata.

La falta total de efecto del LHRH sobre los receptores estrogénicos fue determinado mediante estudios y diseños diferentes: 1) tratamiento con LHRH "in vivo" en ratas castradas con y sin tratamiento estrogénico y en las que se estudió la unión del estrógeno en el citosol; 2) tratamiento con LHRH de ratas castradas con y sin lesión de la eminencia media y en las que se estudió la unión en el núcleo luego de la translocación efectuada por administración "in vivo" de estradiol; 3) animales tratados "in vivo" con LHRH y/o estradiol y en los que se determinó la unión del estradiol al receptor citosólico luego de la incubación de las hipófisis "in vitro"; 4) tratamiento "in vitro" con LHRH con y sin estradiol, determinándose la translocación nuclear "in vitro", en hipófisis de ratas castradas normales o con lesión de eminencia media.

Creemos que las evidencias experimentales son de suficiente peso para afirmar la falta de acción del LHRH sobre los receptores estrogénicos. Estos estudios no apoyan los trabajos de Muldon y col. (105), quienes ob-

servan que el LHRH es muy activo para influenciar tanto "in vivo" como "in vitro" la translocación del receptor estrogénico. No podemos aventurar hipótesis sobre esta discrepancia, y solamente mostrar que bajo nuestras condiciones experimentales, que fueron las más variadas posibles, el efecto no es demostrable. Las dosis de LHRH natural o sintético fueron biológicamente activas tal como lo demuestran el incremento del LH sérico de las ratas sometidas al tratamiento con el factor liberador.

La conclusión de estos estudios, sumando los resultados de este capítulo a los del capítulo anterior, es que cuando se impide la llegada de dopamina a la pituitaria a través del sistema porta, se presenta una reducción de la unión del estradiol, y paralelamente un incremento de los niveles de prolactina circulante. La terapia supletoria con el agonista dopaminérgico bromocriptina restaura ambas variables.

La posibilidad que sea la prolactina la causante de la reducción de los receptores estrogénicos, no se ve avalada por las siguientes conclusiones: a) en ratas hiperprolactinémicas por transplante de la hipófisis debajo de la cápsula renal, las hipófisis "in situ" de los mismos animales no presentan reducción del número de receptores estrogénicos; b) la prolactina "per se" en los casos que fue administrada y cuyos datos figuran en la literatura (67, 68, 113) nunca disminuyó sino que aumentó los receptores estrogénicos de otros órganos blanco, tales como la glándula mamaria y el hígado.

La demostración original del efecto de bromocriptina sobre los

receptores estrogénicos, se ha visto considerablemente reforzada por recientes publicaciones. Carrillo y col. (114) demostraron que la concentración de receptores estrogénicos anterohipofisarios desciende luego del tratamiento con α -metil-tirosina, al tiempo que aumenta la prolactina sérica, mientras que el tratamiento de estos animales con bromocriptina, desciende los niveles de prolactina, al tiempo que revierte la reducción de los receptores. En otro modelo estudiado por Carrillo y col., ratas con lesión hipotalámica producida por administración neonatal de monosodio glutamato, muestran valores disminuídos de receptores estrogénicos de la hipófisis que revierten por bromocriptina.

Esta conjunción de datos sugiere el control hipotalámico dopaminérgico de la población de receptores estrogénico de la hipófisis anterior.

C A P I T U L O I V

E F E C T O S D E L A D I A B E T E S S O B R E L A U N I O N D E L E S T R A D I O L

E N E L C I T O S O L D E L A P I T U I T A R I A A N T E R I O R E H I P O T A L A M O

INTRODUCCION

La diabetes mellitus está asociada con fallas reproductivas femeninas tanto en animales como en humanos. En ratas de experimentación la diabetes causa: 1) el cese o alargamiento del ciclo estral con prolongados períodos de diestro; 2) maduración sexual retardada en animales prepúberes; 3) menor número de óvulos liberados cuando ocurre la ovulación; 4) aumento de la reabsorción fetal; 5) deficiencias en la lactancia y 6) reducción importante de los pesos ováricos y uterinos (115 - 117, 120). Estos cambios se adjudicaron a problemas ováricos ya que en ratas con diabetes por aloxano, hay una menor respuesta de los ovarios a las gonadotrofinas administradas en forma exógena, aunque los niveles de gonadotrofinas endógenas parecen estar normales (118, 120). En realidad los pesos uterinos reducidos y el número de ovócitos de los diabéticos son consistentes con la esteroidogénesis ovárica y respuesta ovulatoria dificultada.

Otros trabajos consideran también como causante directo de los problemas reproductivos en la diabetes, a alteraciones en la regulación de la actividad ovárica por el sistema nervioso central y en la acción central de los esteroides. Denari y Rosner demostraron que en ratas diabéticas por aloxano existe una reducción en la captación de E_2 por el hipotálamo anterior y adenohipófisis luego de la interrupción del tratamiento insulínico, pero no en útero, vagina o músculo esquelético (119),

mientras que Gentry y col. (120) publicaron que en animales diabéticos existía disminución de la captación nuclear del estradiol en el SNC e hipófisis sin cambios en la captación por los tejidos totales.

En este capítulo confirmamos los cambios en la captación nuclear (120) y observamos además una disminución en la unión citosólica de E_2 en la pituitaria anterior de ratas con diabetes por estreptozotocina (STZ), pero no en el hipotálamo. Estos cambios en la unión del E_2 no son debidos a una reducción en la síntesis proteica.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar (180-200g) instaladas en una habitación con aire acondicionado, luz desde 7 00 a 19 00 horas diariamente, alimentadas con Purina y agua "ad libitum".

Todos los animales se ovariectomizaron por vía lumbar bajo anestesia con éter.

Inducción de la diabetes

Una semana después de la ovariectomía, las ratas fueron tratadas con 90 mg/kg de Estreptozotocina (Gentileza Dr. Houssay, Upjohn) i.v., preparada de acuerdo a Junod y col. (121).

Los animales fueron utilizados un mes después de la inducción de la diabetes, y en ese momento la glucosuria fue mayor al 2% y la glucemia mayor de 400 mg%.

Receptores

Ensayo del receptor citoplasmático para estradiol

Los detalles del método utilizado fueron especificados en el Capítulo II (122).

Captación nuclear de (³H) estradiol por la pituitaria anterior e hipotálamo

Se inyectaron animales bajo anestesia, con 10 uCi (³H)-E₂/150 g PC, por vía i.v.. A la hora fueron reanestesiados y perfundidos con 60 ml de 0.9% NaCl por vía intracardíaca (123). Se juntaron pituitarias anteriores e hipotálamos de 3 animales y se aislaron los núcleos según el método de McEwen y Zigmond (124). Los tejidos se homogeneizaron en un buffer 0.001 M KH₂PO₄, pH 6.5 conteniendo 0.003 M MgCl₂, 0.32 M sacarosa y 0.25% (v/v) Triton X 100. El homogenato se centrifugó durante 10 minutos a 850 x g a 0-4°C y se obtuvo un primer sobrenadante (SN1) y un pellet nuclear crudo. Este pellet se resuspendió en un buffer 0.001 M KH₂PO₄, pH 6.5 conteniendo 0.003 M MgCl₂, 0.32 M sacarosa (sin Triton) y se lavó dos veces centrifugando a 850 x g durante 10 minutos cada vez y descartando los sobrenadantes. Los núcleos purificados se resuspendieron en 0.2 ml de la solución 0.32 M sacarosa, sin Triton, y se mezclaron con 1.05 ml de un buffer 0.001 M KH₂PO₄, pH 6.5 que contenía 2.39 M de sacarosa, 0.001 M MgCl₂ para dar una concentración final de sacarosa 2 M. Esta mezcla se centrifugó a 0-4°C y 12 000 r.p.m. durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y se obtuvo un pellet nuclear purificado. Este pellet fue extraído con 0.4 M KCl a 0-4°C y luego de centrifugar, la radioactividad residual retenida en los núcleos fue extraída con etanol (125). Se determinó la radioactividad presente en el primer sobrenadante SN1 (citoplasma), en el extracto de KCl y en el extracto etanó-

lico, expresando los resultados como fmoles (^3H)- E_2 en la fracción/mg de proteína.

Incorporación de ^{14}C -aminoácidos a proteínas hipofisarias

Cada pituitaria se preincubó durante 15 minutos a 37°C en 1 ml de buffer Krebs-Ringer bicarbonato glucosa (KRBG). Se descartó el medio y se agregó 1 ml del mismo buffer más 4×10^5 c.p.m. de una mezcla de ^{14}C -aminoácidos (New England Nuclear).

Se incubaron las glándulas durante 120 minutos a 37°C bajo atmósfera de carbógeno (95% O_2 -5% CO_2) en un incubador metabólico Dubnoff. Finalizado el tiempo de incubación se lavaron las pituitarias con 1 ml de KRBG y se purificaron las proteínas. Se homogeneizó cada pituitaria en 0.5 ml de 10% ácido tricloroacético (TCA) y se dejó en frío durante la noche; a la mañana siguiente se descartó el sobrenadante. Se agregó 0.5 ml de 5% TCA y se calentó durante 30 minutos a 90°C , descartando el sobrenadante. El precipitado se disolvió en 0.5 ml de etanol-éter (1:1, v/v) y se calentó a 40°C durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Después de lavar el precipitado con 0.5 ml de éter, se disolvió en 0.2 ml de NaOH 1N y se tomó 20 μl para determinar proteínas según el método de Lowry (83). El volumen restante se pasó a un vial de conteo y se determinó la radioactividad. Los resultados se expresaron como c.p.m. incorporados/mg proteína.

Análisis estadísticos

Los datos se expresaron como su media y error estandar. Para comparar resultados para diferencias grupales se empleó el test de "t" de Student. Los datos se obtuvieron de una computadora Hewlett Packard modelo 9815A.

RESULTADOS

La Figura 4-1 muestra los resultados del ensayo de unión del $(^3\text{H})\text{-E}_2$ en citosol de la hipófisis anterior y el hipotálamo. Ocho ensayos fueron llevados a cabo para la pituitaria y seis para el hipotálamo, los que demostraron que el grupo diabético unió menos $(^3\text{H})\text{-E}_2$ ($p < 0.05$) en el citosol de pituitaria que las ratas controles, mientras que no hubo cambios en la unión en el hipotálamo. Esta reducción de la unión no fue debida al efecto deletéreo y poco específico de la diabetes sobre la síntesis proteica de la pituitaria, ya que la incorporación de una mezcla de aminoácidos marcados con ^{14}C a las proteínas totales de la hipófisis fueron similares en los grupos controles y diabéticos (Figura 4-1).

Se estudió también la captación del $(^3\text{H})\text{-E}_2$ "in vivo". Los datos de la Tabla 4-1 muestran la cantidad de E_2 que quedó remanente en el citoplasma luego de la precipitación nuclear, además de la radioactividad incorporada en las dos fracciones nucleares (salina y etanólica). La radioactividad nuclear extraíble con 0.4 M KCl, que representa al $(^3\text{H})\text{-E}_2$ unido a macromoléculas (125) se vió marcadamente disminuída en el grupo diabético. El material extraíble con etanol, que posiblemente represente la hormona unida a cromatina (126), disminuyó levemente, mientras que la reducción en las mismas fracciones pero de hipotálamo sufrió también una pequeña disminución. Las ratas diabéticas también mostraron

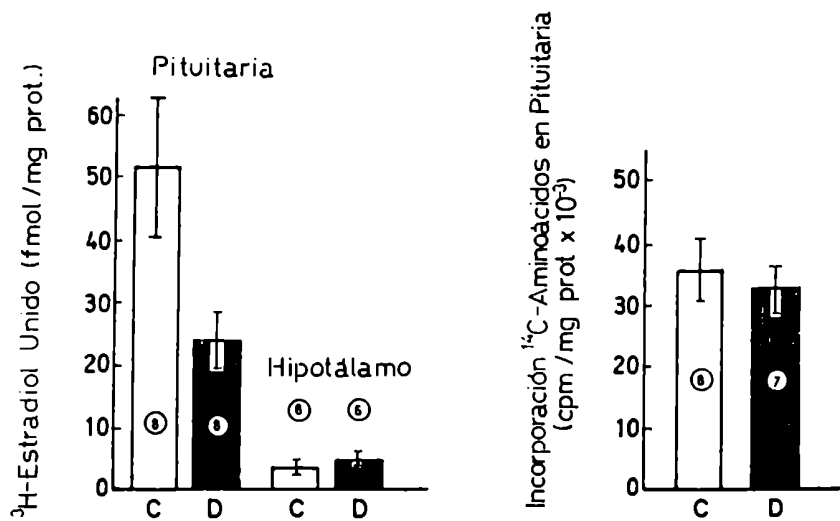


Figura 4-1. (a) Unión del (³H)-E₂ en el citosol de la pituitaria anterior y el hipotálamo en ratas controles (C) y diabéticas (D). Los números en círculos representan el número de experimentos. (b) Incorporación de ¹⁴C-aminoácidos a proteínas totales de pituitaria de ratas controles (C) y diabéticas (D).

*p < 0.05 vs. ratas controles.

Tabla 4-1. Captación del (³H) estradiol por los núcleos y citoplasma de la pituitaria anterior e hipotálamo de ratas controles y diabéticas.

<u>Fracción</u>	<u>Pituitaria</u>		<u>Hipotálamo</u>	
	(fmol/mg prot.)		(fmol/mg prot.)	
	<u>Control</u>	<u>Diabético</u>	<u>Control</u>	<u>Diabético</u>
Citoplasmática	4.7	3.5	2.1	1.3
Nuclear: KCl extraíble	26.9	5.3	18.1	15.4
Nuclear: etanol extraíble	64.0	55.8	39.1	22.3

menos radioactividad en la fracción citoplasmática de la pituitaria anterior (Tabla 4-1). Estos resultados sugieren que los receptores del E_2 estaban disminuídos tanto en las fracciones nucleares como en el citoplasma de las hipófisis de ratas diabéticas.

DISCUSION

Estas demostraciones apoyan los trabajos de Gentry y col. (120), sobre la reducción de la captación del (^3H)- E_2 en la pituitaria de ratas diabéticas, pero encontramos además en esta glándula un receptor citosólico defectuoso en número y probablemente en su translocación del citoplasma al núcleo.

El trastorno de la unión del estradiol en la pituitaria puede ser responsable de las anormalidades de la función reproductiva descritas en la diabetes mellitus (115 - 118), ya que se sabe que la acción del estradiol es necesaria para obtener respuesta de las células gonadotropas al LHRH (127). Dentro de esta línea, Kirchick y col (128) demostraron que en ratas diabéticas el pico preovulatorio de LH se pierde, presumiblemente debido a una menor sensibilidad del hipotálamo y de la pituitaria anterior al E_2 . Esto a su vez explicaría la anovulación de las ratas hembras diabéticas.

Aunque existan pocos trabajos que discutan la regulación de la interacción del complejo E_2 -receptor a nivel de la pituitaria, esta relación puede estar modulada por el hipotálamo. Esta conclusión se basa en lo demostrado en el Capítulo II en ratas con lesión en la eminencia media, las que presentaron reducción de la unión del estradiol en la pituitaria anterior. Esto sugiere que los animales diabéticos tienen algo en común con los lesionados en la eminencia media, y es posible que un trastorno

hipotalámico esté detrás de los cambios en los receptores de la hipófisis observados en el presente capítulo. Sin embargo, otros factores patogénicos no pueden excluirse, ya que los cambios en la diabetes no se reducen al estradiol sino que también existe una disminución en la unión y en la respuesta a los andrógenos y a los corticosteroides en el cerebro y la pituitaria anterior de animales diabéticos (119, 123, 129, 130).

C A P I T U L O V

CAMBIOS EN LA TRANSLOCACION NUCLEAR DEL COMPLEJO (^3H)- E_2

RECEPTOR EN LA PITUITARIA ANTERIOR DE RATAS DIABETICAS

INTRODUCCION

Como se explicó en el Capítulo IV, la diabetes crónica conduce a una severa falla reproductiva en animales hembras. Aunque existen discrepancias acerca del origen de esta falla, creemos que en parte puede adjudicarse a una alteración del eje sistema nervioso central-hipófisis. Esta sugerencia se ve apoyada por la respuesta anormal al LHRH de la pituitaria, la falta del pico preovulatorio de LH y la anovulación de las ratas diabéticas (128, 131). También los datos del efecto de esteroides sexuales sobre estructuras nerviosas atestiguan la disfunción del eje hipotálamo-hipófisis: la captación por tejido total y la unión en citosol y núcleos de las hormonas sexuales, están disminuídas en la pituitaria e hipotálamo de animales diabéticos(119,120,132).También las alteraciones primarias en los órganos reproductivos pueden ser las causas que produzcan los trastornos que se presentan en la diabetes, aunque no todos los autores que han trabajado en este tema están de acuerdo (133 - 135).

En este capítulo se presentan resultados sobre la translocación "in vivo" del complejo E_2 -receptor desde el citosol al núcleo en ratas controles y diabéticas. Se demuestra que la translocación en la pituitaria está reducida en ratas diabéticas ovariectomizadas tratadas con una dosis baja de E_2 y este cambio se acompaña de una disminución de la respuesta biológica al E_2 , expresada en la reducida inducción de

receptores progestacionales y la pobre respuesta prolactínica sérica.

Con una dosis elevada de estradiol la translocación en las pituitarias diabéticas se normaliza, como así también la respuesta biológica hipofisaria al E_2 . En el útero de ratas diabéticas, tanto la dosis alta como la baja de E_2 resultan en menor translocación del complejo hormona-receptor al núcleo. Finalmente, se discuten las posibles razones por las que se obtuvieron respuestas diferentes en el útero y la pituitaria de ratas con diabetes experimental.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar (180-200g) mantenidas en una habitación con aire acondicionado, luz desde 7 00 a 19 00 horas diariamente, alimentadas con Purina y agua "ad libitum".

Todos los animales se ovariectomizaron por vía lumbar bajo anestesia con éter.

Inducción de la diabetes

Una semana después de la ovariectomía, las ratas fueron tratadas con 65 mg/kg de Estreptozotocina (STZ, gentileza del Dr. David Zambrano de Laboratorios Upjohn) i.v.(129).

Los animales fueron utilizados un mes después de la inducción de la diabetes y en ese momento la glucosuria era mayor al 2% y la glucemia era de 488 ± 14 mg/dl (n=10).

Inducción del receptor progestacional

La inducción de receptores progestacionales se realizó por tratamiento de los animales con inyecciones diarias s.c. de 0.5 o 25 ug/100 g peso corporal (PC) de benzoato de E₂ en aceite vegetal (Gentileza del Dr. Montuori, Laboratorio Gador) durante 3 días más una cuarta inyec-

ción i.p. 60 minutos antes del sacrificio de E₂ en 30:70 v/v etanol-salina. El mismo esquema de tratamiento fue empleado para estudiar el intercambio nuclear de E₂ por los núcleos uterinos.

Recolección de sangre

Se tomaron las muestras por recolección de la sangre troncal luego de la decapitación.

Receptores

Ensayo de intercambio nuclear para estradiol en la pituitaria anterior

Para los ensayos de intercambio nuclear en la pituitaria los animales se inyectaron i.p. 60 minutos antes del sacrificio con 0.5 o 25 ug/100 g PC de E₂ en 30:70 v/v etanol-salina y luego se procedió según se detalló en el Capítulo II.

Ensayo de receptor citosólico progestacional en la pituitaria anterior

Las pituitarias anteriores de 3 ratas controles o diabéticas se agruparon y homogeneizaron en un buffer 0.010 M Tris-HCl que contenía 0.0015 M EDTA, 0.002 M mercaptoetanol y 10% glicerol, pH 7.4. El homogenato se centrifugó a 105 000 x g durante 60 minutos a 0-4°C y alícuotas del citosol (0.2 ml) obtenido de esa manera, se incubaron con una concentración saturante de (³H)-R 5020 (6 nM, 17 α ,21-dimetil-19-nor-pregna-4,9-diene-3,20-diona, promegestona, act. esp. 87 Ci/mmol

New England Nuclear), con incubaciones paralelas que contenían 6 μM del progestacional no radioactivo. La incubación se realizó a $0-4^{\circ}\text{C}$ durante 20 horas, tiempo necesario para llevar la reacción al equilibrio (136). Las hormonas libre y unida se separaron en minicolumnas de Sephadex LH-20. Los resultados de unión específica se expresaron como fmoles (^3H) R 5020/mg proteína. Las proteínas se determinaron de acuerdo al método de Lowry y col. (83).

Ensayo de intercambio nuclear para estradiol en el útero

Se utilizó una modificación de un método previamente empleado para determinar receptores nucleares para E_2 en células humanas endometriales en cultivo (137). El útero fue homogeneizado en un buffer 0.010 M Tris-HCl, pH 7.4, que contenía 0.003 M MgCl_2 y 0.33 M sacarosa. Se centrifugó a 800 x g durante 10 minutos y se obtuvo un pellet nuclear crudo. El pellet fue suspendido en el mismo buffer pero conteniendo 2.2 M sacarosa y se obtuvieron los núcleos purificados por ultracentrifugación a 40 000 x g durante 60 minutos. Estos núcleos se lavaron en el buffer de homogeneización que contenía además 1% Tritón X 100 y luego se centrifugaron a 800 x g durante 10 minutos y finalmente fueron resuspendidos en 0.010 M Tris-HCl que contenía 0.0015 M EDTA más 40 nM (^3H)- E_2 (2,4,6,7 ^3H - E_2 , act. esp. 98 Ci/mmol, New England Nuclear) con o sin el agregado de un exceso 1000 veces mayor de hormona fría. La incubación de intercambio se realizó a 37°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales los núcleos se lavaron tres veces con el buffer Tris-EDTA y la radioactividad fue

finalmente extraída con etanol (137). Los resultados de unión específica se expresaron como pmoles (^3H)- E_2 unidos/ mg ADN.

Determinación de los niveles séricos de hormonas

Se tomaron muestras sanguíneas y se mantuvieron a 4°C hasta total retracción del coágulo. El suero se separó por centrifugación durante 30 minutos a $0-4^\circ\text{C}$ y se guardó luego a -20°C hasta la determinación de prolactina o E_2 por radioinmunoensayo.

Los niveles de E_2 sérico fueron determinados por el método de Korenman y col. (138), empleándose el antisuero N° 244 anti- E_2 -6-BSA (gentileza del Dr. Gordon D. Niswender, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, EE.UU.) en una dilución de 1/51 000; los resultados de esta determinación se expresaron como pg/ml.

La prolactina sérica fue determinada mediante el juego de reactivos provistos por el NIAMDD, N.I.H., Maryland, E.E.U.U. y se expresaron los resultados en términos del estándar RP-2, como ng/ml. (139).

Análisis estadísticos

Los datos se expresaron como su media y error estandar. Para comparar resultados para diferencias grupales se empleó el test de "t" de Student. Los datos se obtuvieron de una computadora Hewlett Packard modelo 9815A.

RESULTADOS

La Figura 5-1 muestra los resultados del ensayo de intercambio de la unión del (^3H)- E_2 en núcleos de la pituitaria anterior. Una mayor proporción de receptores fue translocada por la dosis mayor de E_2 (25 ug/100 g PC) que por la menor (0.5 ug/100 g PC). La diferencia de translocación de acuerdo a la dosis fue más marcada en las ratas diabéticas ovariectomizadas (3.9 veces mayor) que en las ratas controles (1.3 veces). Lo más importante de este ensayo, fue la observación que la unión nuclear del (^3H)- E_2 estaba reducida en ratas diabéticas con respecto a controles ($p < 0.02$) cuando la translocación se efectuó con la dosis de 0.5 ug/100 g PC. Por el contrario, con la dosis de 25 ug/100 g PC, la unión fue comparable en los extractos nucleares de ratas controles y diabéticas.

En vista de estos resultados, se juzgó importante comparar las respuestas biológicas al estradiol en ratas controles y diabéticas sometidas al mismo régimen de tratamiento que en los ensayos de unión, pero con la salvedad que el tiempo de tratamiento fue extendido a 4 días. La Figura 5-2 muestra que la unión del progestacional sintético (^3H)-R 5020 por el citosol de hipófisis provenientes de ratas diabéticas estaba reducido con respecto al normal ($p < 0.05$) siempre con la dosis de E_2 de 0.5 ug/100 g PC, mientras que la inducción de receptores progestacionales inducida por la dosis de 25 ug fue del mismo tenor en ambos grupos

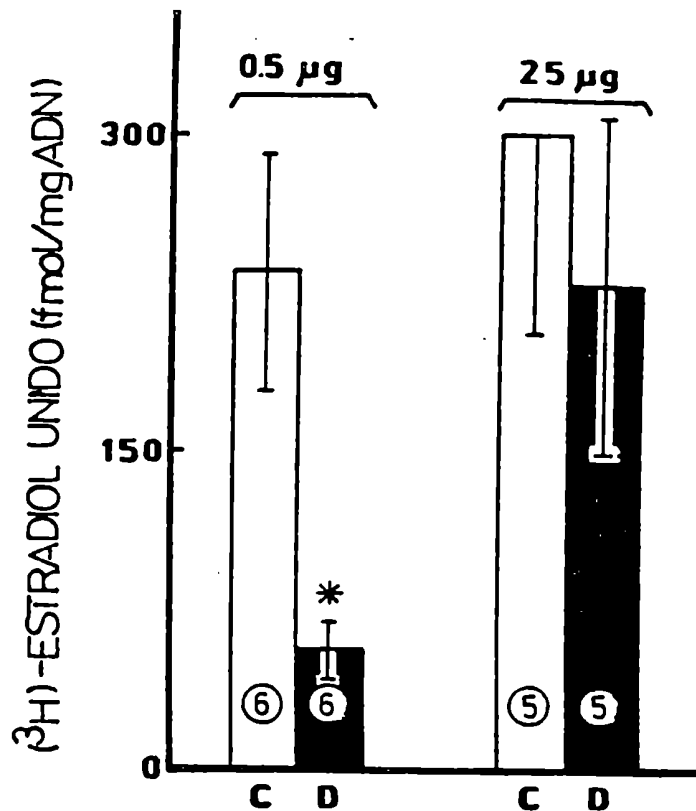


Figura 5 -1. Ensayo de intercambio para el (³H) estradiol en la pituitaria anterior de ratas controles (C) y diabéticas (D). Ratas ovariectomizadas C y D fueron tratadas con 0.5 o 25 µg E₂/100 g i.p. una hora antes del sacrificio. Los receptores translocados al núcleo fueron extraídos con 0.4 M KCl y determinados por ensayo de intercambio. Cada valor de las columnas representa la media [±] error estándar del número de ensayos especificados dentro de las columnas, cada uno llevado a cabo con tres ratas C o tres ratas D.

* p < 0.02 vs. ratas C tratadas con 0.5 µg E₂/100 g.

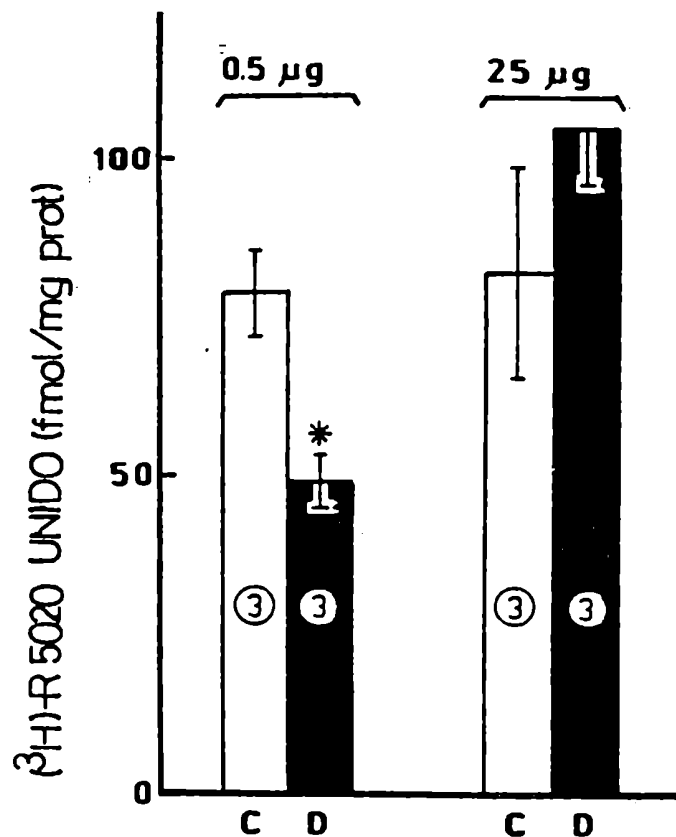


Figura 5-2. Ensayo del receptor de progesterona en el citosol de la pituitaria anterior de ratas controles (C) y diabéticas (D). Los receptores progestacionales fueron inducidos por tratamiento con 0.5 o 25 ug E₂/100 g s.c. en aceite diariamente durante 4 días. El citosol de la pituitaria fue incubado con 6 nM de (³H)-R 5020 durante 20 hs. a 0-4°C.

Los resultados de unión específica representan la media \pm error estándar del número de ensayos representados dentro de las columnas, cada uno llevado a cabo con tres ratas C o tres ratas D.

*p < 0.05 vs. ratas C tratadas con 0.5 ug E₂/100 g.

de animales. Un perfil similar fue obtenido al determinarse la prolactina sérica, o sea, la dosis baja de E_2 produjo valores séricos de prolactina mayores en controles que en diabéticos ($p < 0.05$), mientras que no existieron diferencias si la dosis de E_2 administrada "in vivo" se incrementaba a 25 ug/100 g PC durante 4 días.

Como los parámetros medidos (translocación nuclear del complejo E_2 -receptor, inducción de receptores progestacionales y respuesta prolactínica al E_2) dependen de la cantidad de E_2 que logra alcanzar la pituitaria, fue necesario investigar si las concentraciones séricas de E_2 logradas luego de tratar ratas controles y diabéticas con E_2 exógeno eran o no similares. La Figura 5-3 muestra que efectivamente estas concentraciones estaban en el mismo orden. Asimismo los niveles de E_2 sérico alcanzados en ambos grupos de animales con la dosis de 25 ug/100 g PC estaban sustancialmente aumentados (10 veces) con respecto a aquellos logrados con la dosis de 0.5 ug E_2 /100 g.

Finalmente, para estudiar si los cambios encontrados en la pituitaria se extendían a otros órganos blanco para el E_2 o eran exclusivos de esta glándula, el ensayo de intercambio nuclear del (3H)- E_2 fue empleado en el útero de ratas controles y diabéticas sometidas al esquema de tratamiento estrogénico durante 4 días.

La Figura 5-4 muestra que las ratas hiperglucémicas tratadas ya sea con la dosis menor (0.5 ug) o mayor (0.25 ug) de E_2 constantemente

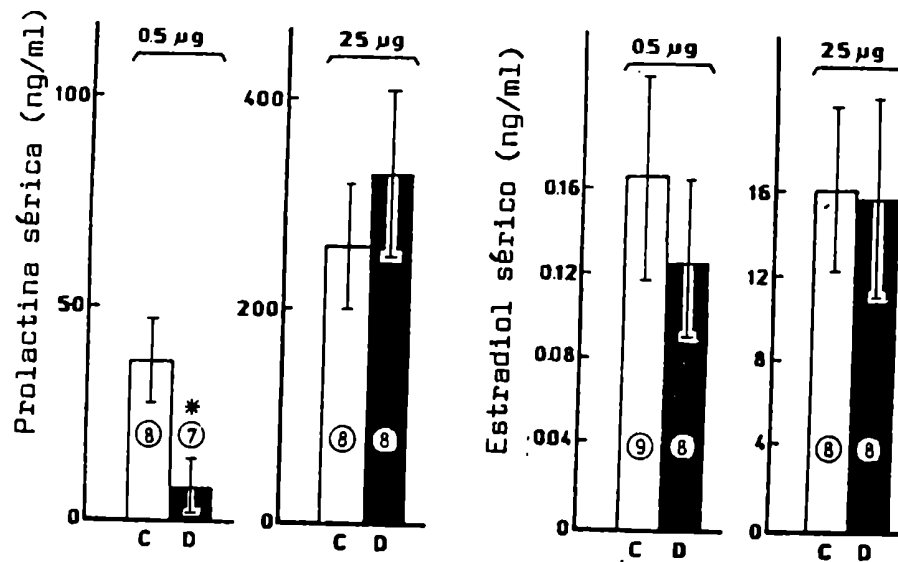


Figura 5 -3. Prolactina y estradiol séricos en ratas controles (C) y diabéticas (D) tratadas con 0.5 o 25 ug E₂/100 g s.c. en aceite diariamente durante 4 días.

Los resultados representan la media [†] error estandar del número de animales representados dentro de las columnas.

*p < 0.05 vs. ratas C tratadas con 0.5 ug E₂/100 g.

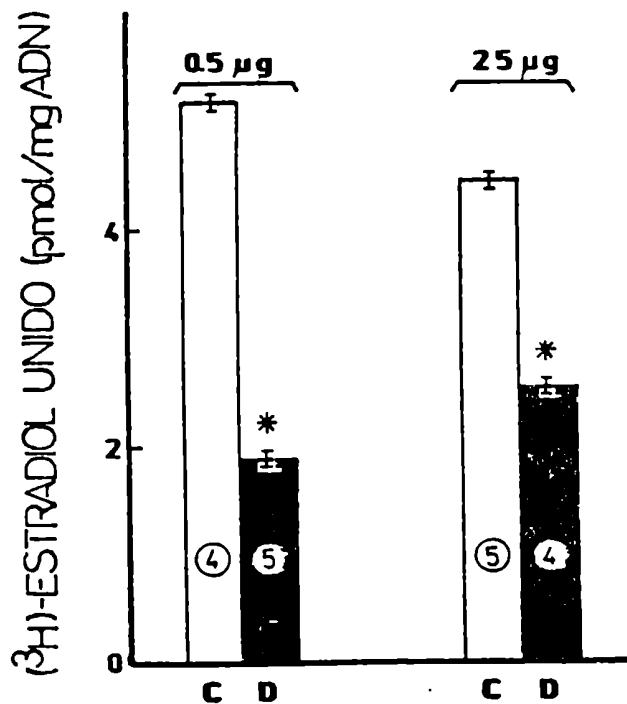


Figura 5-4. Ensayo de intercambio nuclear del (³H) estradiol en el útero de ratas controles (C) y diabéticas (D).

Ratas ovariectomizadas fueron tratadas con 0.5 o 25 ug E₂/100 g s.c. diariamente durante 4 días. Los receptores translocados fueron determinados en los núcleos por ensayo de intercambio.

Cada valor es la media [†] error estandar del número de animales representados dentro de las columnas.

*p < 0.005 vs. ratas controles (C) tratadas con 0.5 ug E₂/100 g.

*p < 0.01 vs. ratas controles (C) tratadas con 25 ug E₂/100 g.

mostraban una significativa reducción en la unión del (^3H)- E_2 por los núcleos uterinos. La respuesta biológica al E_2 del útero también fue anormal: con la dosis mayor de E_2 , el peso uterino de ratas controles fue de 197.8 ± 20.3 mg/100 g (n=5), mientras que las ratas diabéticas presentaron una significativa reducción: 141.8 ± 13 (n=5, $p < 0.05$).

DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo extendieron los resultados expuestos en el Capítulo IV, sobre la actividad del receptor estrogénico pituitario de animales diabéticos. En el capítulo anterior se había demostrado que la unión del E_2 por el citosol estaba reducida en ratas ovariectomizadas hiperglucémicas y ahora se extienden los cambios a la translocación nuclear luego del tratamiento "in vivo" con E_2 . Esta reducida unión nuclear del E_2 de las ratas diabéticas sometidas a tratamiento con la dosis menor del E_2 (0.5 ug/100 g) fue probablemente responsable de la reducción de la expresión biológica del E_2 a nivel hipofisario, que se manifestaba en la disminución de la inducción del receptor citosólico progestacional y de la respuesta proláctínica, eventos ambos que se sabe son modulados por el E_2 (140, 141).

Sin embargo y a pesar de estos resultados, la observación que la translocación nuclear del E_2 , la inducción del receptor progestacional en la pituitaria y la prolactina sérica se normalizaron en ratas diabéticas tratadas con la dosis alta de E_2 (25 ug/100 g), sugiere que una vez que los receptores de estradiol alcanzan en cierta concentración sus sitios nucleares, la expresión biológica de la hormona no se ve afectada por la diabetes experimental. Claramente, la diferente respuesta al E_2 de acuerdo a la dosis que mostraron los animales diabéticos, no se correlaciona con la concentración de E_2 sérico, ya que

este parámetro no fue diferente en ambos grupos de animales. A juzgar por el E₂ sérico, los valores obtenidos con la dosis de 25 ug/100 g (16.1 ± 3.9 ng/ml en controles y 15.7 ± 4.6 ng/ml en diabéticos) estaban dentro de un rango farmacológico. Contrariamente, los valores alcanzados luego de la dosis menor de E₂ de 0.5 ug/100 g (165 ± 51 pg/ml en controles y 126.2 ± 34 pg/ml en diabéticos) estaban más cercanos a aquellos presentes en ratas hembras normales de nuestro bioterio durante el proestro: 101.5 ± 18 pg/ml). Estos resultados sugieren, por lo tanto, que los valores producidos con la dosis de 0.5 ug E₂ estarían más cercanos a los prevalentes "in vivo" en circunstancias fisiológicas. Por supuesto que esto a su vez depende de que las ratas diabéticas mantengan normales sus niveles de E₂ séricos. En la literatura se ha manifestado que el E₂ sérico de las ratas diabéticas está en el rango de ratas controles (118), tratándose de animales con ovarios "in situ".

El útero presenta un cuadro diferente al de la hipófisis. En el útero, el E₂ no translocó la misma cantidad de receptores a los núcleos en las ratas diabéticas que en controles. Este resultado, agregado a la reducción en la actividad biológica del E₂, determinada por el aumento del peso uterino, indica que los eventos intracelulares bajo control estrogénico del útero estaban más alterados que los de la hipófisis en el estado diabético crónico de nuestros animales.

Varias interpretaciones parecen posibles para explicar la diferente respuesta del útero y la pituitaria a la diabetes experimental.

1) la pituitaria contiene una única población de receptores (82 , 102), el útero contiene dos sitios de unión en el citosol y dos en el núcleo (137) para el estradiol aunque se desconoce si todos o parte de estos sitios están afectados en la diabetes; 2) en ratas normales tanto la retención de estrógenos como el control estrogénico de los receptores de E_2 es diferente en la pituitaria y el útero (58 , 142), situación que podría aplicarse a las ratas con diabetes crónica; 3) la etiopatología de las alteraciones del útero y la pituitaria en la diabetes puede ser diferente; mientras que en el útero podría existir una perturbación de la acción directa del E_2 , como se ha descrito a nivel del epitelio (133), los cambios de la pituitaria podrían ser secundarios a una disfunción hipotalámica. Esta última posibilidad recibe apoyo del trabajo de Bestetti y Rossi (143), autores que demostraron degeneración de neuronas y axones en el núcleo arcuato y la eminencia media de ratas con diabetes por estreptozotocina, y también del trabajo de Denari y Rosner (119), quienes encontraron la reducción de la captación del E_2 por el hipotálamo de ratas con diabetes aloxánica. Un trastorno hipotalámico resulta relevante para explicar nuestros resultados, ya que la concentración pituitaria de receptores de E_2 está controlada por el hipotálamo, según nuestras demostraciones (122).

Nuestros resultados de una deficiencia de la translocación nuclear pituitaria para el E_2 corroboran los resultados de Gentry y col. (120), y nosotros demostramos además en este trabajo que la unión de

$(^3\text{H})\text{-E}_2$ por los núcleos de la pituitaria depende de la dosis de E_2 administrada. Nuestros resultados con el útero no están de acuerdo a De Hertogh y col. (134), quienes describieron en ratas con diabetes de muy larga duración (3-8 meses), la normal translocación de los receptores de E_2 . Sin embargo, los mismos autores también publicaron que el grupo diabético presentó trastornos de la translocación uterina si el E_2 se administraba por vía intraperitoneal en vez de intravenosa (135). Por lo tanto creemos que la respuesta uterina al E_2 en diabetes es sumamente compleja y la correcta evaluación de la población heterogénea de receptores de E_2 presentes en el útero (tipos I y II en núcleos y citosol) debería ser determinada antes de concluir en forma definitiva sobre las alteraciones en este tejido. Futuros estudios de los receptores de esteroides en ratas diabéticas tendrían también que determinar si existe un origen común entre las deficiencias del receptor de E_2 y las reducciones observadas en los receptores de glucocorticoides (144) y de andrógenos (145) que ocurren en animales con esta patología.

En conclusión, nuestros resultados con la pituitaria sugieren que en la diabetes existe una perturbación en el eje cerebro-hipófisis, aunque debe considerarse también un origen perisférico de acuerdo a los resultados obtenidos con el útero. Probablemente ambos son importantes para explicar la falla reproductiva de los animales diabéticos hembras.

C A P I T U L O VI

EFFECTOS HORMONALES SOBRE LOS RECEPTORES ESTROGENICOS

LIBRES EN NUCLEOS CELULARES DE LA PITUITARIA ANTERIOR

INTRODUCCION

En los capítulos anteriores se estudió el modo de acción de los receptores para estradiol en la pituitaria basándonos en el modelo clásico del efecto de las hormonas sobre las células blanco. Este modelo establece que la hormona interactúa primero con un receptor citosólico, con el cual forma un complejo que una vez transformado entra al núcleo y se une al ADN (21). Sin embargo este modelo de "los dos pasos" puede no ser la respuesta completa a la acción del estradiol en sus órganos blanco; en realidad un número de publicaciones mostraron que existen receptores nucleares libres para estradiol. Jungblut y col. (146) describieron la presencia de receptores para estradiol en núcleo de células de útero de cerdos adrenalectomizados y ovariectomizados o sea libres de hormona, y postularon la necesidad de una reevaluación de la relación entre el esteroide y el receptor, en la cual el punto importante estaría en el receptor más que en la hormona. Según estos autores la función del receptor no sería transportar la hormona a un sitio de acción en el núcleo, sino que sería función del esteroide actuar como un "catalizador físico" sobre la proteína transcripcional-regulatoria, aumentando su "nucleotropía" y estabilizando su forma activa.

Levy y col. (147) describieron también la presencia de receptores libres nucleares en endometrio humano normal y sugirieron la posibilidad que la distribución de los receptores estrogénicos entre núcleo y

citosol, en ausencia de la hormona, pueda depender del tipo de célula, especie animal o condiciones fisiológicas.

En el sistema nervioso central, se describió la presencia de receptores nucleares libres en hipotálamo(106,148) y que además estos receptores, al igual que los descritos en pituitaria, poseían propiedades características del clásico receptor nuclear de estradiol tipo I en cuanto a su afinidad, cinética de asociación y disociación, especificidad y sedimentación en gradientes de sacarosa de alta fuerza iónica (106).

Datos recientes sobre la distribución subcelular del receptor de estradiol proponen que éstos están localizados predominantemente en el núcleo. Los estudios inmunocitoquímicos (63) indicaron que el receptor estrogénico podría residir originalmente en los núcleos de células blanco de tejidos sensibles a estrógenos y de tumores, ambos en presencia o ausencia de esteroide. Según los autores, el receptor recuperado en la fracción citosólica de un homogenato, representaría receptor pobremente asociado con el núcleo y al unirse el receptor al estradiol, lleva a una asociación más estrecha. Esta misma idea es compartida por Welshons y col. (64), quienes encontraron que en las células GH₃ derivadas de un tumor hipofisario de rata hay una localización nuclear de los receptores para estradiol.

Aunque el papel de los receptores libres en el núcleo es aún desconocida, Garola y McGuire (149) sugirieron que en glándula mamaria los sitios libres nucleares podrían estimular la actividad genómica en

ausencia de hormona unida. En la pituitaria anterior y el hipotálamo (106 , 148) los sitios nucleares libres aumentan después del tratamiento estrogénico, lo cual sugiere su participación en la acción hormonal.

En este capítulo nosotros examinamos la presencia de sitios libres nucleares en la pituitaria anterior de ratas castradas y ovariectomizadas. Analizamos su respuesta frente a distintos tratamientos estrogénicos, administración de antiestrógenos, progesterona, andrógenos y corticoides y también en situaciones en las cuales habíamos demostrado una reducción en los receptores citosólicos o totales para estradiol como diabetes (150) y lesión en eminencia media (122). Finalmente se analizó la afinidad de los sitios libres nucleares por el ADN-celulosa en animales no tratados y ratas sujetas a tratamientos estrogénicos, considerando que la retención del ADN-celulosa puede tomarse como ejemplo de la unión nuclear "in vivo".

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar (180-200 g) ovariectomizadas por vía lumbar bajo anestesia con éter.

Los animales se adrenalectomizaron 2-5 días antes del sacrificio, durante este período se los mantuvo con Purina y con 0.9% NaCl como fluido de bebida "ad libitum". Las ratas se sacrificaron por decapitación. En varios experimentos se recogió sangre troncal y se utilizó el suero para determinaciones de prolactina (PRL) por radioinmunoensayo (Capítulo II).

Tratamientos hormonales

El tratamiento estrogénico se dio en una de las tres formas que se detallan a continuación: 1) E₂ agudo: los animales recibieron una única inyección i.p. de 5 ug/kg peso corporal (PC) de E₂ en 30:70 v/v etanol-salina 60 minutos antes del sacrificio; 2) tratamiento E₂-4 días: los animales recibieron una inyección diaria s.c. de 5 ug/kg PC de E₂ en aceite durante 3 días más una inyección de E₂ aguda según se describió en el punto 1); 3) estrógeno prolongado: las ratas recibieron un pellet de 15 mg de dietiletibestrol (DES) bajo la piel del cuello una vez por mes durante tres meses. (el estradiol inyectado que correspondía a benzoato de E₂ en aceite vegetal y los pellets de DES

fueron gentileza del Dr. Montuori, Laboratorios Gador).

El tratamiento estrogénico se dió a un grupo de animales simultáneamente o no con el tratamiento E_2 -4 días. El antiestrógeno utilizado fue tamoxifen (TAM) (Gentileza del Dr. Montuori, Laboratorios Gador), el cual se disolvió en agua destilada y se inyectó i.p. en la dosis de 1 mg/kg PC durante 3 días, con una última inyección el cuarto día 1 hora antes del sacrificio.

El tratamiento con el resto de los esteroides fue el siguiente: dexametasona (hemisulfato sódico, Schering Argentina) se disolvió en el agua de bebida en una concentración de 10 ug/ml y ofrecida "ad libitum" durante 4 días (151); progesterona (2.5 mg/rata, Sigma Chemical Co.) y testosterona (1 mg/rata, Sigma Chemical Co.) fueron administradas s.c. en aceite en dosis diarias durante 4 días (151). Estas hormonas fueron administradas solas y simultáneamente con el tratamiento E_2 -4 días. Los animales se sacrificaron 60 minutos después de la última inyección.

La diabetes fue inducida en un grupo de animales por administración de 65 mg/kg PC de estreptozotocina (STZ), como ya ha sido descrito (132, 150). Un mes después de inducida la diabetes las ratas mostraban niveles de glucosa en sangre 400 mg%.

La lesión en la eminencia media se realizó en ratas castradas según se describió en el Capítulo II. Cinco días después de lesionados, los ani-

males fueron utilizados para ensayos de determinación de receptores.

Receptores

Determinación de receptores libres nucleares para estradiol

Para determinar los receptores libres nucleares para estradiol se adaptó el método de Roy y McEwen (102) que se describió en el Capítulo III: "Ensayo de intercambio nuclear para estradiol". Cuando se determinó los receptores libres nucleares se incubó durante 1.5 horas a 0-4°C, mientras que para determinar sitios totales la incubación fue durante 5 horas a 25°C.

Ensayo del receptor citosólico progestacional en la pituitaria anterior

Los detalles del método utilizado fueron descritos en el Capítulo V.

Unión a ADN-celulosa

Los receptores extraídos con 0.4 M KCl de núcleos de pituitarias de animales sujetos o no a tratamientos estrogénicos, fueron dializados durante 20 horas a 4°C contra 100 volúmenes de buffer TDB (0.01 M Tris-HCl, pH 7.6 conteniendo 0.001 M DTT y 0.0005 M bacitracina) para remover el KCl. Alícuotas del extracto dializado fueron incubadas con 2.5 nM (³H)-E₂ durante 1.5 horas a 0-4°C; después de este período se

separó la hormona libre de la unida con 1% carbón (Norit A, Amend, N.Y.)- 0.1% dextran (Dextran T-70, Pharmacia, Piscataway, N.J.). El sobrenadante de la centrifugación a 4 000 r.p.m. durante 10 minutos fue sembrado en minicolumnas de ADN-celulosa preparadas según el método de Kovacs y col.(152). El complejo (³H)-E₂-receptor unido al ADN-celulosa fue eluído con un buffer TEMG (0.01 M Tris-ClH, pH 7,6, 0.0015 M EDTA, 0.002 M mercaptoetanol, 10% glicerol) conteniendo 200ng/ml albúmina sérica bovina y 300 nM NaCl y se determinó la radioactividad en los eluídos. Los resultados se expresaron en fmol/mg ADN.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron evaluados por análisis de varianza simple, y las diferencias entre grupos fueron analizadas por el test de Newman-Keuls. Para calcular la pendiente y el número máximo de sitios de unión en el gráfico de Scatchard se utilizó el análisis de regresión lineal. Los datos se obtuvieron en una computadora Hewlett-Packard 9815A.

RESULTADOS

Se estudió la unión de (^3H) estradiol a receptores nucleares libres en función del tiempo de incubación a $0-4^{\circ}\text{C}$ en pituitarias de animales no tratados y tratados con E_2 -4 días (Figura 6-1). En ambos grupos el equilibrio fue alcanzado después de 1 hora de incubación; en los animales no tratados los niveles de unión se mantuvieron hasta 20 horas después de iniciada la incubación. En cambio en los animales tratados con E_2 , los niveles de receptores aumentaron luego de 4 horas de incubación y una segunda meseta se alcanzó a las 7 horas, indicando que se produjo un intercambio aún a bajas temperaturas en incubaciones prolongadas. En consecuencia se eligió un tiempo de 1.5 horas para medir receptores libres nucleares en todos los experimentos siguientes.

Los análisis de saturación se llevaron a cabo en extractos nucleares de pituitarias de animales no tratados y animales que recibieron el tratamiento E_2 -4 días. Cinco ($0.2-5\text{ nM}$) o seis ($0.4-21.4\text{ nM}$) concentraciones de (^3H)- E_2 se agregaron a extractos nucleares de pituitarias de ratas no tratadas y tratadas respectivamente. El análisis de Scatchard (Figura 6-2) reveló una población única de sitios de unión con N máximo de 65 fmol/mg ADN en animales no tratados y 135 fmol/mg ADN en animales estrogenizados. Los K_d en ambos grupos de animales fueron similares (1.03 nM en animales no tratados y 1.6 nM en animales estro-

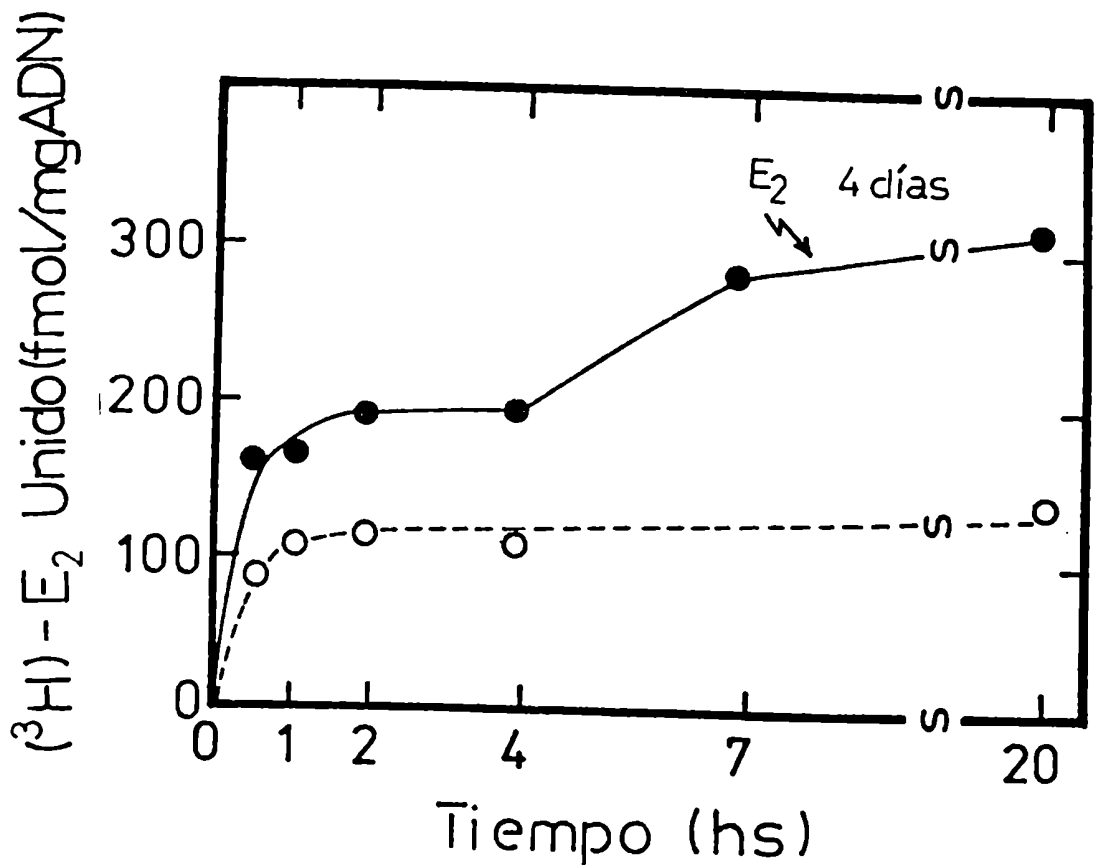


Figura 6-1. Efecto del tiempo de incubación sobre la unión de (³H)-E₂ en núcleos de células de la pituitaria anterior. Los núcleos se purificaron de acuerdo a Roy y McEwen (102) y se extrajeron con 0.4 M KCl y el extracto se incubó con 2.5 nM de (³H)-E₂ a 0-4°C durante los tiempos indicados en la abscisa. La hormona libre fue separada de la unida por minicolumnas de Sephadex LH-20. Círculos abiertos: extracto de pituitarias de ratas no tratadas. Círculos cerrados: extracto de pituitarias de ratas tratadas con 5 ug/kg/día de E₂ s.c. en aceite durante 3 días más una cuarta inyección en etanol-salina i.p. 60 minutos antes del sacrificio (E₂-4 días).

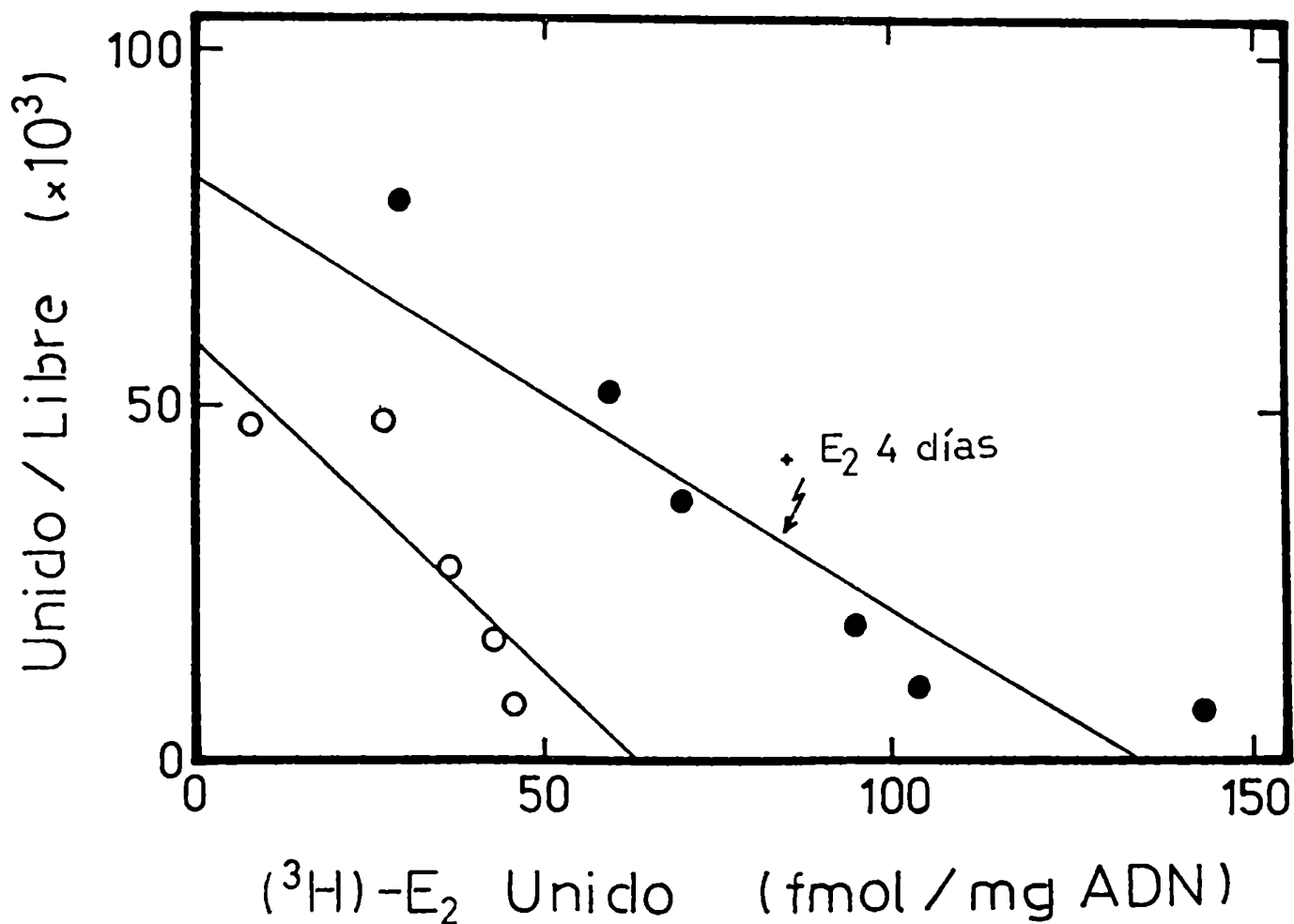


Figura 6-2. Análisis de Scatchard de la unión de (³H)-E₂ a receptores nucleares libres de ratas no tratadas (○) y de ratas que recibieron la dosis de E₂-4 días (●). En ratas no tratadas la capacidad máxima de unión fue 65 fmol/mg ADN y el K_d 1.03 nM (para la pendiente, r=0.88). La capacidad máxima de unión en ratas E₂-4 días fue 135,8 fmol/mg ADN y el K_d 1.6 nM (para la pendiente, r= 0.87).

genizados).

La duración del tratamiento estrogénico tuvo efectos variables sobre los receptores nucleares libres y totales. Como se muestra en la Figura 6-3, los receptores libres nucleares se detectaron en ratas castradas y adrenalectomizadas, o sea libres de hormonas endógenas.

El E_2 agudo no tuvo efecto sobre los receptores libres pero produjo un aumento de 4 veces en los receptores totales; el tratamiento de estradiol durante 4 días produjo un aumento significativo en los sitios libres y un incremento de 8 veces en los sitios totales. El tratamiento estrogénico prolongado en la forma de implantes de pellet de DES durante 3 meses llevó a una hipertrofia de las pituitarias (controles: 13.2 ± 0.3 mg, n=6; implantadas DES: 24.3 ± 0.3 mg, n=6; $p < 0.001$) y a elevados niveles de prolactina (controles: 3.65 ± 0.7 , n=11; implantadas DES: 194.9 ± 22.2 ng/ml, n=6; $p < 0.001$). Contrariamente a los resultados encontrados con la administración corta de E_2 , los receptores libres nucleares en estas pituitarias hipertróficas fueron significativamente menores que en los controles y lo mismo sucedió con los sitios nucleares totales (Figura 6-3).

Considerando que los receptores libres nucleares en pituitaria anterior parecen estar regulados positivamente después del tratamiento con estradiol durante 4 días, estudiamos el efecto de un antiestrógeno administrado durante el mismo período de tiempo. En consecuencia se

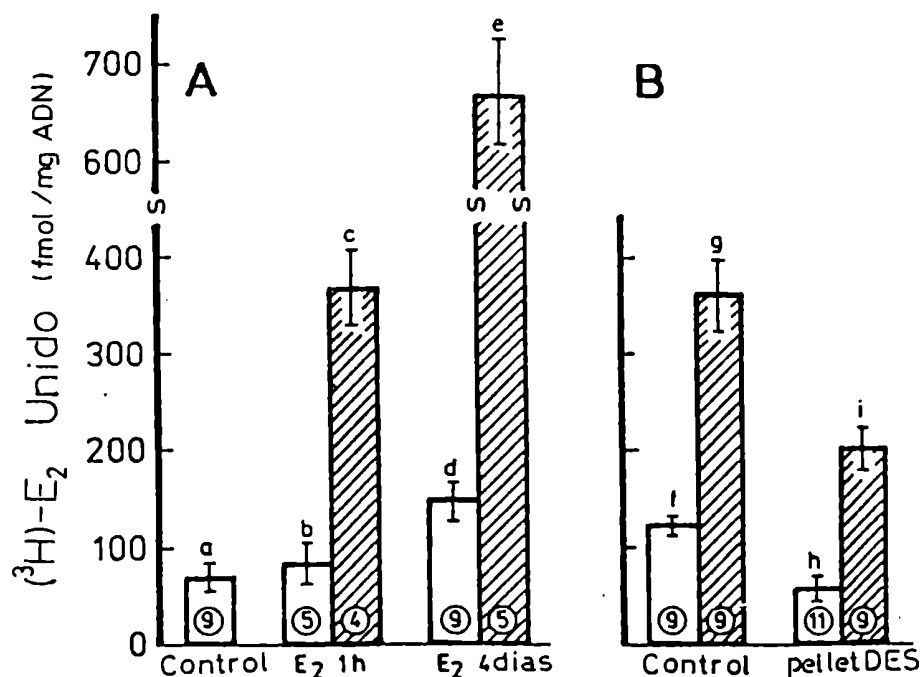


Figura 6-3. Efecto del estrógeno sobre los receptores libres y totales de núcleos de la pituitaria anterior. A (panel izquierdo): receptores nucleares en ratas no tratadas (Controles), ratas tratadas 1 hora antes del sacrificio con 5 ug/kg PC de E₂ i.p. (E₂ 1 hora) y ratas tratadas durante 3 días con 5 ug/kg PC/día de E₂ s.c. más una cuarta inyección 1 hora antes del sacrificio (E₂-4 días). B (panel derecho): receptores nucleares en ratas no tratadas (Controles) y ratas implantadas con un pellet de DES (15 mg) una vez al mes durante 3 meses (Pellet DES). En ambos paneles las columnas abiertas representan receptores libres y las rayadas representan receptores totales. Las figuras dentro de las columnas representan el número de determinaciones, cada una llevada a cabo con un grupo de tres pituitarias.

Panel A: ^eDiferente de los grupos a, b, c y d (p < 0.01)

^cDiferente de los grupos a, b y d (p < 0.01)

^dDiferente del grupo a (p < 0.05)

Panel B: ^gDiferente de los grupos i, f y h (p < 0.01)

ⁱDiferente de los grupos f y h (p < 0.01)

^fDiferente del grupo h (p < 0.05)

analizó el efecto de TAM sobre los receptores libres para E_2 y sobre dos parámetros que sabemos son influenciados por los estrógenos a nivel pituitario, como son la inducción del receptor progestacional y la prolactina sérica (150, 153, 154). La Figura 6-4 muestra los resultados en ratas no tratadas, y ratas que recibieron E_2 por 4 días, TAM por el mismo período o E_2 más TAM. Los animales sujetos a cualquiera de estos tratamientos mostraron un aumento significativo tanto de los receptores nucleares libres para E_2 como de los receptores citosólicos de (3H)-R 5020 de la pituitaria anterior. La combinación de E_2 más TAM no fue aditiva; en realidad hay una pequeña disminución en ese grupo, aunque no significativa. La prolactina sérica fue significativamente elevada por el E_2 ; el TAM no aumentó la prolactina pero bloqueó el efecto estimulante del E_2 (Figura 6-4). Con respecto a los pesos uterinos, en las ratas controles fueron de 146 ± 11.2 mg (n=5) y en las ratas tratadas con E_2 se produjo un aumento significativo: 447 ± 21.8 mg (n=6, $p < 0.01$). El TAM también aumentó el peso uterino: 278.6 ± 28.3 mg (n=8; $p < 0.01$) aunque de manera menos efectiva que el estradiol solo ($p < 0.01$) y suministrado junto con el E_2 , bloqueó su efecto ($E_2 + TAM$: 294.8 ± 16 mg, n=6; $p < 0.01$ vs. el grupo de E_2). Como conclusión, el TAM se comporta como un antagonista del estradiol en relación al peso uterino y a la prolactina sérica, pero resulta un agonista estrogénico en su efecto sobre los receptores citosólicos progestacionales y los receptores nucleares libres de E_2 en la pituitaria anterior.

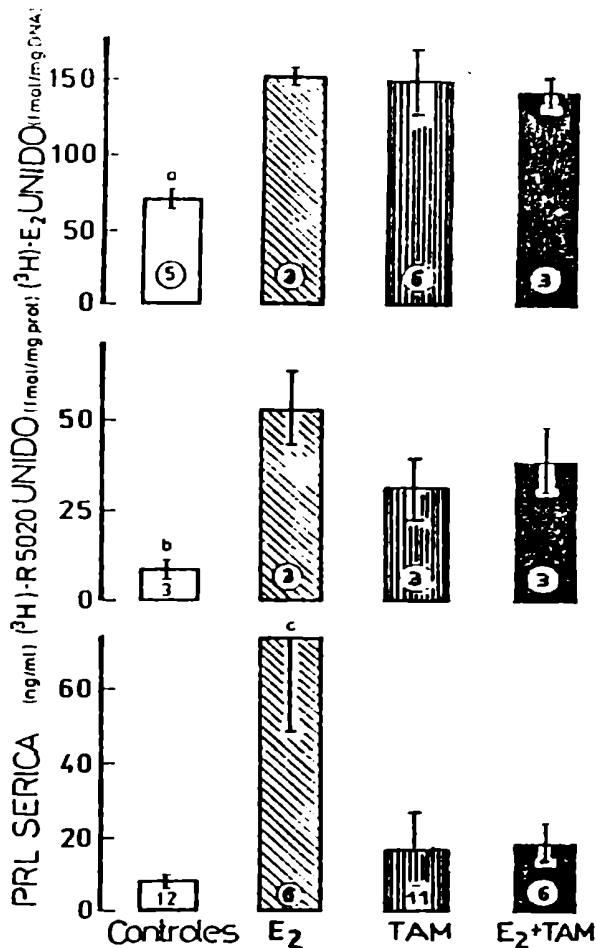


Figura 6-4. Efecto del E₂, tamoxifen(TAM) y E₂ + TAM sobre la unión de (³H)-E₂ a núcleos de células de la pituitaria anterior (panel superior), la unión a receptor citosólico progesteracional usando (³H)-R 5020 como ligando (panel medio) y prolactina sérica (panel inferior). Las ratas se dividieron en 4 grupos: 1) controles no tratados; 2) tratamiento E₂-4 días; 3) TAM: 1 mg/kg PC i.p. en agua durante 3 días más una cuarta inyección 60 minutos antes del sacrificio; 4) E₂ + TAM. La unión de (³H)-E₂ se llevó a cabo a 0-4°C durante 1.5 horas para medir sólo receptores libres.

Las figuras dentro de las columnas representan el número de determinaciones, cada una llevada a cabo con un grupo de tres pituitarias para los ensayos de unión o representan el número de animales para los niveles de prolactina.

^aMenor que el resto de los grupos en el panel superior (p < 0.01).

^bMenor que el resto de los grupos en el panel medio (p < 0.05).

^cMenor que el resto de los grupos en el panel inferior (p < 0.01).

En el Capítulo II y V se demostró que tanto en los animales con diabetes crónica como en aquellos con lesión en la eminencia media había una deficiencia en los receptores citosólicos y nucleares para E_2 ; por consiguiente estudiamos en estos animales los receptores nucleares libres. En la diabetes crónica (Figura 6-5), se determinaron los sitios nucleares libres en animales con o sin tratamiento estrogénico durante 4 días. En ambos casos las ratas diabéticas mostraron una reducción de los receptores de aproximadamente el 50% con respecto a los animales controles. En los animales diabéticos (Figura 6-5) los sitios totales determinados después de una única administración de E_2 , 60 minutos antes del sacrificio, se redujeron 4 veces con respecto a los controles.

Un grupo de animales con lesión en la eminencia media y con operación simulada, sin previa exposición a E_2 , fue también analizado para evaluar el contenido de receptores nucleares libres; en los animales lesionados hubo una reducción significativa con respecto a los controles (controles: 91.8 ± 9.3 , $n=6$; LEM: 56.2 ± 9.3 , $n=6$; $p < 0.025$).

El efecto de dexametasona, progesterona y testosterona sobre los niveles basales de receptores libres nucleares en animales no tratados y tratados por 4 días con E_2 se muestra en la Tabla 6-1. Los niveles basales de receptores libres no sufrieron cambio después del tratamiento con progesterona o testosterona, mientras que dexametasona los redujo a la mitad ($p < 0.05$). Cuando las tres hormonas se dieron simultáneamente con E_2 no modificaron el aumento de receptores libres promovido por el E_2 (Tabla 6-1).

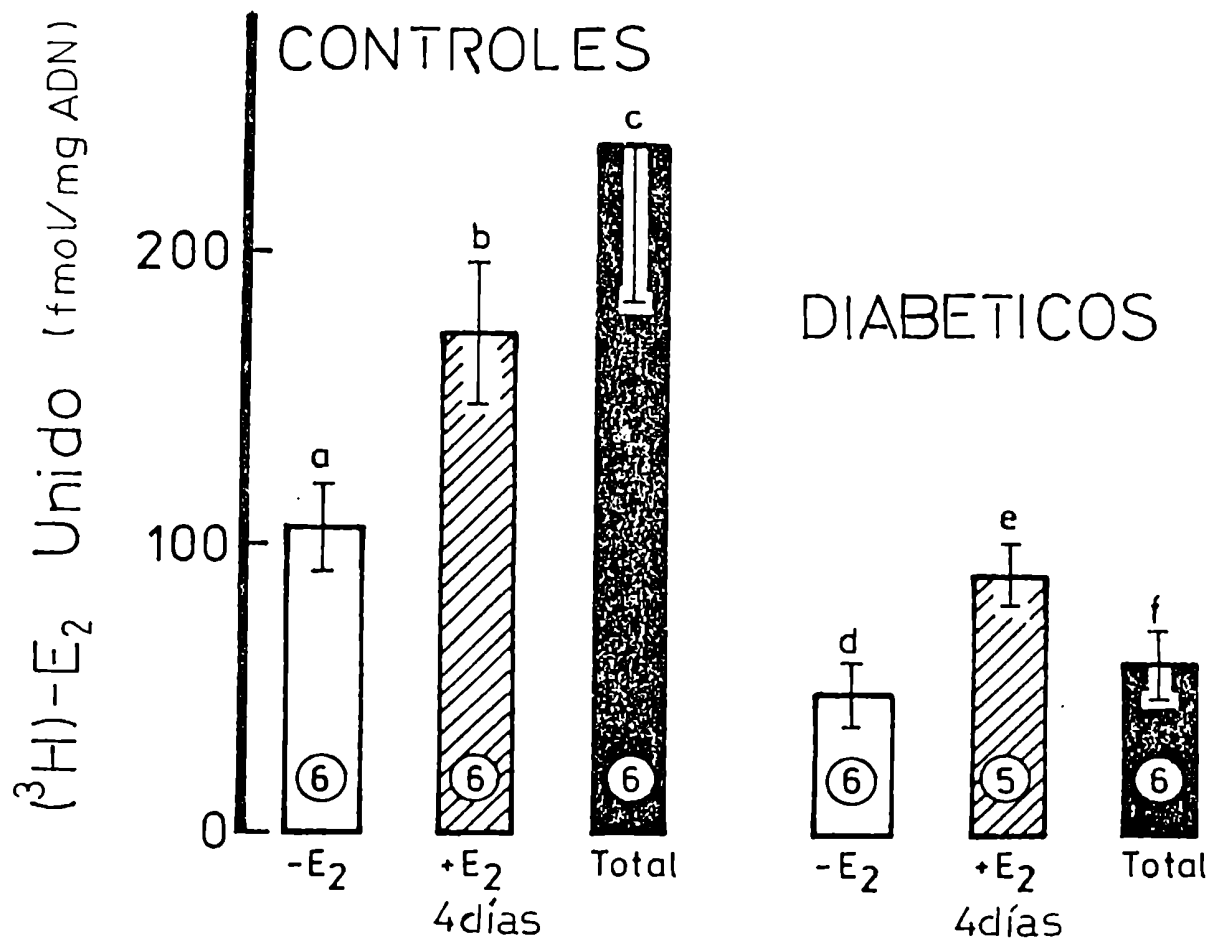


Figura 6-5. Efecto de la diabetes crónica sobre los receptores libres de núcleos de células de la pituitaria anterior. Las primeras tres columnas de la izquierda representan los resultados en animales controles mientras que las tres columnas de la derecha representan los animales diabéticos. Columnas abiertas: ratas no tratadas (-E₂). Columnas rayadas: ratas tratadas con E₂ durante 4 días (ver leyenda Figura 6-1). Columnas oscuras: receptores totales medidos en extracto de núcleos celulares medido por intercambio (ver Materiales y Métodos) después de la administración de una única dosis de E₂ 1 hora antes del sacrificio (5 ug/kg PC i.p.).

Las figuras entre paréntesis representan el número de observaciones, cada una de ellas llevada a cabo con un grupo de tres pituitarias.

^dp < 0.02 vs. grupo a; ^ep < 0.02 vs. grupo b; ^fp < 0.02 vs. grupo c.

Tabla 6 -1. Efecto de diferentes hormonas sobre los receptores libres para $(^3\text{H})\text{-E}_2$ en núcleos de células de pituitaria anterior.

<u>Grupo</u>	<u>$(^3\text{H})\text{-E}_2$ unido (% del control)</u>		<u>p**</u>
	<u>Basal</u>	<u>E_2</u>	
Control	100.0 \pm 11.2 (14)	244.3 \pm 17.5 (11)	< 0.01
Testosterona	98.5 \pm 10.7 (2)	331.4 \pm 122.6 (3)	< 0.01
Progesterona	87.7 \pm 10.1 (3)	303.5 \pm 38.9 (3)	< 0.01
Dexametasona	55.8 \pm 3.8 (5)*	285.2 \pm 18.7 (3)	< 0.01

Ratas castradas se mantuvieron sin tratamiento (controles) o se les administró testosterona (1 mg s.c. durante 4 días), progesterona (2.5 mg s.c. durante 4 días) o dexametasona (10 ug/ml en el agua de bebida durante 4 días). Un segundo grupo de animales recibió idéntico tratamiento además de E_2 durante 4 días (ver leyenda Figura 6-1). Los receptores nucleares libres se determinaron según se especifica en la leyenda de la Figura 6-1, luego de incubar durante 1.5 horas a 0-4°C.

*p < 0.05 vs. control

**p los valores de p se refieren a diferencias entre E_2 y los niveles basales.

Las figuras entre paréntesis representan el número de determinaciones, cada una de ellas llevada a cabo con un grupo de dos pituitarias anteriores.

Finalmente investigamos si los receptores extraídos con 0.4 M KCl de los núcleos de las células de la pituitaria presentaban afinidad por el ADN-celulosa, lo cual presumiblemente indicaría su transformación a un estado capaz de unirse al ADN (152). La Tabla 6-2 muestra que el 35-50% del (³H)-E₂ unido a receptores nucleares libres a 0-4°C fue retenido en la columna de ADN-celulosa; este esquema no se modificó después de calentar el extracto a 25°C durante 90 minutos. Bajo condiciones comparables, el receptor citosólico incubado a 0-4°C, o a 30°C como en experimentos previos (122), mostró menor unión al ADN-celulosa que el receptor libre nuclear. Más aún, en ratas con tratamiento agudo de E₂, ni la unión total o la unión a ADN-celulosa fue alterada (Tabla 6-2), mientras que después del tratamiento con E₂-4 días, el complejo receptor nuclear libre-(³H)-E₂ presentó una unión aumentada a ADN-celulosa en comparación a sus controles no tratados, a pesar que el % de la unión total retenida en la columna fue levemente reducida.

Tabla 6-2. Unión de receptores nucleares libres a ADN-celulosa

Exp.	Grupo	Temperatura <u>incubación</u>	Unión a ADN-celulosa <u>fmol/mg ADN</u>	% <u>unión total</u>
I	No tratadas	0-4°C	35.15 ± 6.88	33.84 ± 5.27
	No tratadas	25°C	35.41 ± 1.52	14.43 ± 1.30
II	Receptor citosólico *	0-4°C	18.14 ± 3.12	11.51 ± 1.02
	Receptor citosólico	30°C	17.73 ± 1.70	9.24 ± 1.33
III	No tratadas	0-4°C	50.39 ± 2.92	33.46 ± 3.18
	E ₂ agudo	0-4°C	67.68 ± 12.03	27.12 ± 0.66
IV	No tratadas	0-4°C	37.02 ± 3.05	36.64 ± 2.82
	E ₂ -4 días	0-4°C	92.09 ± 5.36**	22.81 ± 2.97***

Ratas castradas se mantuvieron sin tratamiento o se les administró una única dosis de E₂ (E₂ agudo) o se trataron durante 4 días con E₂ (E₂-4 días). Los receptores libres nucleares fueron extraídos de las pituitarias con 0.4 M de KCl; luego de dializar durante la noche a 4°C para remover el KCl, los extractos se incubaron durante 1.5 horas con 2.5 nM (³H)-E₂. El esteroide libre se adsorbió con carbón-dextran y el receptor unido a (³H)-E₂ se sembró en minicolumnas de ADN-celulosa y fue eluido con 300 mM NaCl (152). La unión total se refiere a los niveles de unión en los extractos antes de sembrarlos en las columnas de ADN-celulosa.

Los datos representan el promedio ± error estándar de 3 determinaciones, cada una llevada a cabo con un grupo de 3 pituitarias anteriores.

*Obtenido según se describió en el Capítulo II.

**p < 0.001 vs. grupo no tratado.

***p < 0.005 vs. grupo no tratado.

DISCUSION

Los resultados de estos experimentos confirman la presencia de receptores libres de alta afinidad y baja capacidad en los núcleos purificados de pituitaria anterior. Esta concentración de sitios libres detectados en pituitarias de ratas crónicamente castradas fue elevada significativamente después del tratamiento con E_2 durante 4 días; concomitantemente hubo un aumento en los sitios nucleares totales medidos por intercambio. Por otro lado, el tratamiento agudo con E_2 aumentó los sitios totales nucleares mientras que los receptores no se modificaron, lo cual sugiere una relación temporal del efecto estrogénico.

La exposición prolongada a estrógenos causada por los implantes de pellet de DES durante 3 meses, produjo una hipertrofia de las pituitarias sin que los pesos de las glándulas fueran lo suficientemente altos para corresponder a tumores. Estas pituitarias mostraron una reducción tanto en el número de receptores libres como totales, sugiriendo un control del E_2 de sus propios receptores. La autoregulación negativa debida al estradiol fue demostrada por Umans y col. (155) en las células MCF-7 y en útero de rata por Manni y col. (156). Sin embargo es factible que la reducción en los sitios libres y totales nucleares se deba a la población celular de las pituitarias tratadas con DES, compuestas principal-

mente por células mamotrópicas (84, 157) en oposición a la predominancia de células FSH + LH presentes en la pituitaria después de la ovariectomía crónica (158).

Otro aspecto interesante del estudio realizado resultó el efecto del TAM, un antiestrógeno del cual se sabe que inhibe la prolactina plasmática y el efecto uterotrófico del E_2 (153). En la pituitaria el TAM administrado solo, indujo los receptores progestacionales y produjo un aumento de los receptores libres, sin modificar la prolactina sérica. Cuando se lo administró concomitantemente con el E_2 , los primeros dos parámetros no variaron significativamente con respecto al tratamiento con E_2 solo, pero en cambio el aumento de prolactina sérica fue abolido. Podemos concluir de esta manera, que a nivel de la pituitaria las propiedades agonistas del TAM sobre la inducción del receptor de progesterona y los receptores libres nucleares son paralelas, y sugerimos que estos dos eventos podrían estar relacionados, posiblemente originándose en el mismo tipo de célula. Otro antiestrógeno, CI-628, resultó también eficaz para translocar el receptor de E_2 e inducir el receptor de progesterona (159).

En la diabetes crónica habíamos demostrado que tanto la translocación nuclear del E_2 como su actividad biológica a nivel de la pituitaria estaban alteradas (150). También demostramos que en ratas con lesión en la eminencia media, tanto la unión citosólica del (3H)- E_2 como la captación tisular total del (3H)- E_2 inyectado, estaban disminuídas (122). Nuestros resultados muestran que en estas dos condiciones también existe

una disminución de los receptores nucleares libres.

Los resultados obtenidos sugieren que los tratamientos que producen un aumento de los receptores totales nucleares para E_2 (E_2 -4 días y TAM), llevan a un aumento de los receptores nucleares libres, en cambio cuando se produce una disminución de los receptores totales nucleares o citosólicos, los receptores nucleares libres disminuyen. En consecuencia los receptores nucleares libres podrían estar íntimamente relacionados a otro tipo de receptor para E_2 , a excepción del tratamiento agudo de E_2 que aumenta los sitios totales pero no los libres.

Otras hormonas como progesterona y testosterona no tuvieron efecto sobre los sitios libres ya sea en ratas expuestas a E_2 o en ratas deprivadas de esta hormona por castración. La dexametasona produjo una reducción significativa en los niveles basales de receptor libre, pero no en los estimulados. Lisk y Reuter (75) demostraron que las pituitarias de ratas tratadas con dexametasona mostraron una menor retención de (3H)- E_2 por la fracción nuclear, dato que corrobora la hipótesis de una relación entre los receptores libres y totales.

Es posible que los receptores nucleares libres representen una forma más fuertemente unida al ADN o a la cromatina que la mayoría del receptor que migra al citoplasma después de la homogeneización (160), favoreciendo la hipótesis de una localización preferentemente nuclear de los receptores esteroideos (63 , 64). Si esta hipótesis es correcta, deberían detectarse receptores nucleares libres para otros esteroides,

salvo que este sea un mecanismo especial para estrógenos.

Es interesante señalar que estos receptores extraídos con alta fuerza iónica del núcleo muestran una unión considerable a ADN-celulosa, un dato que se toma como medida del estado de transformación del receptor (152) y el cual se correlaciona con la unión a núcleos intactos (161). Entonces los receptores nucleares libres podrían ser capaces de estimular "per se" la actividad genética como sugirieron Garola y McGuire (149). En este sentido, los receptores nucleares libres podrían ser diferentes de los citosólicos, siendo estos los presentes en el citosol como en el modelo clásico (21) o aquellos que se derivan del compartimiento nuclear al citoplasma (63, 64, 160).

Finalmente, el tipo de células pituitarias de las cuales se originan los receptores nucleares libres pueden ser extrapoladas de los trabajos de Stumpf (93) y Keefer (162), que demostraron una captación preferencial del (^3H)- E_2 por las lactotropas y gonadotropas. Nuestros resultados con TAM sugieren que las células sobre las cuales tanto E_2 como TAM producen una respuesta paralela pueden ser las mismas, en oposición a las células productoras de prolactina, en las cuales el TAM antagoniza los efectos del E_2 .

CONCLUSIONES FINALES

Los resultados obtenidos en estos trabajos sugieren que:

1. Los receptores citosólicos en la pituitaria anterior están bajo el control del sistema nervioso central, probablemente bajo la influencia de un neurotransmisor que podría ser dopamina. Las primeras evidencias demuestran que la lesión en la eminencia media produce una disminución en los receptores citosólicos, que ya es notoria a la hora de producir la lesión y continúa en baja hasta alcanzar una meseta al 7^o día, que continúa hasta el día 21. Simultáneamente se produce una hiperprolactinemia en los mismos animales. De los datos obtenidos a través del gráfico de Scatchard se deduce que podría haber un cambio en la afinidad de los receptores por el ligando sumado a una disminución superior al 50% en el número de sitios totales. Los estudios realizados "in vivo" demuestran que al igual que lo demostrado "in vitro", existe una menor retención de (³H)-E₂ por la pituitaria de animales lesionados; también se demuestra una menor captación por los hipotálamos lesionados, dato que no se observa "in vitro". La síntesis proteica es similar en ambos grupos.

La bromocriptina, un agonista dopaminérgico, restauró la capacidad de unir estradiol en el citosol de pituitaria anterior de animales lesionados. Esta droga, en cambio, no tuvo efecto sobre animales controles.

Cuando se utilizó el modelo de rata prolactinémica debida al trasplante de hipófisis bajo la cápsula renal, se comprobó que las hi-

pófisis "in situ" no tenían disminuídas la unión de estradiol, lo cual descartaría a la prolactina como el principal factor en la regulación de los receptores estrogénicos. El tratamiento con bromocriptina reduce la hiperprolactinemia y por lo tanto llega a las células lactotropas de las hipófisis transplantadas, aunque no consigue restaurar los niveles normales de receptor estrogénico en las mismas, quizás porque exista una hipofunción más pronunciada en estas glándulas.

La posibilidad que la dopamina pudiera estar actuando a través de algún otro factor como LHRH no se concretó, ya que demostramos a través de diversos diseños experimentales que tanto el LHRH natural como el Buserelín, el análogo sintético, son incapaces de modificar los receptores para estradiol en la pituitaria anterior de rata.

2. La diabetes experimental producida por estreptozotocina lleva a una disminución del receptor citosólico de estradiol en la hipófisis anterior y de la translocación de los mismos después del tratamiento "in vivo" con dosis fisiológicas de estradiol. Esto se transluce en una disminución de la inducción del receptor citosólico progestacional y de la respuesta prolactínica. En cambio, se revierte si los animales diabéticos son tratados con dosis farmacológicas de estradiol, lo cual sugiere que una vez que los receptores llegan al núcleo en una determinada concentración, su efecto se ejerce aún en presencia de la diabetes.

En el útero, en cambio, hubo una reducción en la unión del

(³H)-E₂ por los núcleos con ambas dosis, lo cual demuestra diferentes respuestas a la diabetes mellitus de estos efectores.

3. La hipófisis anterior contiene receptores libres nucleares. Estos receptores son modulados por estradiol y aumentan después de 4 días de tratamiento estrogénico como también lo hacen los sitios totales medidos por intercambio. En cambio el tratamiento con pellet de DES durante 3 meses mostró una reducción en los receptores libres y totales sugiriendo un control del E₂ de sus propios receptores.

El tratamiento con tamoxifen indujo en la pituitaria receptores progestacionales y produjo un aumento de los receptores libres. Cuando se administró tamoxifen junto con E₂, este compuesto bloqueó el efecto estimulante del E₂ aunque su efecto no fue aditivo sobre los receptores progestacionales y los receptores libres nucleares.

Los receptores libres nucleares disminuyen en ratas diabéticas y con lesión en la eminencia media y no se ven alterados por tratamiento con progesterona o testosterona, ya sea que se encuentren en sus niveles basales o aumentados por estímulos de estradiol. La dexametasona disminuye los niveles basales. Los receptores libres nucleares muestran además una unión considerable al ADN-celulosa.

4. Creemos haber demostrado, en el curso de estos trabajos, el carácter altamente regulatorio de los receptores estrogénicos anterohipofisarios

que cataloga a estas moléculas como proteínas alostéricas. Los factores de regulación son variados y pueden estar o no relacionados, y tentativamente podríamos clasificarlos en: a) extrínsecos y b) intrínsecos al tejido. Los factores extrínsecos pueden ser esteroideos, tal como la regulación estrogénica positiva y glucocorticoide negativa de los receptores libres, o por neurotransmisores, tal como sucede con la dopamina. Entre los factores intrínsecos mencionaremos a los cambios tisulares de la diabetes mellitus, que posiblemente conduzcan a una menor síntesis y/o actividad del receptor. Finalmente, la disminución de los receptores estrogénicos en la diabetes y la lesión de eminencia media estudiados en estos trabajos, podrían tener un origen común, debido en ambos casos a la ausencia de algún factor trófico hipotalámico que mantuviera las concentraciones de receptores de la hipófisis en límites fisiológicos. Esta hipótesis se encuentra avalada por la observación de cambios hipotalámicos degenerativos en la diabetes mellitus.

Alejandro Fernández

[Signature]

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

- 1.- Moguilevsky, J.: Neurosecreción. Anatomía funcional del eje hipotálamo-hipofisario. En: Neuroendocrinología. Lopez Libreros Editores, Buenos Aires: 3-17, 1984.
- 2.- Porte, A., Klein, M.J., Stoeckel, M.J., Stutinsky, F.: Z. Zellforsch 115: 60-68, 1971.
- 3.- Smith, R.E., Farquhar, M.G.: Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. J. Cell Biol. 31: 319-347, 1966.
- 4.- Baker, B.L.: Functional cytology of the hypophysial pars distalis and pars intermedia. En: Handbook of Physiology, Sección 7, vol IV. American Physiological Society, Washington, D.C.: 45-80, 1974.
- 5.- Le Gros Clark, W.E.: J. Anat. 64: 371-414, 1930.
- 6.- Le Gros Clark, W.E.: The Hypothalamus. Le Gros Clark, W.E., Beattie, J., Riddoch, G., Dott, N.M. Editores, Oliver y Boyd, Edinburgo: 1068, 1938.
- 7.- Bjorklund, A., Flak, A.B., Nobin, A., Stenevi, V.: Organization of the dopamine and noradrenaline innervation of the median eminence-pituitary region in the rat. En: Neurosecretion. The final neuroendocrine pathway. Knowles, F., Wallrath, L. Editores. Springer, N.Y.: 209, 1973.
- 8.- Schally, A.V., Comaru-Schally, A.M.: Hormonas hipotalámicas y su aplicación en la práctica médica. En: Unidad hipotálamo-hipofisaria. Edi-

- med, Ediciones Médicas, Buenos Aires: 60-66, 1983.
- 9.- Green, J.D., Harris, G.W.: The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. *J. Endocrinol.* 5: 136-146, 1947.
 - 10.- Joseph, S.A., Scott, D.E., Vaala, S.S., Knigge, K.M., Krobisch-Dudley, G.: Localization and content of thyrotrophin releasing factor (TRF) in median eminence of the hypothalamus. *Acta Endocrinol.* 74: 215-225, 1973.
 - 11.- O'Malley, B.W., Means, A.R.: Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science* 183: 610-620, 1974.
 - 12.- O'Malley, B.W., Schwartz, R.J., Schrader, W.T.: A review of regulation of gene expression by steroid hormone receptors. *J. Steroid Biochem.* 7: 1151-1159, 1976.
 - 13.- Jensen, E.V., Jacobson, H.I.: Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec. Prog. Horm. Res.* 18: 387-414, 1962.
 - 14.- Aten, R.F., Weinberger, M.J., Eisenfeld, A.J.: Estrogen receptor in rat liver: translocation to the nucleus in vivo. *Endocrinology* 102: 433-442, 1978.
 - 15.- Li, J.J., Talley, D.J., Li, S.A., Vिलlee, C.A.: An estrogen binding protein in the renal cytosol of the intact, castrated, and estrogenized golden hamster. *Endocrinology* 95: 1134-1141, 1974.
 - 16.- Cutler, G.B. Jr., Barnes, K.M., Sauer, M.A., Loriaux, D.L.: Estrogen

- receptor in rat adrenal gland. *Endocrinology* 102: 252-257, 1978.
- 17.- Muller, R.E., Wotiz, H.H.: Estrogen-binding protein in mouse and rat adrenal glands. *J. Biol. Chem.* 253: 740-745, 1978.
- 18.- Richards, J.S., Ireland, J.J., Rao, M.C., Berbath, G.A. Jr., Reichert, L.E. Jr.: Ovarian follicular development in the rat: hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology* 99: 1562-1570, 1976.
- 19.- Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P. W., DeSombre, E.R.: A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59: 632-638, 1968.
- 20.- Jensen, E.V., Brecher, P.I., Mohla, S., DeSombre, E.R.: Receptor transformation in estrogen action. *Acta Endocrinol. (Copenh) (Suppl. 191)* 77: 159-172, 1974.
- 21.- Jensen, E.V., DeSombre, E.R.: Estrogen-receptor activation. *Science* 182: 126-134, 1973.
- 22.- Mohla, S., DeSombre, E.R., Jensen, E.V.: Tissue-specific stimulation of RNA synthesis by transformed estradiol-receptor complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46: 661-667, 1972.
- 23.- Notides, A.C.: Conformational forms of the estrogen receptor. In: *Receptors and Hormone Action*. O'Malley, B.W., Birnbaumer, L. Editores. N.Y. Academic: 33-61, 1978.

- 24.- Thampan, T.N.R.V., Clark, J.H.: An oestrogen receptor activator protein in rat uterine cytosol. *Nature* 290: 152-154, 1981.
- 25.- Grody, W.W., Schrader, W.T., O'Malley, B.W.: Activation, transformation, and subunit structure of steroid hormone receptors. *Endocrine reviews* 3: 141-163, 1982.
- 26.- Sato, B., Nishizawa, Y., Noma, K., Matsumoto, K., Yamaura, Y.: Estrogen-independent nuclear binding of receptor protein of rat uterine cytosol by removal of low molecular weight inhibitor. *Endocrinology* 104: 1474-1479, 1979.
- 27.- Yamamoto, K.R.: Characterization of the 4S to 5S forms of the estradiol receptor protein and their interaction with deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 249: 7068-7075, 1974.
- 28.- Sherman, M.R., Pickering, L.A., Rollwagen, F.M., Miller, L.K.: Mero-receptors: proteolytic fragments of receptors containing the steroid-binding site. *Fed. Proc.* 37: 167-173, 1978.
- 29.- Jensen, E.V., Green, G.L., Closs, L.E., DeSombre, E.R., Nadji, M.: Receptors reconsidered: A 20-Year Perspective. *Rec. Prog. Horm. Res.* 38: 1-40, 1982 .
- 30.- Sheridan, P.J., Buchanan, J.M., Anselmo, V.C., Martin, P.M.: Equilibrium: the intracellular distribution of steroid receptors. *Nature* 282: 579-582, 1979.

- 31.- Sheridan, P.J., Buchanan, J.M., Anselmo, V.C., Martin, P.M.: Unbound progesterone receptors are in equilibrium between the nucleus and cytoplasm in cells of the rat uterus. *Endocrinology* 108: 1533-1537, 1981.
- 32.- O'Malley, B.W., Spelsberg, T.C., Schrader, W.T., Chytil, F., Steggle, A.W.: Mechanisms of interaction of a hormone-receptor complex with the genome of a eukaryotic target cell. *Nature* 235: 141-144, 1972.
- 33.- Spelsberg, T.C., Steggle, A.W., Chytil, F., O'Malley, B.W.: Progesterone-binding components of chick oviduct: V. Exchange of progesterone-binding capacity from target to nontarget tissue chromatin. *J. Biol. Chem.* 247: 1368-1374, 1972.
- 34.- Clark, J.H., Anderson, J.N., Peck, E.J.Jr.: Nuclear receptor estrogen complexes of rat uteri: concentration-time-response parameters. *Adv. Exp. Med. Biol.* 36: 15-59, 1973.
- 35.- Katzenellenbogen, B.S., Bhakoo, H.S., Ferguson, E.R., Lan, N.C., Tatee, T., Tsai, T.L., Katzenellenbogen, J.A.: Estrogen and antiestrogen action in reproductive tissues and tumors. *Rec. Prog. Horm. Res.* 35: 259-300, 1979.
- 36.- Gorski, J., Gannon, F.: Current models of steroid hormone action: a critique. *Ann. Rev. Physiol.* 38: 425-450, 1976.
- 37.- Clark, J.H., Peck, E.J.Jr.: Nuclear retention of receptor-oestrogen complex and nuclear acceptor sites. *Nature* 260: 635-637, 1976.

- 38.- Tang, S., Liao, S.: Androgen receptors: steroid and tissue specific retention of a 17β -hydroxy- 5α -androstane-3-one-protein complex by the cell nuclei of ventral prostate. J. Biol. Chem. 246: 16-24, 1971.
- 39.- Buller, R.E., Toft, D.O., Schrader, W.T., O'Malley, B.W.: Progesterone-binding components of chick oviduct: VIII. Receptor activation and hormone-dependent binding to purified nuclei. J. Biol. Chem. 250: 801-808 1975.
- 40.- O'Malley, B.W., Toft, D.O., Sherman, M.R.: Progesterone-binding components of chick oviduct: II. Nuclear components. J. Biol. Chem. 246: 1117-1122, 1971.
- 41.- Milgrom, E., Atger, M., Baulieu, E-E: Acidophilic activation of steroid hormone receptors. Biochemistry 12: 5198-5205, 1973.
- 42.- Jensen, E.V., Suzuki, T., Numata, M., Smith, S., DeSombre, E.R.: Estrogen-binding of target tissues. Steroids 13: 417-427, 1969.
- 43.- Mester, J., Baulieu, E-E: Dynamics of estrogen-receptor distribution between the cytosol and nuclear fractions of immature rat uterus after oestradiol administration. Biochem. J. 146: 617-623, 1975.
- 44.- Sarff, M., Gorski, J.: Control of estrogen binding protein concentration under basal conditions and after estrogen administration. Biochemistry 10: 2557-2563, 1971.
- 45.- Cidlowski, J.A., Muldoon, T.G.: Estrogenic regulation of cytoplasmic

- receptor populations in estrogen-responsive tissues of the rat. *Endocrinology* 95: 1621-1629, 1974.
- 46.- Vedeckis, W.V., Freeman, M.R., Schrader, W.T., O'Malley, B.W.: Progesterone-binding components of chick oviduct: partial purification and characterization of a calcium-activated protease which hydrolyzes the progesterone receptor. *Biochemistry* 19: 335-343, 1980.
- 47.- Vedeckis, W.V., Schrader, W.T., O'Malley, B.W.: Progesterone-binding components of chick oviduct. Analysis of receptor structure by limited proteolysis. *Biochemistry* 19: 343-349, 1980.
- 48.- Clark, J.H., Hardin, J.W., Upchurch, S., Eriksson, H.: Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of the rat uterus. *J. Biol. Chem.* 253: 7630-7634, 1978.
- 49.- Moses, D.F., Fridman, O., De Nicola, A.F.: Relationship between type I and type II estrogen binding sites in the rat uterus. *Acta Physiologica Latinoamericana* (enviado a publicación).
- 50.- Eriksson, H., Upchurch, S., Hardin, J.W., Peck, E.J.Jr, Clark, J.H.: Heterogeneity of estrogen receptors in the cytosol and nuclear fractions of the rat uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 1-7, 1978.
- 51.- Lieberburg, I., McEwen, B.S.: Brain cell nuclear retention of testosterone metabolites, 5 α dihydrotestosterone and estradiol 17 β , in adults rats. *Endocrinology* 100: 588-597, 1977.
- 52.- McEwen, B.S.: Interaction between hormones and nerve tissue. *Scienti-*

- fic American 235: 48-58, 1976.
- 53.- Attardi, B., Ohno, S.: Androgen and estrogen receptors in the developing mouse brain. *Endocrinology* 99: 1279-1290, 1976.
- 54.- MacLusky, N.J., Chaptal, C., McEwen, B.S.: The development of estrogen receptor systems in the rat brain and pituitary: postnatal development. *Brain Res.* 178: 143-160, 1979.
- 55.- MacLusky, N.J., Lieberburg, I., McEwen, B.S.: The development of estrogen receptors systems in the rat brain: perinatal development. *Brain Res.* 178: 129-142, 1979.
- 56.- McEwen, B.S., Plapinger, L., Chaptal, C., Gerlach, J., Wallach, G.: Role of fetoneonatal estrogen binding proteins in the association of estrogen with neonatal brain cell nuclear receptors. *Brain Res.* 96: 400-406, 1975.
- 57.- Presl, J., Pospisil, J., Horsky, J.: Autoradiographic localization of radioactivity in female rat neocortex after injection of tritiated estradiol. *Experientia* 27: 465-467, 1971.
- 58.- Keefer, D.A.: Dynamics of in situ estrogen uptake by nuclei of individual pituitary and uterine cell types. *Horm. Metab. Res.* 14: 209-212, 1982.
- 59.- Pietras, R.J., Szegc, C.M.: Estrogen receptors in uterine plasma membrane. *J. Steroid Biochem* 11: 1471-1483, 1979.
- 60.- Linkie, D.M., Siiteri, P.K.: A re-examination of the interaction of estro-

- diol with target cell receptors. J. Steroid Biochem. 9: 1071-1078, 1978.
- 61.- Snow, L.D., Eriksson, H., Hardin, J.W., Chan, L., Jackson, R.L., Clark, J.H., Means, A.R.: Nuclear estrogen receptor in the avian liver: correlation with biologic response. J. Steroid Biochem. 9 1017-1026, 1978.
- 62.- Walters, M.R., Hunziker, W., Norman, A.W.: Unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors. J. Biol. Chem. 255: 6799-6805, 1980.
- 63.- King, W.J., Green, G.L.: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptors in the nuclei of target cells. Nature 307: 745-747, 1984.
- 64.- Welshons, W.V., Lieberman, M.E., Gorski, J.: Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. Nature 307: 747-749, 1984.
- 65.- Barraclough, C.A.: Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones. Rec. Prog. Horm. Res. 22: 503-539, 1966.
- 66.- Moguilevsky, J.A.: Eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. En: Neuroendocrinología. Lopez Libreros Editores, Buenos Aires: 101-112, 1984.

- 67.- Lignon, F., Rochefort, H.: Regulation of estrogen receptors in ovarian-dependent rat mammary tumors, I. Effect of castration and prolactin. *Endocrinology* 98: 722-729, 1976.
- 68.- Leung, B.S., Sasaki, G.H.: Prolactin and progesterone effect on specific estradiol binding in uterine and mammary tissues in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55: 1180-1184, 1973.
- 69.- Shafie, S., Brooks, S.C.: Effect of prolactin on growth and the estrogen receptor level of human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer Res.* 37: 792-799, 1977.
- 70.- Hawkins, R.A., Hill, A., Freedman, B., Killen, E., Buchan, P., Miller, W.R., Forrest, A.P.M.: Oestrogen receptor activity and endocrine status in DMBA-induced rat mammary tumors. *Eur. J. Cancer* 13: 223-228, 1977.
- 71.- Ogren, L., Vértés, M., Wolley, D.: "In vivo" nuclear (^3H) estradiol binding in brain areas of the rat: reduction by endogenous and exogenous androgens. *Neuroendocrinology* 21: 350-365, 1976.
- 72.- West, N.B., Hess, D.L., Sandow, B.A., Brenner, R.M.: Nuclear and cytoplasmic estrogen receptor levels in the oviducts and endometria of cynomolgus monkeys during the menstrual cycle. *Proc. Ann. Endocrine Soc. Meet.*, 61st, Anaheim, p. 157 (Abstr. 338), 1979.
- 73.- Hsueh, A.J.W., Peck, E.J., Clark, J.H.: Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen-induced uterine growth. *Nature* 254: 337-339, 1975.

- 74.- Lisk, R.D., Reuter, L.A.: Progesterone treatment increases pituitary estradiol retention in the ovariectomized normal female rat but not in the male nor in the androgen- or estrogen-sterilized female rat. *Acta Endocrinol (KBH)* 84: 268-280, 1977.
- 75.- Lisk, R.D., Reuter, L.A.: Dexamethasone: increased weights and decreased (³H) estradiol retention of uterus, vagina and pituitary in the ovariectomized rat. *Endocrinology* 99: 1063-1069, 1976.
- 76.- Luine, V.N., McEwen, B.S.: Effects of an estrogen antagonist on enzyme activities and (³H) estradiol nuclear binding in uterus, pituitary and brain. *Endocrinology* 100: 903-910, 1977.
- 77.- McCann, S.M.: Effect of hypothalamic lesions on the adrenal cortical response to stress in the rat. *Am. J. of Physiol.* 175: 13-20, 1953.
- 78.- Bogdanove, E.M., Spirtos, B.N., Halmi, N.S.: Further observations on pituitary structure and function in rats bearing hypothalamic lesions. *Endocrinology* 57: 302-315, 1955.
- 79.- McCann, S.M., Friedman, H.M.: The effect of hypothalamic lesions on the secretion of luteotrophin. *Endocrinology* 67: 597-608, 1960.
- 80.- Bishop, W.L., Fawcett, C.P., Krulich, L., McCann, M.S.: Acute and chronic effects of hypothalamic lesions on the release of FSH, LH and prolactin in intact and castrated rats. *Endocrinology* 91: 643-656, 1972.
- 81.- McEwen, B.S., Pfaff, D.W.: Factors influencing sex hormone uptake

- by rat brain regions. I. Effects of neonatal treatment, hypophysectomy, and competing steroid on estradiol uptake. *Brain Res.* 21: 1-16, 1970.
- 82.- Ginsburg, M., Greenstein, B.D., MacLusky, N.J., Morris, I.D., Thomas, P.J.: An improved method for the study of high-affinity steroid binding: oestradiol binding in brain and pituitary. *Steroids* 23: 773-792, 1974.
- 83.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 84.- De Nicola, A.F., von Lawzewitsch, I., Kaplan, S.E., Libertun, C.: Biochemical and ultrastructural studies on estrogen-induced pituitary tumors in F₃₄₄ rats. *J. Natl. Cancer* 61: 753-763, 1978.
- 85.- Kaplan, S.E., De Nicola, A.F.: Protein and RNA synthesis in pituitary tumors from F₃₄₄ rats given implants of estrogen. *J. Natl. Cancer Inst.* 56: 37-41, 1976.
- 86.- Libertun, C.: Radioinmunoanálisis de glicoproteínas, proteínas y péptidos. En: *Radioinmunoanálisis*. Ed. López Ed., Buenos Aires, 1980.
- 87.- Arakelian, M.C., Libertun, C.: H₁ and H₂ receptor participation in the brain control of prolactin secretion in lactating rats. *Endocrinology* 100: 890-895, 1977.
- 88.- Niswender, G.D., Midgley, A.R., Monroe, S.E., Reichert, L.E.: Radioimmunoassay of rat luteinizing hormone with anti-ovine LH serum and ovine LH-¹³¹I. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128: 807-811, 1968.

- 89.- Eisenfeld, A.J.: ^3H -estradiol: "in vitro" binding to macromolecules from the rat hypothalamus, anterior pituitary and uterus. *Endocrinology* 86: 1313-1318, 1970.
- 90.- Vreeburg, J.T.M., Schretlen, P.J.M., Baum, M.J.: Specific, high-affinity binding of $^{17}\beta$ -estradiol in cytosols from several brain regions and pituitary of intact and castrated adult male rats. *Endocrinology* 97: 969-977, 1975.
- 91.- Libertun, C., Kaplan, S.E., De Nicola, A.F.: Progesterone negative feedback on prolactin secretion: importance of the brain control and of estradiol. *Neuroendocrinology* 28: 64-70, 1979.
- 92.- McCann, S.M., Dhariwal, A.P.S., Porter, J.C.: Regulation of the adenohypophysis. *Annu. Rev. Physiol.* 30: 589-640, 1968.
- 93.- Stumpf, W.E.: Cellular and subcellular (^3H) estradiol localization in the pituitary by autoradiography. *Z. Zellforsch Mikrosk Anat.* 92: 23-33, 1968.
- 94.- Meites, J., Clemens, J.A.: Hypothalamic control of prolactin secretion. *Vitam Horm* 30: 166-221, 1972.
- 95.- Sinha, Y.N., Tucker, H.A.: Pituitary prolactin content and mammary development after chronic administration of prolactin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128: 84-88, 1968.
- 96.- Nakayama, I., Nickerson, P.A.: Suppression of anterior pituitary in rats bearing a transplantable growth hormone and prolactin secreting tumor (MtT-W10). *Endocrinology* 92: 516-524, 1973.

- 97.- Winters, S.J., Loriaux, D.L.: Suppression of plasma luteinizing hormone by prolactin in the male rat. *Endocrinology* 102: 864-868, 1978.
- 98.- Frantz, W.L., Payne, P., Dombrosky, O.: Binding of ovine ^{125}I -prolactin to cultured anterior pituitary tumor cells and normal cells. *Nature* 255: 636-638, 1975.
- 99.- Walsh, R.J., Posner, B., Kopriwa, B., Brawer, J.R.: Prolactin binding sites in the rat brain. Program of the 60th Annual Meeting of The Endocrine Society, Miami, FL, p. 359 (Abstract).
- 100.- Everett, J.W.: Lutetrophic function of autografts of the rat hypophysis. *Endocrinology* 54: 685-690, 1954.
- 101.- McCann, S.M., Kalra, S.P., Kalra, P.S., Bishop, W., Donoso, A.O., Schneider, H.P.G., Fawcett, C.P., Krulich, L.: En "Brain Endocrine Interaction. Median eminence: Structure and Functions". K.M. Knigge, D.E. Scott, S. Weindl (eds.), S. Karger, Basel, p. 224, 1972.
- 102.- Roy, E.J., McEwen, B.S.: An exchange assay for estrogen receptors in cell nuclei of the adult rat brain. *Steroids* 30: 657-669, 1977.
- 103.- Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62: 315-323, 1956.
- 104.- Flückiger, E., del Pozo, E.: Influence on the endocrine system. En: *Ergot Alkaloids and Similar Compounds, Handbook of Experimental Pharmacology*, editores: B. Berde and H.O. Schild. Springer Verlag, Berlin,

(en prensa).

- 105.- Singh, P., Muldoon, T.G.: A direct effect of LHRH on anterior pituitary estrogen receptors in the female rat. *J. Steroid Biochem.* 16: 31-37, 1982.
- 106.- Clark, C.R., MacLusky, N.J., Naftolin, F.: Unfilled nuclear oestrogen receptors in the rat brain and pituitary gland. *J. Endocr.* 93: 327-338, 1982.
- 107.- MacLeod, R.M.: Regulation of prolactin secretion. En: Martini, L., Ganong, W.F. (eds): *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press, New York, vol 4: 169-194, 1976.
- 108.- Libertun, C., Larrea, G.A., Vacas, M.I., Cardinali, D.P.: Dihydroergocryptin binding in anterior pituitary and prolactin secretion: further evidence of brain regulation of adenohipophysial receptors. *Endocrinology* 107: 1905-1909, 1980.
- 109.- Fuxe, K., Fredholm, B.B., Ogren, S.E., Agnati, L.F., Hökfelt, T., Gustaffson, J.A.: Pharmacological and biochemical evidence for the dopamine agonistic effect of bromocriptine. *Acta Endocrinol, Suppl.* 216, 88: 27-56, 1978.
- 110.- McCann, S.M., Dhariwal, A.P.S.: Hypothalamic releasing factors and the neurovascular link between the brain and the anterior pituitary. En: Martini, F., Ganong, W.F. (eds). *Neuroendocrinology* Academic Press, New York, p. 261, 1966.

- 111.- Zanini, A., Giannattasio, G., de Camili, P., Panerai, A.E., Muller, E.E., Meldolesi, J.: Studies on rat pituitary homografts. I. "In vitro" biosynthesis and release of growth hormone and prolactin. *Endocrinology* 194: 226-236, 1979.
- 112.- Chen, C.L., Amenomori, Y., Lu, K.H., Voogt, J.L., Meites, J.: Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions. *Neuroendocrinology* 6: 220-227, 1970.
- 113.- Chamness, G.C., Costlow, M.E., McGuire, W.L.: Estrogen receptor in rat liver and its dependence on prolactin. *Steroids* 26: 363-371, 1975.
- 114.- Carrillo, A.J., Steger, R.W., Chamness, G.C.: Dopaminergic stimulation of pituitary but not hypothalamic estrogen receptors in ovariectomized rats. *Endocrinology* 112: 1839-1846, 1983.
- 115.- Chieri, R.A., Pivetta, O.H., Foglia, V.G.: Altered ovulation pattern in experimental diabetes. *Fertil. Steril.* 20: 661-666, 1969.
- 116.- Shipley, E.G., Danley, K.S.: Pituitary and ovarian dysfunction in experimental diabetes. *Am. J. Physiol.* 150: 84-94, 1947.
- 117.- Foglia, V.G., Borghelli, R.F., Chieri, R.A., Fernandez-Collazo, E.L., Spindler, M.D., Wesely, M.D.: Sexual disturbances in the diabetic rat. *Diabetes* 12: 231-237, 1963.
- 118.- Liu, F.T.Y., Lin, H.S., Johnson, D.C.: Serum FSH, LH and the ovarian response to exogenous gonadotropins in alloxan diabetic immature female rats. *Endocrinology* 91: 1172-1179, 1972.

- 119.- Denari, J.H., Rosner, J.M.: Sexual steroid uptake in the alloxanized diabetic rat. *Steroids Lipids Res.* 130: 151-155, 1972.
- 120.- Gentry, R.T., Wade, G.N., Blaustein, J.D.: Binding of (³H)-estradiol by brain cell nuclei and female rat sexual behavior: inhibition by experimental diabetes. *Brain Res.* 135: 135-146, 1977.
- 121.- Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E., Renold, A.E.: Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126: 201-205, 1967.
- 122.- Weisenberg, L., De Nicola, A.F., Arakelian, M.C., Libertun, C.: Effect of median eminence lesions on (³H) estradiol binding in the anterior pituitary and hypothalamus. *Endocrinology* 105: 1152-1157, 1979.
- 123.- Fridman, O., Foglia, V.G., De Nicola, A.F.: Reduction in (³H) corticosterone binding to cytoplasmic receptors in the brain of diabetic rats. *J. Steroid Biochem.* 9: 609-614, 1978.
- 124.- McEwen, B.S., Zigmond, R.E.: Isolation of brain cell nuclei. In: *Research methods in neurochemistry*, Vol 1, Marks, N., Rodnight, R. (eds.) Plenum Press, New York, p. 140-161, 1972.
- 125.- Mc Clusky, N.J., Chaptal, C., Lieberburg, I., McEwen, B.S.: Properties and subcellular inter-relationships of presumptive estrogen receptor macromolecules in the brains of neonatal and prepubertal female rats. *Brain Res.* 114: 158-165, 1976.
- 126.- Clark, J.H., Peck, E.J.: Nuclear retention of receptor-oestrogen

- complex and nuclear acceptor sites. *Nature* 260: 635-637, 1976.
- 127.- Fink, G.: Neuroendocrine control of gonadotrophin secretion. *Br. Med. Bull.* 35: 155-160, 1979.
- 128.- Kirchick, H.J., Keyes, P.L., Frye, B.E.: Etiology of anovulation in immature alloxan-diabetic rat treated with pregnant mare's serum gonadotropin: absence of the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 102: 1867-1873, 1978.
- 129.- De Nicola, A.F., Fridman, O., Del Castillo, E.J., Foglia, V.G.: Abnormal regulation of adrenal function in rats with streptozotocin diabetes. *Horm. Metab. Res.* 9: 469-473, 1977.
- 130.- Howland, B.E., Zebrowski, E.J.: Some effects of experimentally-induced diabetes on pituitary-testicular relationships in rats. *Horm. Metab. Res.* 8: 465-469, 1976.
- 131.- Kirchick, H.J., Keyes, P.L. y Frye, B.E.: An explanation for anovulation in immature alloxan-diabetic rat treated with pregnant mare's serum gonadotropin: reduced pituitary response to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 105: 1343-1349, 1979.
- 132.- Coirini, H., Weisenberg, L., Tornello, S., De Nicola, A.F.: Effect of experimental diabetes on estradiol binding by the anterior pituitary and hypothalamus in ovariectomized rats. *Experientia* 36: 683-684, 1980.
- 133.- Kirkland, J.L., Barret, G.N., Stancel, G.M.: Decreased cell division

- of the uterine luminal epithelium of diabetic rats in response to 17β -estradiol. *Endocrinology* 109: 316-318, 1981.
- 134 .- De Hertogh, R., Ekka, E., Vanderheyden, I.: Estrogen receptor and stimulation of uterine protein synthesis in ovariectomized diabetic rats infused intravenously with 17β -estradiol. *Endocrinology* 110: 741-748, 1982.
- 135 .- Ekka, E., Vanderheyden, I., De Hertog, R.: Oestrogen receptors and oestrogen-induced protein synthesis in the uterus of diabetic rats. *Diabetologia* 20: 578-582, 1981.
- 136 .- Naess, O., Attramadal, A.: Progesterin receptors in anterior pituitary and hypothalamus of male rats. *Int. J. Androl. suppl.* 2: 175-183, 1978.
- 137 .- Fridman, O., Fleming, H., Gurside, E.: Variability of levels of specific estrogen binding in a human endometrial adenocarcinoma cell line. *J. Steroid Biochem.* 16: 607-612, 1982.
- 138 .- Korenman, S.G., Stevens, R.H., Carpenter, L.A., Robb, M., Niswender, G.D., Sherman, M.B.: Estradiol radioimmunoassay without chromatography: procedure, validation and normal values. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 718-720, 1974.
- 139 .- Becu, D., Libertun, C.: Comparative maturation of the regulation of prolactin and thyrotropin by serotonin and thyrotropin-releasing hormone in male and female rats. *Endocrinology* 110: 1978-1884, 1982.

- 140.- Moguilevsky, M., Raynaud, J.P.: Estrogen-sensitive progestin-binding sites in the female rat brain and pituitary. *Brain Res.* 164: 165-175, 1979.
- 141.- Chen, C.L., Meites, J.: Effect of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* 86: 503-505, 1970.
- 142.- Pavlik, E.J., Coulson, P.B.: Modulation of estrogen receptors in four different target tissues: differential effects of estrogen vs. progesterone. *J. Steroid Biochem.* 7: 369-376, 1976.
- 143.- Bestetti, G., Rossi, G.L.: Hypothalamic lesions in rats with long-term Streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Neurophatol.* 52: 119-127, 1980.
- 144.- Tornello, S., Fridman, O., Weisenberg, L., Coirini, H., De Nicola, A.F.: Differences in corticosterone binding by regions of the central nervous system in normal and diabetic rats. *J. Steroid Biochem.* 14: 77-81, 1981.
- 145.- Tesone, M., Oliveira-Filho, R.M., Biella de Souza Valle, L., Calvo, J.C., Barañao, J.L.S., Foglia, V.G., Charreau, E.H.: Androgen receptors in the diabetic rats. *Diabetologia* 18: 385-390, 1980.

- 146.- Jungblutt, P.W., Kallweit, E., Sierralta, W., Truitt, A.J., Wagner, R.K.: The occurrence of steroid-free, "activated" estrogen receptors in target cell nuclei. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359: 1259-1268, 1978.
- 147.- Levy, C., Mortel, R., Eychenne, B., Robel, P., Baulieu, E.E.: Unoccupied nuclear oestradiol-receptor sites in normal human endometrium. Biochem. J. 185: 733-738, 1980.
- 148.- White, J.O., Lim, L.: Unoccupied nuclear oestrogen receptors in the female rat hypothalamus. Biochem. J. 190: 833-837, 1980.
- 149.- Garola, R.E., McGuire, W.L.: An improved assay for nuclear estrogen receptor in experimental and human breast cancer. Cancer Res. 37: 3333-3337, 1977.
- 150.- Weisenberg, L., Fridman, O., Libertun, C., De Nicola, A.F.: Changes in nuclear translocation of estradiol-receptor complex in anterior pituitary and uterus of rats with streptozotocin diabetes. J. Steroid Biochem. 19: 1737-1741, 1983.
- 151.- Tornello, S., Orti, E., Weisenberg, L., De Nicola, A.F.: Regulation of adenosine-3', 5'- monophosphate levels in rat anterior pituitary by adrenal corticoids. Metabolism 33: 224-229, 1984.

- 152.- Kovacs, W.J., Griffin, J.E., Wilson, J.D.: Transformation of human androgen receptors to the deoxyribonucleic acid-binding state. *Endocrinology* 113: 1574-1581, 1983.
- 153.- Jordan, V.C., Loerner, S. Robison, C.: Inhibition of oestrogen-stimulated prolactin release by anti-oestrogens. *J. Endocrinology* 65: 151-152, 1975.
- 154.- Roy, E.J., MacLusky, N.J., McEwen, B.S.: Antiestrogen inhibits the induction of progestin receptors by estradiol in the hypothalamus-preoptic area and pituitary. *Endocrinology* 104: 1333-1336, 1979.
- 155.- Umans, R.S., Weichselbaum, R.R., Johnson, C.M., Little, J.B.: Effects of estradiol concentration on levels of nuclear estrogen receptors in MCF-7 breast tumor cells. *J. Steroid Biochem.* 20: 605-609, 1984.
- 156.- Manni, A., Baker, R., Arafah, B.M., Pearson, O.H.: Uterine oestrogen and progesterone receptors in the ovariectomized rat. *J. Endocr.* 91: 281-287, 1981.
- 157.- Phelps, C., Hymer, W.C.: Characterization of estrogen-induced adenohypophyseal tumors in the Fischer 344 rat. *Neuroendocrinology* 37: 23-31, 1983.

- 158.- Farquhar, M.G., Rinehart, J.F.: Electron microscopic studies of anterior pituitary gland of castrate rats. *Endocrinology* 54: 516-541, 1954.
- 159.- Roy, E.J., McEwen, B.S.: Oestrogen receptors in cell nuclei of the hypothalamus-preoptic area-amygdala following an injection of oestradiol or the antioestrogen CI-628. *J. Endocr.* 83: 285-293, 1979.
- 160.- Martin, P.M., Sheridan, P.J.: Towards a new model for the mechanism of action of steroids. *J. Steroid Biochem.* 16: 215-229, 1982.
- 161.- Le Fevre, B., Bailly, A., Sallas, N., Milgrom, E.: Activated steroid-receptor complex. Comparison of assays using DNA cellulose or homologous nuclei. *Biochem. Biophys. Acta* 585: 266-272, 1979.
- 162.- Keefer, D.A.: "In vivo" estrogen uptake by individual cell types of the rat anterior pituitary after short-term castration-adrenalectomy. *Cell Tissue Res.* 209: 167-175, 1980.