

Tesis de Posgrado

Participación de la serotonina en la regulación de la secreción de la hormona luteinizante

Vitale, María Leiza

1986

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:

Vitale, María Leiza. (1986). Participación de la serotonina en la regulación de la secreción de la hormona luteinizante. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1995_Vitale.pdf

Cita tipo Chicago:

Vitale, María Leiza. "Participación de la serotonina en la regulación de la secreción de la hormona luteinizante". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1995_Vitale.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

PARTICIPACION DE LA SEROTONINA EN
LA REGULACION DE LA SECRECION DE
LA HORMONA LUTEINIZANTE.

MARIA LEIZA VITALE

DIRECTOR : DRA. SARA R. CHIOCCHIO.

LUGAR DE TRABAJO : INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

— 1986 —

*Besis 1995
-ij.2*

A mis padres

A mis hermanas

A la Dra Sara R. Chioeclio

por su dedicación y estímulo

Quiero expresar mi agradecimiento

al Dr Juan H Tramezzani y al Dr Carlos Lautos
por su desinteresado asesoramiento para la
elaboración de esta Tesis

a mis compañeros de laboratorio María de
los Angeles Paivisi, Marcelo Villar, Carmen V
de Rodriguez e Gabriel L de Fariás por la
colaboración prestada en la realización
de los experimentos

a Rita y María Placenti por el impecable
trabajo de pasar a máquina el manus-
crito

al Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas por el otorgamiento
de las becas internas

INDICE

. COMENTARIOS PRELIMINARES	6
1. ANTECEDENTES HISTORICOS	8
2. OBJETIVOS	50
3. MATERIALES Y METODOS	52
4. ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE LA SEROTONINA DURANTE EL CICLO ESTRAL	84
5. EFECTO DE LA SEROTONINA SOBRE LA SECRECIÒN "IN VITRO" DE LH	101
6. LESION DEL NUCLEO DORSAL DEL RAPE SUS CONSECUENCIAS SOBRE EL CICLO ESTRAL Y LA SECRECIÒN DE LAS GONADOTROFINAS Y PROLACTINA	127
7. CONCLUSION	148
8. ABREVIATURAS	153
9. BIBLIOGRAFIA	155
10. INDICE GENERAL	193

COMENTARIOS PRELIMINARES

Las investigaciones llevadas a cabo en la década del sesenta acerca de la distribución de los neurotransmisores aminérgicos en el sistema nervioso central permitieron la detección de serotonina (5-HT) en el hipotálamo. Por ese entonces, el hipotálamo ya había sido vinculado con el control de la secreción de las gonadotrofinas hipofisarias; en consecuencia, el hallazgo de 5-HT en esta región se interpretó como una posible relación entre el neurotransmisor y la mencionada secreción hormonal.

Los primeros datos experimentales que apoyaron esta hipótesis se refieren al hallazgo de alteraciones en la ovulación inducida, producidas por la administración de 5-HT y, a la inhibición de la liberación de la hormona luteinizante (LH) en un sistema "in vitro" debido a la presencia de 5-HT en el medio de incubación. Estas observaciones dieron origen a una relativamente abundante bibliografía que avala la existencia de una correlación entre la actividad del sistema serotoninérgico y la secreción de LH. Así, y de acuerdo con lo descrito en estos trabajos, la administración sistémica o intraventricular de 5-HT, la inhibición de su síntesis, recaptación o degradación, el bloqueo de sus receptores y la estimulación o lesión de las neuronas serotoninérgicas alteran la descarga de LH. Asimismo, también se observaron cambios en el

metabolismo de 5-HT asociados a la descarga de la hormona.

No obstante, y a pesar de que estas observaciones sugieren y hasta podría decirse que aseguran la participación de la 5-HT en el control de la secreción de LH, no hay consenso cuando se le debe asignar a este neurotransmisor una función y sitio de acción.

El objetivo del presente trabajo de Tesis es tratar de dilucidar estas características de la participación de la 5-HT en el control de la liberación de LH, utilizando un modelo que reúna las condiciones óptimas para el estudio de los mecanismos nerviosos que regulan la secreción de esta hormona. En este sentido, la descarga preovulatoria de LH cumple con tales requisitos; por tanto, se escogió como modelo el ciclo estral de la rata. En estas condiciones se intentará responder a los siguientes interrogantes:

¿Participa la serotonina en la regulación de la secreción preovulatoria de LH?

¿A qué nivel ocurre esta participación? ¿Su efecto es estimulador o inhibitorio?

¿Cuál es la importancia fisiológica de la serotonina en la regulación de la secreción preovulatoria de LH?

1. ANTECEDENTES HISTORICOS

En los primeros años de este siglo se comenzó a relacionar a la hipófisis con el control de la actividad ovárica como resultado indirecto de estudios sobre las alteraciones morfológicas de la glándula pituitaria luego de la castración (Fichera, 1905; Fee y Parkes, 1929, 1930). Poco después, Long y Evans (1922) demostraron definitivamente este concepto, realizando un experimento clásico: la inducción de la ovulación en conejos mediante la inyección de extractos hipofisarios (Everett, 1978).

La ingerencia del sistema nervioso central (SNC) en el control de la fisiología ovárica se comprendió, años más tarde, al observarse que la ovulación podía ser inducida por la estimulación eléctrica del cerebro (Marshall y Verney, 1936) y, más específicamente, del hipotálamo (Haterius y Derbyshire, 1937; Harris, 1937). Este resultado originó una serie de estudios destinados a desentrañar los mecanismos nerviosos que comandan la actividad hormonal hipofisaria cuya finalidad es la ovulación.

Hinsey y Markee hallaron, en el año 1933, que la sección del tronco simpático que inerva la glándula pituitaria no alteraba la ovulación refleja. Propusieron la existencia de algún factor nervioso que, proveniente de la "pars nervosa" de la glándula pituitaria, pasaba a la "pars distalis" donde

actuaba "hormonalmente" regulando la actividad ovuladora de la hipófisis. Simultáneamente, la descripción del sistema de vasos porta hipotálamo-hipofisario (Popa y Fielding, 1930) y la dirección de su flujo sanguíneo desde la base del cerebro hacia la hipófisis (Houssay y col., 1935; Wislocki y King, 1936) llevaron a sugerir a la circulación portal como la vía de acceso de los mensajes nerviosos a la "pars distalis".

Del conjunto de estos conceptos surgió la teoría neurohumoral de la regulación hipofisaria que, ya en el año 1948, contaba con numerosas evidencias experimentales (Harris, 1948) y que más tarde recibió el inestimable apoyo de la descripción de la neurosecreción (Bargmann, 1949; Scharrer y Scharrer, 1940, 1954).

Algunos años después, McCann y sus colaboradores, utilizando un bioensayo, hallaron en el hipotálamo y en la eminencia media una actividad liberadora de la hormona luteinizante (LH) (McCann y col., 1960) y la postularon como posible estimulante fisiológico de la secreción de esta hormona (McCann, 1962). La sustancia fue posteriormente purificada, secuenciada y sintetizada químicamente (Burgus y Guillemin, 1970; Schally y col., 1971; Matsuo y col., 1971; Schally y col., 1973). Se la denominó hormona hipotalámica liberadora de LH (LH-RH, del inglés: luteinizing hormone-releasing hormone).

La secreción de LH-RH es la señal nerviosa final de la cascada de pasos relacionados con la liberación de las gonadotropinas hipofisarias.

La regulación de la secreción de LH-RH es sumamente compleja. Intervienen en ella factores humorales periféricos, entre los que se cuentan los esteroides gonadales (Sherwood y col., 1976; Apfelbaum y Taleisnik, 1976), factores hormonales locales que llegan a través del líquido cefalorraquídeo (Rodríguez, 1976) y aferencias nerviosas a las neuronas peptidérgicas (LH-RH), pudiendo ser estas aferencias tanto extra como intrahipotalámicas.

Todavía se desconocen los circuitos nerviosos que participan en la regulación de la secreción de LH-RH. Tampoco se tiene seguridad acerca de la naturaleza química de los mediadores que intervienen en la transferencia de información desde las aferencias nerviosas a la neurona productora de LH-RH.

Los primeros sistemas de neurotransmisores en ser relacionados con el control central de la liberación de las gonadotropinas fueron el adrenérgico y el colinérgico (Sawyer y col., 1947, 1949; Everett y col., 1949).

A partir de los años 60, se comenzó a dar importancia al sistema serotoninérgico como posible integrante de los

mecanismos de control de la secreción de LH (O'Steen, 1964; Lippman, 1968). Sin embargo, a pesar de que durante los últimos años ha sido incesante la publicación de trabajos que relacionan a la serotonina con la secreción de LH, no se ha resuelto aún el problema de la identificación del sitio, tipo y modo de acción de este neurotransmisor ni de la importancia fisiológica de su participación en este fenómeno neuroendócrino.

1.1. HORMONA HIPOTALÁMICA LIBERADORA DE LH (LH-RH)

1.1.1. Biosíntesis y catabolismo

El LH-RH fue una de las primeras hormonas hipotalámicas que se aisló y cuya estructura química fue inmediatamente determinada (Matsuo y col., 1971; Schally y col., 1973). Es un decapeptido que presenta en su extremo C-terminal un ácido piroglutámico. La neurohormona se sintetiza en los ribosomas ubicados en los cuerpos neuronales, en la forma de un prepropeptido de un peso molecular de 10.000 Daltons (Seeburg y Adelman, 1984). Con la pérdida del péptido señal que se encuentra en el extremo C-terminal se transforma en un propeptido que contiene: la secuencia de los diez aminoácidos del LH-RH; una secuencia de tres aminoácidos (Gly-Lys-Arg) que corresponde a una señal típica del procesamiento de una prohormona y es necesaria para el clivaje enzimático (Gubler y col., 1982) y, finalmente, en el extremo N-terminal, 56 aminoácidos que dan origen a un péptido denominado GAP (Gn-RH Associate Peptide) (Seeburg y Adelman, 1984; Nikolics y col., 1985). Este "GAP", recientemente aislado, tiene actividad liberadora de gonadotrofinas pero inhibe la secreción de prolactina a nivel hipofisario (Nikolics y col., 1985). El proceso de maduración del propeptido se realizaría a lo largo del axón (King y Anthony, 1983, 1984). El LH-RH se almacena en vesículas secretoras de los terminales nerviosos de la

eminencia media (Goldschmidh y Ganong, 1975; Barnea y col., 1976; Pelletier y col., 1976).

Peptidasas presentes en varias regiones cerebrales y en la hipófisis degradan a la molécula de LH-RH. Los productos de degradación aislados son: (1-6)LH-RH, (1-4)LH-RH, (7-10)LH-RH, (1-9)LH-RH y glicinamida; también se han descrito formas acetiladas que tendrían una actividad biológica diferente de la del péptido original (Griffith y McDermott, 1984). Recientemente se ha purificado de hipófisis bovinas dos endopeptidasas que hidrolizan uniones específicas de la molécula. Algunos autores proponen a estos pasos del catabolismo de LH-RH como integrantes de los mecanismos que regulan la liberación y acción de la neurohormona (McDermott y col., 1982). En el plasma la degradación también involucra dos endopeptidasas, aparentemente diferentes de las hipofisarias y cerebrales (McDermott y col., 1982).

Debido a su pequeño tamaño, la molécula de LH-RH carece de estructura secundaria definida, pues, de acuerdo a los datos provenientes de estudios de resonancia magnética nuclear y carbono 13, no habría uniones puente hidrógeno intramoleculares y los enrollamientos al azar serían los predominantes (Dence, 1980).

El LH-RH estimula la secreción de LH y de FSH por lo que se ha sugerido que sólo existe un factor que regula la

liberación de ambas gonadotrofinas (Shahmnezh y Jeffcoate, 1976). No obstante, como son varias las condiciones fisiológicas y experimentales en las cuales se disocia la secreción de LH y de FSH, muchos investigadores especulan aún con la existencia de un FSH-RH (Igarashi y McCann, 1964; Chappel y Barraclough, 1976; Lumpkin y McCann, 1979, 1984).

1.1.2. Localización en el sistema nervioso central

El desarrollo de un estudio sobre el control nervioso de la secreción de LH requiere del conocimiento preciso de la localización de las neuronas que sintetizan LH-RH. Por esto, desde el mismo momento en que esta neurohormona fue hallada en extractos hipotalámicos, se dedicaron muchas horas de investigación para obtener la información necesaria acerca de la distribución de los cuerpos y axones de estas neuronas peptidérgicas.

Al aplicarse técnicas bioquímicas y radioinmunológicas, se ubicó la mayor proporción de LH-RH en el tallo hipofisario, en la eminencia media y en zonas más rostrales como el septum, el área preóptica y el núcleo supraquiasmático (Palkovits y col., 1974; Wheaton y col., 1975; Selmanoff y col., 1980). Estas técnicas proveen información sobre la cantidad de LH-RH presente en cada una de las regiones estudiadas, pero no permiten ubicar las zonas donde se sintetiza el

péptido ni los haces que forman los axones de las neuronas. El desarrollo de métodos inmunocitoquímicos y de transporte retrógrado y, la utilización de aminoácidos radiactivos facilitó el estudio de la organización del sistema LH-RH. Varios grupos contribuyeron al conocimiento que actualmente se tiene sobre la distribución de las neuronas que sintetizan y secretan LH-RH en el sistema nervioso de diferentes mamíferos: (King y Anthony, 1984; Anthony y col., 1984) o en una especie en particular: rata (Sétáló y col., 1975; Witkin y col., 1982) conejillo de Indias (Barry y col., 1974; Mazzuca y Dubbis, 1974; Silverman y Krey, 1978), hamster dorado (Jennes y Stumpf, 1980), ratón (Naik, 1975), monos (Barry y Carette, 1975; Silverman y col., 1977) y oveja (Adris y col., 1985).

En la rata, las neuronas productoras de LH-RH son generalmente fusiformes (10 μ m). Los somas de las células se distribuyen difusamente en una región que está comprendida entre el bulbo olfatorio accesorio y el área retroquiasmática del hipotálamo. La mayoría se aglomera en el núcleo del lecho de la banda diagonal de Brocca, en la zona ventral del núcleo intersticial de la "stria terminalis", en el núcleo septal medio, en el área preóptica media y en los núcleos periventricular y supraquiasmático preópticos (Sétáló y col., 1978; Witkin y col., 1982; Shivers y col., 1983). Algunos autores

han observado células que sintetizarían LH-RH en el núcleo supraquiasmático y en el área hipotalámica anterior (Schneider y col., 1969; Sétáló y col., 1976 a; Shivers y col., 1983). En la rata no hay neuronas que sinteticen LH-RH en el hipotálamo basal, pues no sólo no han sido detectadas (Sétáló y col., 1975; King y Anthony, 1984) sino que la desafe-rentación del hipotálamo a la altura del núcleo supraquiasmático produce la desaparición total de la inmunorreactividad por detrás del corte (Palkovits, 1979).

El sistema de fibras de LH-RH que inerva la eminencia media tiene su origen en los cuerpos neuronales del septum medio-caudal y del área preóptica-supraquiasmática (Merchenthaler y col., 1980). Estos mismos autores sugieren la existencia de tres fascículos: medio, mediano y lateral (el más importante) y de un pequeño haz de fibras contralaterales. La mayoría de los axones corren por la cara ventral del hipotálamo y terminan en la capa externa de la eminencia media a nivel de los capilares del plexo hipotálamo-hipofisario, aunque también se describen fibras que corren paralelas al piso del tercer ventrículo y que terminan en la capa subependimaria (Kordon y col., 1974; Melrose y Knigge, 1985). A medida que las fibras ingresan por la parte rostral de la eminencia media divergen progresivamente. En la rata muy pocas fibras alcanzan el tallo hipofisario y prácticamente ninguna

proyecta a la neurohipófisis (Anthony et al., 1984). Apoyando la hipótesis de los fascículos, Selmanoff (1981) encontró mayor concentración de LH-RH en la zona lateral de la eminencia media que en su zona media.

Este sistema de neuronas se denomina preóptico-supraquiasmático-tuberoinfundibular; consiste, además, en una verdadera unidad funcional: síntesis (septum-área preóptica-supraquiasmática), transporte (área retroquiasmática), almacenamiento y secreción (eminencia media) (Merchenthaler y col., 1980).

Si bien este sistema sería el único conjunto de neuronas LH-RH organizado como fascículo, la eminencia media no es de ninguna manera la sola estructura que recibe inervación de fibras que contienen LH-RH. Algunas de las fibras que se originan en las áreas más rostrales inervan el bulbo olfatorio, la habénula, la amígdala y el hipocampo. También se han observado fibras descendentes que, siguiendo el camino del fascículo prosencefálico medio, llegan al complejo mamilar, y continúan aún más caudalmente (Samson y col., 1980).

Los axones que parten de las neuronas ubicadas en la vecindad de la "stria terminalis", en el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT) y en el núcleo supraquiasmático preóptico, inervan el OVLT terminando en los capilares del sistema porta de este órgano circunventricular (Sétáló y col., 1976 b; Witkin y col., 1982). Después de la eminencia media,

el OVLТ presenta la más alta concentración de LH-RH en el SNC (Selmanoff y col., 1980). Sin embargo, parecería no tener participación en la descarga preovulatoria de gonadotrofinas pues, aunque algunos autores encontraron durante el ciclo una modificación de la concentración de LH-RH en el OVLТ (Sétáló y col., 1976 b; Wenger y Leonardelli, 1980), otros no observaron ninguna variación (Baker y Dermody, 1976; Kobayashi y col., 1978; Krause, 1979). Además, la desaferentación hipotalámica que bloquea totalmente la ovulación no altera la concentración del péptido en este órgano (Weiner y col., 1975).

1.1.3. Control nervioso de la secreción de LH-RH

Uno de los mecanismos que regulan la actividad de las neuronas que sintetizan y liberan LH-RH es la integración de las aferencias nerviosas que, provenientes de diferentes zonas del SNC, llegan a las distintas partes del sistema pre-óptico-supraquiasmático-tuberoinfundibular. En este sentido es importante conocer tanto cuáles son los neurotransmisores involucrados como los circuitos nerviosos a los que pertenecen.

La región donde están ubicados los cuerpos celulares de las neuronas peptidérgicas tiene conexiones con los sistemas visual y olfatorio; con el sistema límbico, específicamente

con la amígdala, el septum y el hipocampo; con el mesencéfalo y con el hipotálamo (Nauta y Haymaker, 1969). Todas estas estructuras extrahipotalámicas ejercerían diferentes influencias sobre el control de la secreción de LH ya sea regulando directamente la secreción de LH-RH o bien mediando estímulos ambientales como la duración del período de luz, respuesta a las feromonas, etc.

La ingerencia que tienen los mecanismos visuales sobre la secreción gonadal y la duración y el mantenimiento del ciclo estral se conoce desde el comienzo de la investigación de los mecanismos de reproducción (Browman, 1937; Everett, 1970). La interacción entre el sistema visual y la secreción de LH se realizaría a través del haz de fibras retino-hipotalámicas que son independientes de la corteza visual (Moore y Lenn, 1972; Hendrikson y col., 1972), y estaría mediada por la glándula pineal (Preslock, 1984).

Los estímulos olfatorios también serían importantes en la regulación de la actividad reproductora (Whiten y Champlin, 1973; Tyler y Gorski, 1980). En este caso la conexión principal se origina en el bulbo olfatorio accesorio quien proyecta a la amígdala y al núcleo del lecho de la "stria terminalis". Entre las evidencias que involucran al sistema olfatorio con los mecanismos de reproducción se encuentra la observación de que el olor del macho puede inducir la

ovulación en ratas que eran anovulatorias por exposición a la luz continua (Johns y col., 1978) y, el hecho de que la estimulación del bulbo olfatorio incrementa la secreción de LH (Beltramino y Taleisnik, 1979).

El sistema límbico y la región preóptica-hipotalámica están conectados entre sí a través del fascículo prosencefálico medio, a través de la "stria terminalis" (amígdala) y por medio de las fibras precomisurales del triángulo (hipocampo). Diferentes grupos de investigadores han examinado la participación del sistema límbico en la regulación de la secreción de LH (Riss y col., 1963; Everett y col., 1964; Velasco y Taleisnik, 1969 a; Kimura y Kawakami, 1978). La estimulación de la zona media de la amígdala induce ovulación (Velasco y Taleisnik, 1969 b) y liberación de gonadotrofinas (Kawakami y col., 1973). También se ha descrito que la estimulación de la amígdala media durante el proestro (antes del período crítico) adelanta el pico preovulatorio de LH (Carrillo y col., 1977); en cambio, si la corriente se aplica en la zona basolateral, disminuye la magnitud de la descarga (Carrillo y col., 1977). La lesión de la amígdala media o la transección de la "stria terminalis" en el proestro bloquea la ovulación, pero, eventualmente, los ciclos se reinician (Velasco y Taleisnik, 1971; Velasco, 1972).

La conexión entre el mesencéfalo y la región preóptica-hipotalámica se realiza a través del fascículo prosencefálico medio (Brodal, 1981). Este haz de fibras contienen una parte de los axones de las neuronas cuyos cuerpos celulares forman los núcleos aminérgicos del mesencéfalo. Mediante estudios electrofisiológicos y lesiones se han involucrado diferentes áreas del tronco encefálico en la regulación de la secreción de las gonadotrofinas (Carrer y Taleisnik, 1970).

La identidad de los neurotransmisores relacionados con la secreción de LH-RH está aún lejos de conocerse; sin embargo, muchas evidencias sugieren la participación de las monoaminas, de la histamina y de la acetilcolina (revisiones: McCann y Moss, 1976; Weiner y Ganong, 1978; Barraclough y Wise, 1982; Kalra y Kalra, 1983).

Las catecolaminas fueron unos de los primeros neurotransmisores en ser relacionados con los mecanismos nerviosos que regulan la ovulación (Sawyer y col., 1947); a la nora-drenalina (NA) se le atribuye una función estimulatoria, en cambio, para las otras dos catecolaminas, la dopamina (DA) y la adrenalina (A), los resultados experimentales son confusos, siendo difícil aún decir que efecto tienen.

En el hipotálamo (Donoso y Moyano, 1970) y, específicamente, en el núcleo supraquiasmático (Selmanoff y col., 1977) y en la eminencia media (Negro-Vilar y col., 1977) la

descarga preovulatoria de LH (Barraclough y Sawyer, 1957; Ratner, 1971), la inducida por los estrógenos y progesterona (Kalra y col., 1972) y la secreción pulsátil de LH característica de las ratas ovariectomizadas (Weick, 1978). Los inhibidores de la síntesis y del catabolismo de la NA también anulan el pico de LH inducido por el estradiol (Kalra y col., 1972; Kalra y McCann, 1974). En recientes trabajos se sugiere la posibilidad de que un componente β_2 -adrenérgico participe en la regulación nerviosa de la secreción preovulatoria de las gonadotrofinas (Al-Hamod y col., 1985).

Cuando se lesionan las neuronas noradrenérgicas cuyos axones proyectan al hipotálamo o, cuando se seccionan estas fibras, se modifica la secreción fásica y la secreción tónica de LH (Martinovic y McCann, 1977; Franci y Antunes-Rodríguez, 1985).

La participación de la dopamina en la regulación de la secreción de LH no parece ser tan clara, pues, se han descrito efectos tanto estimulatorios como inhibitorios e incluso nulos. Durante el comienzo de la secreción hormonal del proestro se advierte un incremento en la concentración de DA en la eminencia media (Negro-Vilar y col., 1977), aunque no se observa ninguna modificación cuando se induce la secreción de LH por administración de estradiol a ratas castradas (Wise y col., 1981). El "turnover" de la dopamina en

concentración de NA aumenta durante el período crítico de la secreción de LH. El "turnover" también experimenta un incremento en el sistema preóptico-supraquiasmático-tuberoinfundibular justamente cuando se verifican cambios en la concentración de LH-RH en estas zonas (Crowley y col., 1978; Rance y col., 1981; Coombs y Coen, 1983). Si este aumento del "turnover" se bloquea con fenobarbital no se produce la liberación de las gonadotrofinas ni la de prolactina. La secreción de LH inducida por estrógenos también está acompañada por un aumento de la actividad del sistema noradrenérgico (Wise y col., 1981); igualmente la retroalimentación negativa de los estrógenos sobre la secreción de LH involucraría a la noradrenalina del área preóptica (Johnston y col., 1984) y del hipotálamo medio basal (Adris y col., 1980).

La presencia de noradrenalina en el medio donde se incuban eminencias medias estimula significativamente la secreción de LH-RH, este efecto es anulado por un bloqueante α -adrenérgico como la fentolamina (Negro-Vilar y col., 1979). Estudios "in vitro" realizados recientemente sugieren la participación de la NA en el aumento de la sensibilidad hipotalámica e hipofisaria inducida por el estradiol, que se verifica durante el ciclo estral (Miyake y col., 1984).

La administración de agonistas α -adrenérgicos bloquea la

la eminencia media disminuye durante la liberación de LH-RH (Ahren y col., 1971; Rance y col., 1981).

En la incubación conjunta de hipófisis y eminencias medias, el agregado de DA estimula la liberación de LH (Schneider y McCann, 1970) o no tiene efecto (Quijada y col., 1973). Actuando sólo sobre las eminencias medias, la dopamina estimula la secreción de LH-RH (Negro-Vilar y col., 1979), aunque también se describieron inhibiciones (Fuxe y Höckfelt, 1970) o ausencia de efecto (Rotsztein y col., 1976; Lengyel y col., 1985). En sinaptosomas de hipotálamo de oveja la dopamina estimula la secreción de LH-RH (Bennett y col., 1975).

La inyección intraventricular de dopamina aumenta los niveles séricos de LH (Kamberi y col., 1970) mientras que la administración de agonistas los disminuye (Drouva y Gallo, 1976). Con el empleo de antagonistas dopaminérgicos tampoco se han obtenido resultados concluyentes (Drouva y Gallo, 1977). Evidentemente, la función que desempeña la dopamina en los mecanismos que regulan la secreción de LH es aún incierta; además, su estrecha relación con la secreción de prolactina dificulta la interpretación de los resultados.

En cuanto a la tercera catecolamina, la adrenalina, se sabe que su infusión en el tercer ventrículo restaura la ovulación en ratas bloqueada con Nembutal (Rubinstein y Sawyer, 1970) y adelanta la secreción preovulatoria de LH si la

infusión se realiza antes del período crítico (Kalra, 1985). Los inhibidores de la feniletanolamina-N-metiltransferasa, enzima que cataliza la síntesis de la adrenalina, suprimen la descarga preovulatoria de LH y la inducida por estrógenos (Crowley y Terry, 1981; Crowley y col., 1982; Coen y Coombs, 1983). La concentración de A y su "turnover" aumenta en el hipotálamo medio basal y en el área preóptica durante el período crítico del proestro (Sheaves y col., 1984).

El sistema colinérgico también estaría involucrado en la regulación de la secreción de las gonadotrofinas (Everett y col., 1949), pero esta relación todavía no ha sido suficientemente explorada. Kawakami y colaboradores (1979) observaron que el implante de acetilcolina en el área preóptica media de ratas ovariectomizadas aumentaba la descarga de LH inducida por estradiol. La inyección intraventricular de acetilcolina estimula la secreción de LH, efecto bloqueado por la atropina (Vijayan y McCann, 1980). El agregado del neurotransmisor al medio donde se incuban hipotálamos estimula la secreción de LH-RH (Richardson y col., 1982).

El estudio de la participación de otras sustancias aún se encuentra en sus principios. Neurotransmisores como la histamina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) no han acumulado muchas evidencias sobre una posible relación con la regulación de la secreción de LH; la mayoría de los trabajos se

refieren a la acción que ejercen sobre la liberación de prolactina. Para la histamina se han descrito efectos estimulatorios en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Libertun y McCann, 1976; Donoso y col., 1976) y en la secreción preovulatoria de LH (Donoso, 1978), aunque también se observó un efecto inhibitorio en machos (Donoso y Banzan, 1976). Los estudios referentes a un posible papel del GABA en la secreción de LH son ciertamente escasos, en general, se le atribuye un efecto inhibitorio a nivel de la secreción de LH-RH (Elias y col., 1982) posiblemente mediando la retroalimentación negativa de los estrógenos (Fuchs y col., 1984).

La descripción de diferentes neuropéptidos en el hipotálamo tuvo como consecuencia la realización de investigaciones tendientes a encontrarles una función en los numerosos mecanismos regulatorios hipotalámicos. Varios intentos en el campo de la regulación de la secreción de LH indican que algunas de estas sustancias tendrían un efecto modulador (McCann, 1980). Estos resultados son por ahora preliminares salvo, tal vez, en el caso de los péptidos opioides quienes tendrían un efecto inhibitorio sobre la secreción de LH (Meites y col., 1979; Barden y col., 1981; Drouva y col., 1981; Gabriel y col., 1983; Sarkar y Yen, 1985).

1.2. SEROTONINA

1.2.1. Biosíntesis y catabolismo

La serotonina (3-(β -aminoetil)-5-hidroxiindol) se sintetiza a partir del aminoácido triptofano en dos etapas. La primera de ellas consiste en la hidroxilación del triptofano para dar 5-hidroxitriptofano (5-HTP). La reacción está catalizada por la enzima triptofano-hidroxilasa (triptofano-monooxigenasa, EC 1.14.16.4) que tiene un absoluto requerimiento de oxígeno molecular, pteridina reducida y de Fe^{++} ; "in vivo" presenta una cinética de primer orden. En condiciones fisiológicas, la concentración de triptofano en sangre no alcanza para saturarla, tampoco presenta inhibición por producto (Hamon y col., 1981). La segunda etapa es la descarboxilación del 5-HTP catalizada por una descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (EC 4.1.1.28) que utiliza como cofactor al fosfato de piridoxal. La descarboxilasa es unas 70-100 veces más activa que la hidroxilasa; sin embargo, esta última es considerada como la enzima regulatoria de la biosíntesis de la serotonina, a pesar de que el K_m para su sustrato es bajo (3×10^{-4} - 4×10^{-5} M).

La serotonina sintetizada se almacena en vesículas secretorias en los terminales nerviosos (Pellegrino de Iraldi y col., 1968; Jaim-Etccheverry y Zieher, 1974, 1980).

El catabolismo de este neurotransmisor se realiza a

nivel mitocondrial e intervienen en él dos enzimas: la monoamino-oxidasa (tipo A) y una aldehído-deshidrogenasa. El resultado de esta desaminación oxidativa es el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIA), quien representa de esta manera el metabolito final de la degradación de la serotonina.

1.2.2. Distribución en el sistema nervioso central, con especial referencia al hipotálamo y, en la glándula hipofisaria

En las primeras décadas de este siglo ya se conocía la existencia de la serotonina como agente vasoconstrictor y se sabía de su localización en las células enterocromafines de la mucosa intestinal. Sin embargo, no fue sino hasta la mitad del siglo que la serotonina fue hallada en el sistema nervioso central. En efecto, Twarog y Page, en el año 1953, describieron la presencia de serotonina en el cerebro de numerosas especies, entre ellas la rata. Poco tiempo después y utilizando una metodología diferente, Bogdanski y col. (1956, 1957) confirmaron estos resultados destacando la presencia de elevadas concentraciones de 5-HT en el mesencéfalo, diencéfalo e hipocampo. El advenimiento de las técnicas de histofluorescencia con formaldehído (Falck y col., 1962) permitió la localización de la serotonina en las neuronas (Dahlström y Fuxe, 1964; Fuxe, 1965).

A partir de ese momento, la serotonina ha cumplido con todos los requisitos como para ser considerada un neurotransmisor: la ya mencionada localización intraneuronal, su síntesis en las neuronas serotoninérgicas (Shields y Eccleston, 1972), la liberación al espacio sináptico como consecuencia de la despolarización (Andén y col., 1964; Ashkenazi y col., 1972 a y b; Azmitia, 1981; Héry y col., 1983), la presencia de enzimas específicas y de mecanismos que controlan su concentración en la sinapsis, limitando su efecto temporal y, la posibilidad de contar con antagonistas adecuados (Fuller, 1980).

Los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas están ubicados en su mayoría, en el tronco encefálico formando parte de los núcleos del rafe. Desde allí dirigen sus axones hacia diferentes zonas del sistema nervioso central (Fuxe y col., 1968; Conrad y col., 1974). Estas neuronas presentan un elevado grado de colateralización y sus proyecciones son muy dispersas. Los axones que proveen la inervación serotoninérgica descendente se originan en los núcleos obscurus, pallidus y magnus (Browker y col., 1983). Las fibras serotoninérgicas que inervan el cerebro anterior y medio se originan en los tres núcleos del rafe ubicados en el mesencéfalo: el linearis centralis, el dorsal y el mediano (en la rata, central superior). Estas proyecciones forman tres haces

ascendentes: dorsal, medio y ventral.

El tracto dorsal parte de las zonas media y rostral del núcleo dorsal del rafe. La región a la que aportan mayor densidad de inervación es el complejo caudado putamen, con algunas fibras que alcanzan al globo pálido y al núcleo accumbens. El fascículo medio se origina también en el núcleo dorsal del rafe e inerva preferentemente la sustancia negra. Por último, el haz ventral reúne fibras que parten de los tres núcleos mesencefálicos del rafe. Estas fibras se dirigen primero ventrolateralmente y, luego de curvarse rostralmente, ingresan al fascículo prosencefálico medio a nivel del hipotálamo lateral. El tracto inerva el diencéfalo y todas las zonas cerebrales anteriores (Brodal y Taber, 1960; Andén y col., 1966; Aghajanian y Bloom, 1967; Aghajanian y col., 1969; Bobillier y col., 1975; Azmitia y Segal, 1978; Moore y col., 1978; Conrad y col., 1974; Steinbusch y Nieuwenhuys, 1982 a).

Los núcleos dorsal y mediano del rafe reciben múltiples aferencias provenientes de diversas áreas del tronco encefálico y del cerebro anterior (Pasquier y col., 1977; Pasquier y Villar, 1983).

Las neuronas serotoninérgicas localizadas fuera de los núcleos del rafe no forman núcleos celulares discretos y, por tanto, es muy difícil un estudio neuroanatómico de las mismas.

Prácticamente no existen zonas del área preóptica y del hipotálamo que no reciban inervación serotoninérgica, aun cuando la distribución sea muy despareja (Kent y Sládek, 1978; Steinbusch y Nieuwenhuys, 1982 b). En el área preóptica media y en el hipotálamo anterior se observa una elevada inervación de la parte ventral del núcleo preóptico-supraquiasmático que se continúa en el núcleo supraquiasmático. El hipotálamo medio recibe una alta densidad de fibras a nivel del núcleo ventromediano y de una zona comprendida entre el núcleo arcuato y los núcleos premamilares dorsal y ventral. Lateralmente se observa una alta concentración de fibras en el núcleo preóptico y en el fascículo prosencefálico medio. El hipotálamo posterior presenta tres zonas densamente inervadas: la parte caudal del núcleo hipotalámico posterior, el núcleo mamilar medio y una región comprendida entre el fascículo mamilotalámico y el mamilotegmental. En la eminencia media (Calas y col., 1974) las fibras se localizan en la parte lateral de la capa externa en la cual la región rostral recibiría mayor inervación que el resto (Steinbusch y Nieuwenhuys, 1982 b); también se describieron fibras en la capa subependimaria y en la fibrosa (Villar y col., 1984). Los resultados obtenidos a través de dosajes bioquímicos en los diferentes núcleos hipotalámicos coinciden en general con lo descrito (Saavedra y col., 1974).

De lo señalado en el párrafo anterior se deduce que la 5-HT del área preóptica y del hipotálamo estaría totalmente localizada en fibras nerviosas. Sin embargo, existen en la bibliografía datos experimentales que no coinciden con lo expresado en este concepto. Palkovits y colaboradores (1977 a) encontraron que la sección de las fibras que representan las principales aferencias serotoninérgicas al hipotálamo producía una depleción del 66% en la concentración de la serotonina hipotalámica. Esto sugiere evidentemente, que el tercio restante es de procedencia local. En efecto, otros investigadores hallaron 5-HT en los tanicitos de la eminencia media (Sladek y Sladek, 1978), en las células gliales del tallo infundibular y, en un grupo de neuronas de la zona ventral del núcleo dorsomediano (Beaudet y Descarries, 1979; Frankfurt y col., 1981).

La información que aportan las técnicas morfológicas en relación a la ubicación de los sistemas LH-RH y serotoninérgico permite sugerir una interacción entre ambos sistemas a nivel del área preóptica y del hipotálamo. Una evidencia concreta de esta posibilidad la sugiere el grupo de Jennes (1982), quienes describen una superposición de fibras serotoninérgicas y de LH-RH en el septum-área preóptica y en la eminencia media.

El hallazgo de serotonina en la glándula pituitaria

propone otro posible nivel de interacción entre esta amina y la secreción de LH. En la hipófisis, la 5-TH se encuentra en la "pars distalis", en la "pars intermedia" y en la "pars nervosa", con una concentración creciente en este orden (Saavedra y col., 1975).

La presencia en la hipófisis de la enzima triptofano-hidroxilasa (Saavedra y col., 1975) y el hecho de que la sección del tallo infundibular no altere la concentración de 5-HT en el lóbulo hipofisario anterior (Friedman y col., 1983) sugieren un origen intrahipofisario para la serotonina.

Contrariamente, la ausencia de la enzima descarboxilasa (Spinedi y Negro-Vilar, 1982) y la descripción de fibras serotoninérgicas en el lóbulo anterior (Westlund y Childs, 1982), aunque no confirmadas por otros autores (Steinbusch y Nieuwenhuys, 1982 b), indican un origen extrahipofisario. En apoyo de esta hipótesis se ha observado que en los mamíferos hay una captación específica de serotonina por células que sintetizarían LH (Núñez y col., 1981; Payette y col., 1985). En la rata existiría una unión de la serotonina, saturable y específica, a un grupo de células anterohipofisarias, posiblemente gonadotropas (Johns y col., 1982).

En consecuencia, aún no es posible descartar ninguna de las dos procedencias; incluso, la posibilidad de un origen

doble está sustentada por los experimentos de Johnston y colaboradores (1983), quienes dosaron 5-HT en la circulación portal.

1.3. EVIDENCIAS EXPERIMENTALES SOBRE LA PARTICIPACION DE LA SEROTONINA EN LA REGULACION DE LA SECRECION DE LH

1.3.1. Experimentos farmacológicos

1.3.1.1. Efecto de la serotonina y precursores

Inicialmente, uno de los modelos experimentales más empleados para el estudio de los mecanismos que regulan el ciclo reproductivo, fue la ovulación inducida por administración de suero de yegua preñada (PMS) a ratas y ratones inmaduros. Así, en el año 1960, McCann, Taleisnik y Friedman observaron que la inyección endovenosa de 25 µg de 5-HT a estas ratas simulaba una descarga de LH pues se deprimían los niveles de ácido ascórbico del ovario. Wilson y Enderby (1979) señalan que la infusión de serotonina (2 µg) en el núcleo paraventricular estimula el efecto de la PMS. Otros autores describen efectos inhibitorios: bloqueo de la luteinización, disminución del peso de los ovarios y del número de huevos (O' Steen, 1964, 1965). En ratones se observaron efectos tanto estimulatorios como inhibitorios (Brown, 1966, 1967; Wilson y col., 1975).

En la tarde del segundo día de diestro, la administración subcutánea de 5-HT previene la descarga preovulatoria de LH y, por ende, la ovulación (Labhsetwar, 1971; Collu y col., 1973); administrada en la tarde del proestro, es inefectiva (Wilson y Mc Donald, 1974). En machos castrados, la inyección

de serotonina disminuye los niveles sanguíneos de LH elevados por efecto de la castración (Pilote y Porter, 1979); un efecto similar observaron Riggs y Malven (1974) en ovejas castradas.

Buscando una estrategia experimental más específica, se realizaron experimentos de inyección del neurotransmisor en el tercer ventrículo. Inyectada por esta vía, la 5-HT no tendría efecto sobre la descarga preovulatoria de gonadotropinas (Schneider y McCann, 1970); sin embargo, anula la liberación de LH producida por la estimulación eléctrica del área preóptica (Cramer y Barraclough, 1978). En las mismas condiciones experimentales, la serotonina bloquea el aumento de LH posterior a la castración (Schneider y McCann, 1970), y la ovulación en ratas inmaduras tratadas con PMS (Zolovick y Labhsetwar, 1973), retardando la apertura vaginal y la aparición del pico de LH del primer proestro (Corbin y Schottelius, 1961).

En ratas machos, los resultados de la administración intraventricular de 5-HT son contradictorios pues o no se hallaron efectos (Schneider y McCann, 1970), o se describieron estimulaciones (Porter y col., 1971/1972) o inhibiciones (Kamberi y col., 1970 a). En ovejas, utilizando esta vía de administración, la serotonina prolonga el ciclo estral bloqueando el pico de LH y posponiendo la ovulación (Dománski y

col., 1975).

Inyectada en los vasos porta, la serotonina no afecta la secreción de LH en ningún momento del ciclo (Kamberi y col., 1970 a), tampoco modifica la respuesta "in vivo" de la glándula pituitaria al LH-RH (Cramer y Barraclough, 1978).

Una manera alternativa de incrementar los niveles centrales de 5-HT es estimulando su síntesis mediante la administración de 5-hidroxitriptofano. Procediendo de este modo, en ratas castradas inyectadas con estrógenos y progesterona, se encontró una potenciación del efecto estimulante de este último esteroide sobre la secreción de LH (Frank y col., 1980).

El análisis de los efectos atribuidos a la serotonina en un sistema "in vitro" muestra resultados poco convincentes. Cuando se incubaron hipotálamos e hipófisis en conjunto se observaron tanto inhibiciones (Moskowska, 1965) como ausencia de modificaciones en la secreción de LH (Schneider y McCann, 1969) y de FSH (Kamberi y col., 1970b). De manera similar, al medirse la liberación de LH-RH al medio, la presencia de 5-HT no produce efecto alguno (Bennett y col., 1975; Kao y Weisz, 1977) o bien se observa una inhibición (Charli y col., 1978). Es interesante destacar que en todos estos experimentos solamente se emplearon tejidos de ratas machos y, en algunos casos, concentraciones farmacológicas de 5-HT.

En la incubación de glándulas hipofisarias de machos o de

hembras castradas el agregado de 5-HT al medio no afecta la secreción de LH (Schneider y McCann, 1969; Ryu y col., 1980); aunque Martín y su grupo de investigación (1977) describieron un bloqueo del aumento de la secreción de LH inducida por LH-RH, pero, sólo en el caso de que las glándulas provinieran de animales de menos de 10 días de edad.

Como puede observarse a partir de los datos experimentales recopilados, es ciertamente difícil atribuirle a la 5-HT un determinado efecto (inhibición o estimulación) debido a la considerable disparidad de los resultados obtenidos con este tipo de enfoque experimental. En cambio, hay una coincidencia general en adjudicarle a la 5-HT un efecto a nivel central, tal vez hipotalámico, si bien aún no se puede descartar totalmente una acción a nivel hipofisario.

1.3.1.2. Inhibición de la síntesis, degradación y recaptación neuronal de la 5-HT.

Una manera alternativa de modificar la actividad del sistema serotoninérgico e investigar su repercusión en la secreción de las gonadotrofinas es forzar una variación de su metabolismo (síntesis, recaptación neuronal y degradación) en el momento deseado.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la síntesis de 5-HT comprende dos pasos enzimáticos. Usualmente, se recurre

a la inhibición del primero de ellos, es decir, la hidroxilación. El inhibidor de la triptofano-hidroxilasa más empleado es la p-clorofenilalanina (pCPA). Esta droga es específica solamente por debajo de un límite máximo de concentración (Clemens y col., 1977).

La administración de pCPA anula la secreción de LH y FSH y la ovulación en ratas prepúberes tratadas con PMS (Héry y col., 1975a; Wilson y col., 1977; Brown, 1971). En ratas ovariectomizadas, la inhibición de la síntesis de la 5-HT disminuye (Héry y col., 1976) o elimina (Coen y Mac Kinnon, 1978; Chen y col., 1981) la descarga de LH inducida por estrógenos. Este efecto puede revertirse mediante la inyección de 5-hidroxitriptofano. El inhibidor también bloquea el pico preovulatorio de LH (Héry y col., 1975b; Coen y col., 1980a), pero en este caso el restablecimiento de la descarga depende de la vía de administración de pCPA y del 5-HTP. Por esto mismo, muchos investigadores sugirieron que la pCPA tenía efectos a nivel ovárico. No obstante, se ha encontrado que aunque la pCPA bloquee el pico de LH del proestro, no altera las secreciones de estradiol y de progesterona que ocurren en el mismo día (Wilson y col., 1977). Otros autores, utilizando procedimientos experimentales indirectos, observaron que el bloqueo de la síntesis de 5-HT anula el efecto inhibitorio que produce la estimulación del núcleo arcuato sobre la secreción pul-

sátil de LH en ratas castradas (Gallo y Moberg, 1977; Arendash y Gallo, 1978). De todas maneras, la mayoría de los experimentos en los que se utiliza pCPA sugieren una acción estimuladora de la 5-HT en la secreción de LH.

Uno de los principales mecanismos para controlar la concentración de 5-HT en la sinapsis es el proceso de recaptación presináptica. La inhibición de este proceso implica una potenciación de un eventual efecto del neurotransmisor. La fluoxetina (Fuller, 1980) es una droga utilizada para bloquear específicamente la recaptación de serotonina. Su administración no afecta los niveles séricos de LH en hembras castradas, pero junto con el 5-HTP los incrementa en machos intactos, sin alterar los valores de FSH. (Ruzsas y col., 1984). Otro inhibidor, alaproclato, inyectado intraventricularmente a las 15.00 hs del proestro, no afecta la secreción preovulatoria de LH, en cambio anula la descarga de LH inducida por los estrógenos y la progesterona en ratas crónicamente castradas (Horn y Fink, 1985). El aumento de la concentración de 5HT en la sinapsis tendría un efecto inhibitorio.

Luego de la recaptación, las moléculas de 5-HT pueden volver a formar parte de las vesículas sinápticas o ser degradadas en las mitocondrias por acción de la monoaminoxidasa. El bloqueo de esta enzima antes del período crítico

y, utilizando diferentes inhibidores, anula la secreción pre-ovulatoria de LH (Alleva y col., 1966; Kordon y col., 1968; Kordon, 1969; Donoso y col., 1971; Kordon y Clowinski, 1972; Labhsetwar, 1972), sugiriendo también un papel inhibitorio.

Es evidente que el aporte brindado por las manipulaciones farmacológicas del metabolismo de la serotonina han tenido efectos contradictorios sobre la secreción de LH. Una explicación muy elegante sobre esta falta de "lógica" en los resultados experimentales ha sido aportada por Walker. Este investigador demostró que lo importante no sería tanto las alteraciones de los niveles hipotalámicos de serotonina sino más bien la anulación de las variaciones de su metabolismo que acompañan a la secreción de LH. Por ello drogas que tienen efectos opuestos sobre la actividad del sistema serotoninérgico, producen el mismo efecto sobre la descarga de LH puesto que en realidad todas esas drogas, independientemente de la alteración de los niveles de serotonina, han eliminado los cambios que ocurrirían en el metabolismo de la 5-HT asociados a la secreción de LH (Walker, 1983).

1.3.1.3. Utilización de agonistas y antagonistas serotoninérgicos

Sustancias que mimetizan (agonistas) o que antagonizan la acción de la serotonina han sido empleadas en el estudio de la participación de la 5-HT en la descarga de las gonado-

trofinas. Ya que estas drogas actúan a nivel del receptor, es interesante destacar que se ha descrito por lo menos dos tipos diferentes de receptores serotoninérgicos en el sistema nervioso central (Peroutka y Snyder, 1979). Los agonistas y antagonistas más usados no siempre son capaces de discriminar entre estos receptores (Peroutka y Snyder, 1981); además, empleados en dosis altas no son específicos, pues pueden actuar sobre receptores que reconocen a otros neurotransmisores (Fuller, 1980; Krulich y col., 1981).

El agonista más empleado es la quipazina (Hong y col., 1969). Se ha demostrado que la inyección de esta droga a las 14.00 ó 20.00 hs del proestro adelanta o prolonga, respectivamente, la secreción preovulatoria de LH; en cambio, durante el diestro carece de efecto (Walker, 1980). En ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos, la quipazina no modifica la descarga de LH, pero la incrementa si previamente se deprime el sistema serotoninérgico (pCPA o p-cloroanfetamina) (Chen y col., 1981).

El bloqueo de los receptores serotoninérgicos con antagonistas adecuados altera la ovulación y la secreción de LH. Brown (1967) observó que el empleo de antagonistas de la 5-HT anulaba a la ovulación inducida por PMS sin afectar la espontánea. Markó y Flückiger (1976, 1980) obtuvieron resultados opuestos; estos autores encontraron una correlación

directa entre la inhibición de la ovulación producida por determinados fármacos y la actividad de antagonistas serotoninérgicos de éstos. En el ciclo estral los bloqueantes de receptores serotoninérgicos anulan la descarga preovulatoria de LH cuando se los inyecta a las 16.00 hs del proestro; la intensidad del pico disminuye si se los inyecta a las 17.30 hs y carecen de efecto administrados a las 8.00 hs del mismo día (Walker, 1980).

La utilización de agonistas y antagonistas como herramienta experimental para explorar la función de la serotonina en la secreción de LH tampoco ha permitido obtener una definición sobre el tipo de efecto del neurotransmisor. Sin embargo, en comparación a los métodos anteriormente comentados, la disparidad de los resultados experimentales es menor, sugiriendo los estudios más recientes un papel estimulador de la 5-HT en la secreción de LH.

1.3.2. Estimulaciones eléctricas y lesiones del sistema serotoninérgico

La realización de estimulaciones y lesiones constituye otro tipo de manipulaciones del sistema serotoninérgico que permite estudiar su relación con la liberación de LH. Mediante su empleo, se logró ubicar aproximadamente los núcleos cuyas proyecciones hacia el hipotálamo participan en los mecanismos de

regulación de la secreción de gonadotrofinas.

En el año 1970, Carrer y Taleisnik encontraron que en ratas en proestro, la estimulación electroquímica del área tegmental, del núcleo mediano del rafe y del área periacueductal bloqueaba la ovulación por causa de una insuficiente secreción de LH. Contrariamente, la estimulación del área tegmental dorsal y de la sustancia gris periacueductal lateral e inferior inducía la ovulación en ratas que estaban en estro persistente por exposición a luz continua. Estos resultados fueron interpretados en el sentido de la existencia de una vía nerviosa que relacionaba núcleos o áreas mesencefálicas con el hipotálamo. Dentro de estas áreas están comprendidos los núcleos dorsal y mediano del rafe que constituyen las aferencias serotoninérgicas al hipotálamo más importantes (Azmitia, 1978).

La participación de los núcleos del rafe en los mecanismos que regulan la secreción de LH ha sido repetidamente sugerida por varios grupos de investigación. La estimulación del núcleo dorsal del rafe anula la liberación pulsátil de LH en ratas castradas (Arendash y Gallo, 1978) y la inducida por estrógenos y progesterona (Waloch y col., 1981), mientras que la lesión del mismo la potencia. Esto sugiere un efecto inhibitorio de la 5-HT sobre la descarga de LH. Sin embargo, la transección de las fibras nerviosas mediodorsales y las lesiones del núcleo dorsal del rafe disminuyen en un 50% la magnitud de la

liberación de LH en ratas castradas tratadas con estrógenos (Héry y col., 1978), lo que, contrariamente a lo anterior, sugiere un efecto estimulante de la 5-HT que proviene del núcleo dorsal del rafe.

Una mayor especificidad, en cuanto a la localización de la lesión y al sistema dañado, se logró con la introducción de las neurotoxinas. Las dos más empleadas para destruir neuronas serotoninérgicas son la 5,7 y la 5,6 dihidroxitriptamina (DHT).

La inyección de la 5,7 DHT en los ventrículos laterales de ratas machos disminuye la concentración plasmática de LH, pero no la de FSH (Wuttke y col., 1977); los valores normales se vuelven a alcanzar en forma paralela al restablecimiento de la actividad serotoninérgica del hipotálamo. Inyectada en los núcleos dorsal y mediano del rafe disminuye la incidencia de la ovulación inducida por PMS en ratas prepúberes (Meyer, 1978) y produce una caída de la concentración de LH en machos intactos sin tener efecto en los castrados (van de Kar y col., 1980). Sin embargo, la inyección de 5,7 DHT en el área preóptica, donde sólo han sido descritos terminales serotoninérgicos, no afecta la secreción de LH (van de Kar y col., 1980).

La 5,6 DHT administrada sistémicamente anula la descarga de LH inducida por los estrógenos en las ratas castradas (Coen,

Mac Kinnon, 1979).

Estos resultados sugieren la necesidad de la integridad del sistema serotoninérgico que inerva el hipotálamo para una normal secreción de LH.

1.3.3. Alteraciones del metabolismo de la serotonina asociadas a la secreción de LH

Evidentemente, una de las manifestaciones más importantes y, posiblemente, más claras acerca de la participación de la serotonina en la regulación de la secreción de LH son las alteraciones de su metabolismo, asociadas a la mencionada descarga hormonal (Héry y col., 1972; Rowland y col., 1978). Los parámetros indicativos de la actividad del sistema serotoninérgico que corrientemente se emplean comprenden: la medición de cambios de su concentración, el "turnover", la medición de actividades enzimáticas que intervienen en el metabolismo general del sistema, el número y la afinidad de los receptores serotoninérgicos.

La concentración de serotonina en el cerebro anterior y medio de ratones hembras se modifica durante el ciclo estral (Greengrass y Tonge, 1971). De manera similar han sido observadas alteraciones del contenido de 5-HT durante el ciclo estral de la rata. En efecto, la concentración 5-HT "cae" en la tarde del proestro en el septum, área preóptica, hipotála-

mo medio basal y núcleos serotoninérgicos del mesencéfalo (Küng y col., 1975, 1976). Contrariamente, otros investigadores señalan un incremento del contenido de 5-HT hipotalámico y del fascículo prosencefálico lateral coincidente con el comienzo del período crítico para el pico de LH del proestro (Quay, 1968). La descarga de LH inducida por estradiol en ratas castradas está precedida por un descenso de la concentración hipotalámica de 5-HT (Walker y Wilson, 1983; Walker, 1983).

En el hipotálamo, la actividad del sistema serotoninérgico, monitoreada a través de la determinación de su "turnover", aumenta en el comienzo de la secreción de LH y disminuye cuando los niveles séricos de LH decaen. Si se prolonga la duración del pico de LH por exposición a la luz, el "turnover" permanece elevado (Walker, 1980). En el núcleo supraquiasmático aumenta el metabolismo de la 5-HT antes de la secreción de LH inducida por estrógenos (Héry y col., 1982).

Los esteroides sexuales tienen una importante influencia sobre el "turnover" de este neurotransmisor, aunque todavía los resultados son confusos. El estradiol estimularía su metabolismo, efecto anulado por la progesterona (Munaro, 1978). Sin embargo, la progesterona sola inhibiría la degradación de la 5-HT en zonas cerebrales relacionadas con la secreción de LH (Ladisich, 1974) y estimularía su síntesis antes del período

do crítico para la descarga de la hormona (Walker y Wilson, 1983).

Sorprendentemente, no se han encontrado modificaciones de la actividad de la triptofano-hidroxilasa ni de la afinidad de la enzima por su sustrato (5-HTP) ni por su cofactor (tetrahidrobiopterina), en respuesta a la castración con o sin terapia de reemplazo (Kizer y col., 1976). En cambio, la enzima que degrada a la 5-HT, la MAO, sufriría alteraciones en su actividad a lo largo del ciclo estral, aunque se ha observado diferentes tipos de modificaciones, algunas de ellas opuestas entre sí (Zolowick y col., 1966; Kamberi y Danhof, 1968; Kung, 1976). La actividad de la MAO tipo A presente en el hipotálamo, que es la que degrada preferentemente a la 5HT (Houslay y col., 1976), depende de las hormonas ováricas (Luine y Rhodes, 1983).

La recaptación neuronal de serotonina también varía durante el ciclo. En el núcleo supraquiasmático se produce un incremento notable de la misma exactamente una hora antes del pico preovulatorio de LH (Meyer y Quay, 1976). En el hipotálamo total, los estrógenos estimulan la recaptación y en el área preóptica lo hace la progesterona (Wirz-Justice y Hackman, 1972).

Los receptores serotoninérgicos del sistema nervioso central tampoco son ajenos a las modificaciones hormonales. En el hipotálamo, durante el proestro y el estro, decae el número de

receptores, pero no se modifica la afinidad por la serotonina (Biegon y col., 1980). Estos receptores serían, por otra parte, dependientes de estrógenos. El estradiol tendría un efecto bifásico: en forma aguda disminuiría el número de receptores, mientras que después de 48-72 hs lo aumentaría (Biegon y McEwen, 1982).

Al recopilar los resultados obtenidos a lo largo de dos décadas dedicadas al estudio de la relación entre la serotonina y la liberación de LH sobresale, en forma notoria, la confusión existente. La complejidad propia del tema y la utilización de variados modelos y estrategias experimentales no contribuyeron, evidentemente, a la dilucidación del mecanismo de acción de la serotonina. En consecuencia, aún no es posible conocer con certeza el o los sitios de acción de la 5-HT, ni el efecto ni la importancia fisiológica que tiene este neurotransmisor en la regulación de la secreción de la hormona luteinizante.

2- OBJETIVOS

Es nuestro propósito en este trabajo de Tesis profundizar el conocimiento que se tiene sobre la participación de la serotonina en el control de la secreción de LH.

Para ello utilizaremos como modelo el ciclo estral de la rata. Este modelo reúne las condiciones óptimas para estudiar el papel fisiológico de la serotonina en este fenómeno hormonal.

Dividimos el estudio en tres etapas que corresponden a la respuesta a cada una de las siguientes preguntas:

a- ¿Participa la serotonina en la secreción preovulatoria de LH?

Se determinará la actividad del sistema serotoninérgico en el lóbulo hipofisario anterior y en la eminencia media durante el ciclo estral.

b- ¿A qué nivel actúa la serotonina?, ¿su efecto es estimulador o inhibitorio?

Este estudio se llevará a cabo utilizando una metodología "in vitro". Hemos escogido la incubación dinámica o perfusión. Con este sistema se evaluará el efecto de la 5-HT sobre las secreciones hipofisarias (LH, FSH, PRL) e hipotalámicas (LH-RH).

c- ¿Cuál es la importancia de la serotonina en la regulación

de la secreción de LH durante el ciclo estral?

Para determinar la importancia fisiológica de la 5-HT en la descarga preovulatoria de LH es necesario eliminarla de las zonas donde actúa. Puesto que la mayoría de las fibras serotoninérgicas que inervan las regiones que ocupa el sistema de neuronas LH-RH responsable de la descarga preovulatoria de LH, proviene del núcleo dorsal del rafe, se intentará la lesión de este núcleo estudiándose posteriormente el mantenimiento del ciclo (extendidos vaginales) y el perfil hormonal durante el proestro.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. TECNICAS UTILIZADAS

3.1.1. Radioinmunoensayo

3.1.1.1. Gonadotrofinas y prolactina

Las determinaciones de LH, FSH y PRL se realizaron con métodos inmunológicos (RIA). En el dosaje de FSH y PRL se siguió la técnica descrita en las instrucciones del Rat Pituitary Distribution Program del NIAMDD, en el caso de LH se recurrió a la metodología desarrollada por Niswender y colaboradores (1968).

El buffer que se utiliza en las diferentes etapas del RIA es PBS (buffer fosfato de sodio 0,01 M pH 7,6; 0,15 M NaCl, 0,01% mertiolate).

Las preparaciones de hormonas purificadas para marcar con iodo fueron provistas por el NIAMDD (FSH y PRL de rata) y por el Dr. L. Reichert Jr. (LH ovina). La introducción de un átomo de ^{125}I en las moléculas de las hormonas se realizó con el método de la cloramina-T (1 min de exposición), la reacción se detuvo con metabisulfito de sodio. La hormona marcada se purificó pasándola por una columna (10 x 1 cm) de Bio Gel P-60. En general, se utilizaron 2,5 μg de hormona y 1 μCi de ^{125}I Na (New England Nuclear).

Para cada hormona la dilución del primer anticuerpo se

preparó en una solución de suero normal de conejo al 3% (NRS - PBS - 0.05 M EDTA). Los anticuerpos dirigidos contra las moléculas de FSH y PRL de rata se obtuvieron en conejos y fueron provistos por el NIA MDD. El anticuerpo anti-LH ovina, también se hizo en conejo y lo proveyó el Dr. Niswender (anti-ovine LH N°15), presenta reacción cruzada con la LH de rata. Las diluciones iniciales utilizadas en cada caso fueron: anti-rFSH: 1:2000; anti-rPRL: 1:4000 y anti-oLH: 1:20.000.

La separación de la hormona libre de la unida al anticuerpo se efectuó con un segundo anticuerpo dirigido contra las inmunoglobulinas de conejo (hecho en cabra) (origen: NIA MDD).

Con las tres hormonas se utilizó como preparaciones de referencias las provistas por el programa del NIA MDD: LH: RP₁; FSH: RP₂ y PRL: RP₃.

El protocolo del ensayo es el siguiente: 1°) buffer (PBS-BSA 1%), 2°) muestra o estándar; éstas, junto con el buffer, deben ocupar un volumen máximo de 200 µl, 3°) 100 µl de hormona marcada (aproximadamente 20.000 cpm), 4°) 100 µl del anticuerpo correspondiente. La mezcla se incuba durante 48 hs a temperatura ambiente. En ese momento se agregan 100 µl del segundo anticuerpo (1:15) y se continúa la incubación durante 24 hs más. Mediante una centrifugación (3000 rpm x 30 min) se precipita el complejo "segundo anticuerpo-primer anticuerpo-hormona", y luego se procede a aspirar el sobrena-

dante. La radiactividad del precipitado se cuenta en un contador gamma (Beckman. Gamma-300).

Las curvas (% de unión vs log de la masa total de hormona) son lineales entre: 4 y 125 ng de RP_1 (LH); 0,2 y 12,5 ng de RP_2 (FSH) y 0,04- 5,0 ng RP_3 (PRL).

3.1.1.2. Hormona hipotalámica liberadora de LH (LH-RH)

La hormona marcada con ^{125}I se adquirió a New England Nuclear (NEX-163). El primer anticuerpo es anti-LH-RH hecho en oveja y fue provisto por el Dr. A. Arimura (Tulane University, Estados Unidos). La preparación liofilizada se reconstituyó en buffer PBS 0,05 M pH 7,0 1:400 suero normal de oveja; 0,05 M EDTA.

El RIA para esta hormona se desarrolló de la siguiente manera: se colocó el buffer PBS 0,05M pH 7,0; 0,15% NaCl y 0,01% mertiolate) y la muestra o estándar en un volumen total de 200 μ l. Luego del agregado de una dosis trazadora de LH-RH (100 μ l) se añaden 100 μ l del primer anticuerpo (1:10000 dilución inicial) y todo se incubó durante 20 hs a 4°C. Posteriormente, la hormona unida al anticuerpo se precipita con 1 ml etanol 96° frío (Jeffcoate y col., 1974), 30 min después se centrifuga (3000 rpm x 20 min) y se aspira el sobrenadante.

Se utilizó como estándar LH-RH (acetato-Sigma). La curva es lineal entre 8 y 1000 pg, saturándose en un 25% de unión.

3.1.2. Dosaje de serotonina

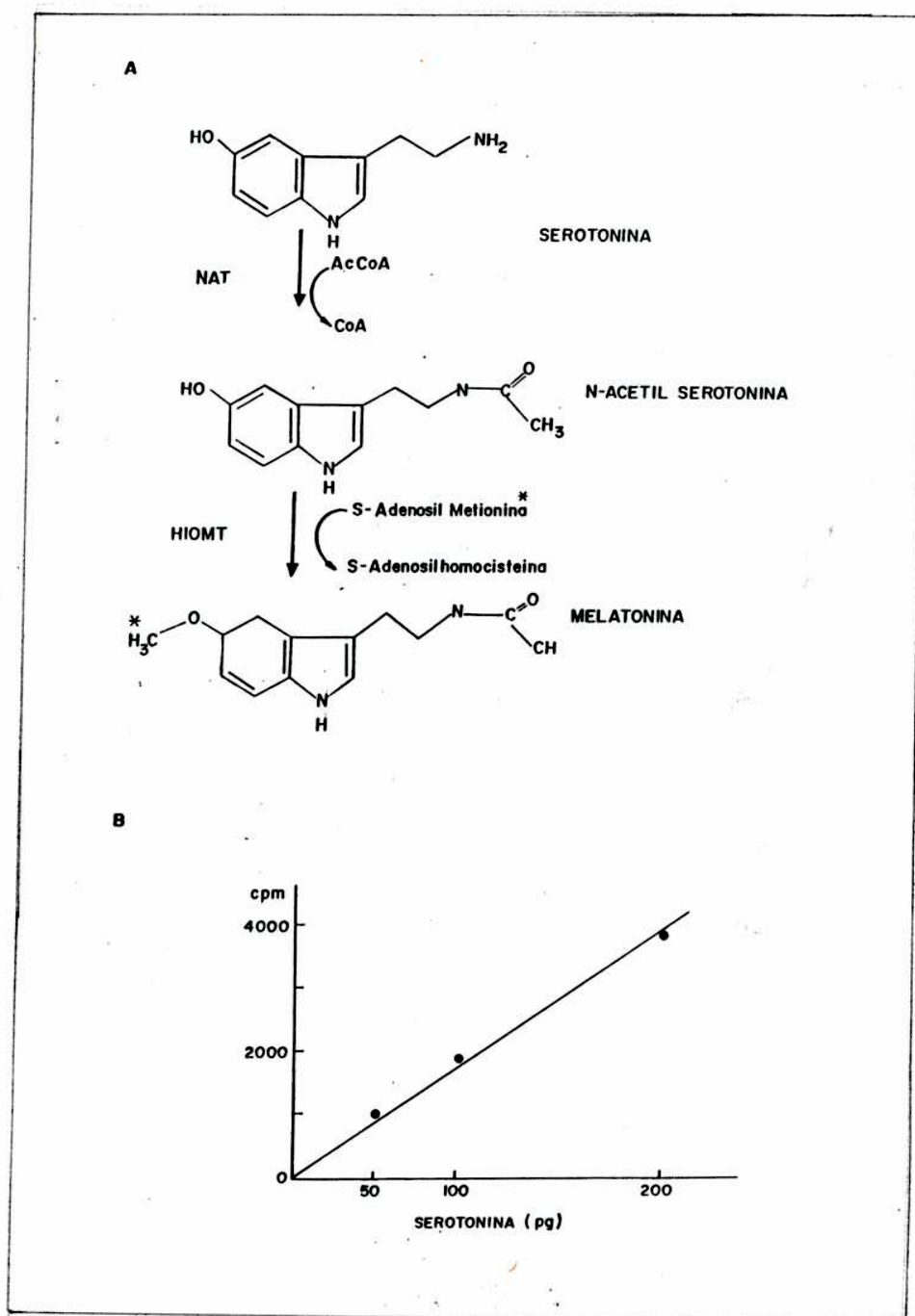
3.1.2.1. Método radioenzimático

El método fue desarrollado por Saavedra y colaboradores (1973), pero se le introdujeron las modificaciones propuestas por Pohl (1978) para aumentar la sensibilidad del ensayo. Fundamentalmente, el método se basa en la biosíntesis de la melatonina, que se realiza en la glándula pineal, a partir de la serotonina (fig. 1a).

Esta técnica comprende dos etapas: la primera es la transformación de la serotonina en N-acetilserotonina (NAS). La enzima N-acetiltransferasa (NAT) cataliza esta reacción, el cofactor que provee los grupos acetilos es la acetil-coenzima A. Luego se pasa a la segunda etapa: la conversión de NAS en melatonina, catalizada por la enzima hidroxindol-0-metiltransferasa; el cofactor dador de grupos metilo es la S-adenosilmetionina. El metilo del cofactor que se transfiere selectivamente al oxígeno de la posición 5 del anillo indólico tiene un átomo de tritio, por lo tanto, la melatonina que es el producto final de la reacción, es radiactiva. Esta melatonina se extrae selectivamente. La cantidad de radiactividad obtenida es proporcional a la masa inicial de serotonina (fig. 1b).

El método es específico para la 5-HT, ya que interferencias como la del triptofol y NAS no molestan, pues estas sustancias no se encuentran en los tejidos estudiados y la del

Fig 1: a) síntesis de melatonina a partir de la serotonina según la ruta biosintética de la glándula pineal, en la cual se basa el método radioenzimático; b) curva de calibración: masa de serotonina vs. síntesis de melatonina (cpm)



5-hidroxitriptofano se evita agregando a la mezcla de incubación un inhibidor de la descarboxilasa (carbidopa).

Las muestras y estándares se preparan en HCl 0,1 M y se cargan el día anterior al ensayo: 10 μ l en tubos eppendorf de plástico (1 ml); a cada tubito se le agrega luego 10 μ l de solución A (10 ml de fosfato de Na 0,2 M (pH 7,90) + 1,1 ml de NaOH 1N).

Por cada 10 muestras se preparan las siguientes cantidades de "cocktails" de enzimas:

para blancos: cocktail NAT(-) = sin acetyl-Co-A
25 μ l de solución de carbidopa (60 μ M en HCl 0,1 mM)
25 μ l de HCl 0,1 mM
40 μ l de buffer fosfato de Na 0,02 M; pH 7,20
10 μ l de preparación de N-acetil-transferasa (purificada de hígado de rata)

para muestras: cocktail NAT(+) = con acetyl-Co-A
25 μ l de solución de carbidopa
25 μ l de solución de acetyl-Co-A (4 mg/ml HCl 0,1 mM)
40 μ l de buffer fosfato de Na 0,02 M; pH 7,20
10 μ l de preparación de N-acetil-transferasa

para blancos y muestras: cocktail HIOMT

5 µl de buffer fosfato de Na 0,2 M; pH 7,90

20 µl de ³H-SAMe

25 µl de preparación de hidroxil-indol-0-metiltransferasa (purificada de pineal bovina)

Otras soluciones

MEL-BOR: 3 ml de buffer borato de Na 0,25 M; pH 10,0

0,1 ml de melatonina (3,1 mg/ml de alcohol absoluto)

Mezcla centellante:

4 g de PPO

40 mg de DMPOPOP

750 ml de tolueno

250 ml de Triton x-100

Drogas

Acetil-coenzima A (sal de litio) SIGMA

Serotonina (complejo creatinín sulfato) SIGMA

Melatonina SIGMA

Carbodipa PFISTER

(³H)-S-Adenosil-Metionina: New England Nuclear AE: 71,8 Ci/

mmol; A total: 1,0 mCi volumen inicial 1,8 ml

Técnica

1°: Transformación de serotonina en NAS

- se colocan los tubitos en hielo
- se agregan 10 µl de NAT(-) a blancos de curva y de tejido
10 µl de NAT(+) a muestras y estándares
- se incuba 30 min (baño de incubación tipo Dubnoff) a 37°C
- luego se pasan los tubos a un baño de agua-hielo

2°: Transformación de NAS en melatonina

- se cargan todos los tubitos con 5 µl de HIOMT
- se incuba 10 min
- se sumergen en un baño de agua-hielo

3°: Extracción selectiva de la melatonina

- se agrega a cada tubito 100 µl de una solución MEL- BOR
- se dejan los tubitos a temperatura ambiente
- agregar 1 ml de tolueno y se agita en agitador mecánico
15 min.
- centrifugar
- se toman 600 µl de la fase orgánica (superior) y se transfieren a viales
- evaporar totalmente el tolueno a temperatura ambiente
- colocar en estufa a 80°C durante 48 hs
- agregar 10 ml de la mezcla centellante
- contar la radiactividad (contador de centelleo líquido Beckman).

En las condiciones en que se realizó la técnica se obtuvo una sensibilidad de 30-50 pg.

3.1.2.2. Método cromatográfico (cromatografía líquida de alta presión)

Otra técnica que permite no sólo valorar la serotonina, sino también sus metabolitos, es la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa y detección electroquímica. El método que se siguió fue, en principio, el descrito por Koch y Kissinger (1973), al que se le hicieron modificaciones para aumentar la sensibilidad y la resolución de los metabolitos.

El aparato utilizado es un cromatógrafo de Bioanalytical Systems (West Lafayette, IN., EE.UU.). Está equipado con una válvula de inyección de 6 puertas (Rheodyne) con un "loop" de 50 µl, una columna de fase reversa (µBondapak C₁₈), tamaño de partícula 10 µm, dimensiones de la columna 30 x 3,9 mm (id), un detector amperométrico (LC-4 Bioanalytical System) con un electrodo de pasta de carbón (CP-0) al que se le aplicó un potencial de 50 mV versus un electrodo de Ag/AgCl como referencia.

La fase móvil es un buffer AcOH/AcONH₄ 0,5 M pH 5,1 que contiene 4,8% de metanol (calidad HPLC); se la impulsa mediante una bomba de un solo pistón (Altex modelo 110 A) con un

flujo de 1 ml/min (1300 psi) y se recicla. Todas las soluciones para preparar la fase móvil se hicieron con agua tridestilada (bidestilada con KMnO_4), se filtraron y desgasearon (1 hora).

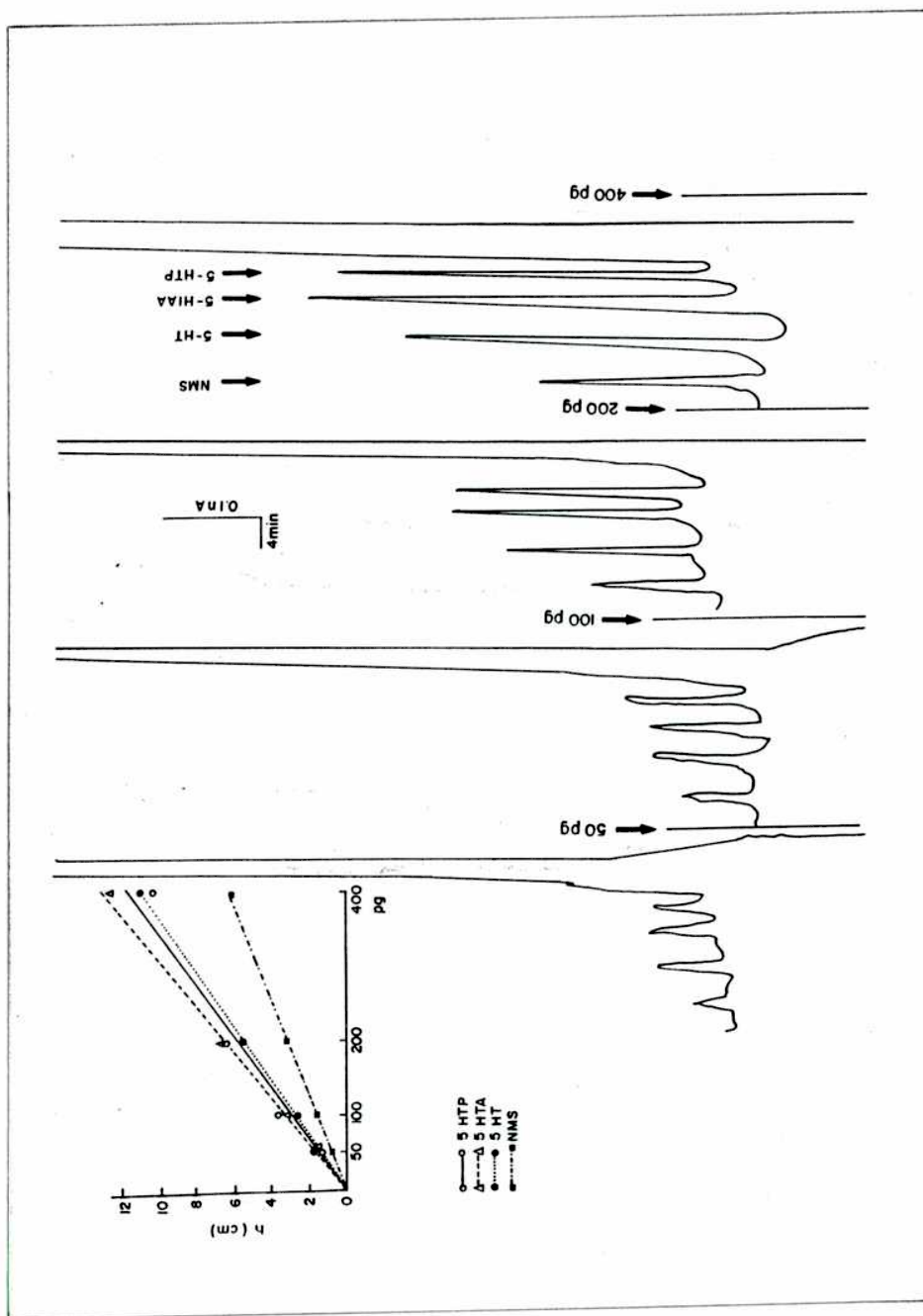
Las muestras y los patrones (5-HT, 5-HTP y 5-HIAA) se prepararon con HCl 0,1M. Como estándar interno se usó la N-metilserotonina (oxalato Sigma, NMS) que no se encuentra endógenamente.

En estas condiciones experimentales los tiempos de retención de los indoles son: 5-HT: 14,8 min; 5-HIAA: 10,8 min; 5-HTP: 8 min y NMS: 16,8 min. (fig. 2a). Las catecolaminas y sus metabolitos se eluyen en el volumen muerto, el triptofano no se oxida al potencial escogido. La sensibilidad alcanzada es de alrededor de 20 pg, dependiendo del electrodo de trabajo; por lo tanto, se lo pulió repetidas veces a lo largo de su uso a fin de asegurar una buena sensibilidad y reproducibilidad.

Con las alturas de los picos se construye, para cada indol, la curva de calibración (h vs c). La concentración de 5-HT y sus metabolitos en las muestras se calcula a partir de la altura del pico y la curva de calibración correspondiente (fig. 2b).

3.1.3. Determinación de la actividad del sistema serotoninérgico

Fig 2: cromatogramas obtenidos al inyectar 50 μ l de soluciones que contienen serotonina (5-HT), 5-hidroxitriptofano (5-HTP), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIA) y el estándar interno N-metilserotonina (NMS). Curva de calibración que se obtiene graficando la altura (h) de los picos en función de la masa.



Hasta el presente no existe una metodología ideal para determinar el estado de actividad de un sistema neuronal monoaminérgico, pues no es posible aún medir directamente la velocidad de liberación de un neurotransmisor a la hendidura sináptica. Sin embargo, hay evidencias de que las alteraciones de ciertos parámetros del metabolismo del neurotransmisor reflejan cambios en su velocidad de liberación y por lo tanto pueden relacionarse con las modificaciones de la actividad neuronal.

Diferentes características del metabolismo de la serotonina pueden ser utilizadas para evaluar el estado de actividad del sistema. La actividad de la triptofano-hidroxilasa (síntesis) y las técnicas isotópicas son metodologías que tienen la ventaja de no alterar las condiciones internas del sistema para detectar modificaciones en el metabolismo; sin embargo, se dispone de métodos poco sensibles para las determinaciones que requieren.

En la actualidad, las técnicas que se utilizan para medir el "turnover" de la serotonina se basan en la alteración forzada de algún paso de su metabolismo. Los problemas que presentan estos métodos son varios, en primer lugar se desconoce aún qué efecto pueden tener estas modificaciones del sistema serotoninérgico sobre otros sistemas que también participan en la regulación de la secreción de LH, viciando los datos

experimentales; en segundo lugar algunas de las enzimas o pa sos metabólicos modificados se comparten con el sistema catecolaminérgico; por último, no se ha evaluado convenientemente los efectos que pudiera ocasionar la acumulación o disminución forzada de un metabolito sobre las demás etapas de esa vía metabólica.

Para determinar la actividad del sistema serotoninérgico generalmente se emplea la inhibición de la monoamino-oxidasa, que produce acumulación de serotonina y depleción de la concentración del ácido 5-hidroxiindolacético. El inhibidor empleado, pargilina (clorhidrato, Sigma), administrado en dosis de 75 mg/kg de peso (i.p., en solución fisiológica) produce una acumulación lineal de 5-HT dentro de la hora y media post-inyección (Neckers y Meek, 1976); los animales controles se inyectan con el volumen correspondiente de solución fisiológica (1 ml/kg de peso); la acumulación de serotonina en los animales inyectados con pargilina respecto de los controles se toma como índice de actividad del sistema serotoninérgico.

3.2. MODELOS EXPERIMENTALES Y OBTENCION DE LAS MUESTRAS

3.2.1. Experimentos "in vivo": alteraciones del metabolismo de la serotonina durante el ciclo estral

Generalidades

Los cambios cíclicos que ocurren en el aparato reproductor de las hembras y las alteraciones en el comportamiento sexual que se manifiestan paralelamente son el resultado de la interrelación de fenómenos nerviosos, endócrinos y ambientales (Nalbandov, 1976)..

En la rata, el ciclo estral dura 4 ó 5 días. En las diferentes etapas de su desarrollo se producen eventos fisiológicos característicos e interrelacionados: secreción de hormonas hipofisarias y ováricas, alteraciones morfológicas del tracto genital y del ovario, modificaciones de la conducta sexual. Los estadios del ciclo estral de la rata se denominan diestro, proestro y estro, según la nomenclatura de los estadios del ciclo vaginal.

Ciclo vaginal

El epitelio de la vagina sufre alteraciones periódicas como consecuencia de los cambios hormonales que se producen durante el ciclo estral. La exfoliación continua de las capas superficiales del epitelio permite el estudio, mediante la técnica de frotis vaginales, de las células descamadas que se

acumulan en el lumen. En base a los diferentes tipos celulares el ciclo vaginal se divide en cuatro estadios: dos días de diestro, proestro y estro.

Durante el segundo día de diestro, el epitelio vaginal está formado por una capa de células basales, seguidas de 2 a 3 capas de células pavimentosas. Las capas superiores se encuentran infiltradas de leucocitos. Por lo tanto, un extendido vaginal leucocitario es característico del diestro II.

El proestro que lo sucede presenta una rápida proliferación epitelial, la capa intermedia consta de 8 a 10 capas de células con numerosas mitosis; cerca de la superficie aparece una zona de queratinización seguida de células epiteliales nucleadas que se descaman. A este estadio corresponde un extendido vaginal con células epiteliales nucleadas.

Durante el estro, en cuya madrugada se produce la ovulación, se observa un engrosamiento de la capa cornificada que, al ganar la superficie libre, se descama. Un frotis de este estadio presenta células cornificadas.

Finalmente, durante el diestro I, las células queratinizadas desaparecen y los leucocitos invaden el epitelio, por lo que en el extendido vaginal se observa una gran cantidad de leucocitos, restos de células cornificadas y algunas células nucleadas.

La posibilidad de realizar una correlación entre los

estadios del ciclo estral y los del ciclo vaginal se fundamenta en el hecho de que éste es un reflejo de las alteraciones endócrinas que se manifiestan a lo largo de aquél, y, por lo tanto, están sincronizados. Como consecuencia, se tiene entonces una forma bastante precisa de poder ubicar en el tiempo los diferentes fenómenos (sobre todo las secreciones hormonales) que caracterizan al ciclo estral.

Cuando las condiciones ambientales son constantes, los ciclos son regulares. Los que duran cuatro días presentan dos días de diestro, aquéllos con cinco días de duración pueden presentar tres diestros o bien dos diestros y dos estros.

Descarga cíclica de hormonas

La secreción de las gonadotrofinas hipofisarias se repite según un modelo cíclico característico (Butcher y col., 1974; Smith y col., 1975; Nequin y col., 1979). La hora de comienzo de las descargas preovulatorias depende de la alternancia luz-oscuridad. Si bien existe cierta desincronización entre animales sometidos a los mismos ciclos luz-oscuridad (Blake, 1976 a), la hora de comienzo de la descarga se mantiene constante para un mismo animal (Turgeon, 1979) siempre que no se modifiquen aquellas condiciones.

La concentración sérica de LH se mantiene basal durante los dos días de diestro y la mañana del proestro. Si la luz del

bioterio se enciende entre las 5.00 y 7.00 hs, la descarga preovulatoria de LH comienza entre las 15.00 y 17.00 hs, y el máximo suele alcanzarse entre las 18.00 y 20.00 hs. La caída de los niveles hormonales a los basales tarda unas dos horas. Como este tiempo es mayor que la vida media de la hormona (Rorke y col., 1984), se deduce que ésta sigue liberándose durante el descenso. La secreción preovulatoria de LH se caracteriza por ser aguda y masiva.

El modelo de secreción de FSH es relativamente similar al de LH aunque el comienzo se produce un poco más tarde. Algunos autores proponen que la llegada a los valores máximos se produciría a la medianoche (Butcher y col., 1974), otros sugieren la existencia de dos picos máximos (dos fases) (Gay y col., 1970; Blake, 1976 b). Los valores séricos vuelven a ser basales durante la mañana del estro. La descarga preovulatoria de FSH es menos aguda que la de LH, pero de mayor duración.

En las horas previas a la secreción de ambas gonadotrofinas (período crítico) ocurre la descarga a la circulación portal de LH-RH (Sarkar y col., 1976).

De manera similar a lo que sucede con las gonadotrofinas, los niveles basales de PRL no se alteran hasta la tarde (14.00-16.00 hs) del proestro. El máximo nivel se alcanza antes del de LH. En la mañana del estro, los valores vuelven a

ser basales. Algunos investigadores describieron un segundo pico de PRL en la tarde del estro (Butcher y col., 1974; Meites y col., 1972; Reigle y Meites, 1976; Chiocchio y col., 1980).

En la rata, la progesterona (P) y el estradiol (E_2) son las dos hormonas ováricas cuya secreción se ha estudiado con mayor detalle (Butcher y col., 1974; Nequin y col., 1979).

Los valores de P muestran dos incrementos. El primero de ellos se produce durante la tarde del diestro I y la mañana del diestro II. Su origen es luteal, es de corta duración y magnitud. El segundo coincide con la descarga preovulatoria de LH y es de mayor magnitud, pero de menor duración que el primero. Esta progesterona es secretada por la capa de células granulosas del folículo maduro (Freeman, 1976).

La concentración de E_2 en suero durante el ciclo tiene características muy diferentes y es paralela a la maduración de los folículos que ovularán en ese ciclo. El incremento comienza en la tarde del segundo día del diestro, alcanzándose el valor máximo en la mañana del proestro. A partir de ese momento, las concentraciones séricas descienden y en la mañana del estro son basales nuevamente.

El ciclo estral de la rata es un modelo que permite estudiar los mecanismos neuroendócrinos que desencadenan la descarga de gonadotrofinas en un momento dado, que se determina

indirectamente de antemano, a través de la observación de ex tendidos vaginales. No hay manipulaciones experimentales que interfieran con el normal desarrollo de los acontecimientos.

Parte experimental

En el bioterio del Instituto de Neurobiología las condiciones ambientales en las que se encuentran los animales son las siguientes: los períodos de luz-oscuridad son de 14 y 10 horas respectivamente, las luces se encienden automáticamente a las 06.00 hs. Los animales reciben comida (Cargill dieta rr) y agua "ad libitum". Se colocan 10 ratas por jaula.

En el desarrollo de estos experimentos se utilizaron ratas vírgenes de 3 a 4 meses de edad, de la cepa Holtzman. Para la identificación de cada animal, se realizaron marcas en las orejas. Comúnmente, se tomaron grupos de 100 ratas para la determinación de los estadios del ciclo estral. Estas determinaciones se hicieron mediante la técnica de lavado del contenido vaginal y, se realizaron diariamente (6 días por semana) antes de las 10.00 hs. Sólo se utilizaron aquellas hembras que presentaron dos o más ciclos consecutivos regulares de 4 días de duración.

i. Medición del contenido de 5-HT en la eminencia media y en la "pars distalis".

Se sacrificaron los animales por decapitación en los

cuatro estadios del ciclo estral. Las horas de autopsia se fijaron a las 11.00 y 16.30 hs para todos los estadios, agregándose una hora más: las 14.00 hs para el proestro.

Inmediatamente luego del sacrificio se tomó sangre del tronco, se la dejó coagular a temperatura ambiente y luego de centrifugarla se guardó el suero a -20°C hasta el dosaje de las hormonas.

El lóbulo hipofisario anterior (AH) se disecó utilizando pinzas finas y evitando la contaminación con la zona neurointermedia. El tejido se homogeneizó con homogeneizadores de vidrio en 300 μl de HCl 0,1 N (Merck).

Para realizar la toma de la eminencia media (EM) se removió cuidadosamente el cerebro y se lo colocó sobre un bloque de hielo seco en el cual se había practicado una hendidura a fin de evitar dañar la cara basal del hipotálamo. Una vez congelado se ubicó el cerebro debajo de una lupa de disección y se realizaron los siguientes cortes: caudal, a la altura donde el tallo hipofisario parte de la eminencia media, dos cortes longitudinales a nivel de los límites laterales y un corte frontal en el punto donde los nervios ópticos entran en el cerebro. Luego de estos cuatro cortes, se levantó cuidadosamente el bloque con una aguja y se lo transfirió al émbolo de un microhomogeneizador (Chiocchio y col., 1976 a y b). En este experimento las eminencias medias se

homogeneizaron individualmente en 30 μ l de HCl 0,1 M.

De los homogenatos de los tejidos, LHA y EM, se retiraron 5 y 10 μ l respectivamente para el dosaje de proteínas (Lowry y col., 1951). El resto se centrifugó a 6000 x g durante 40 min. Diez μ l de cada sobrenadante se transfirieron a tubos Eppendorf de plástico, se les agregó 10 μ l de solución A (ver medición de 5-HT, radioenzimática) y se los guardó en la heladera hasta el día siguiente para proceder al dosaje de serotonina según el método anteriormente descrito.

ii. Medición de la actividad del sistema serotoninérgico de la eminencia media.

Se estimó este parámetro utilizando la inhibición de la MAO. Se administró pargilina (75 mg/kg de peso, ip) a las 13.00 y 15.30 hs, a ratas en proestro y diestro I. Los controles recibieron una inyección intraperitoneal de solución fisiológica (1 ml/kg). Los animales se sacrificaron por decapitación una hora después de la administración de la droga. La toma de sangre y de las muestras de eminencia media y, su procesamiento para el dosaje de hormonas y de serotonina, respectivamente, es idéntico al descrito en la sección i.

La evaluación estadística de los datos experimentales se realizó mediante el test "t" de Student; cuando el número de grupos fue superior a dos, se empleó el análisis de la varianza para determinar la presencia de grupos diferentes entre sí y

la significación se obtuvo con el test de Newman-Keuls.

3.2.2. Experimentos "in vitro": efecto de la serotonina sobre la secreción de LH

Generalidades

Para estudiar el sitio de acción de la 5-HT y su efecto sobre la secreción de LH se eligió una metodología "in vitro". Estas técnicas permiten evaluar directamente la acción de una sustancia sobre un tejido sin tener que recurrir a manipulaciones farmacológicas o quirúrgicas para aislarlo. Los argumentos esgrimidos en contra de los métodos "in vitro" se refieren en general a una posible incompleta o incorrecta difusión en los tejidos de las sustancias agregadas, a la degradación de estas sustancias y de las secretadas al medio, a la acumulación de sustancias, tóxicas o no, que pudieran alterar las respuestas de los tejidos y, fundamentalmente, a la pérdida de las influencias o controles que pueden ejercer otros tejidos sobre el que se encuentra bajo estudio.

La utilización de la incubación dinámica o perifusión representa una alternativa para disminuir el efecto de las desventajas enumeradas en primer término. Esta técnica ha sido utilizada en neuroendocrinología con bastante éxito (Gallardo y Ramírez, 1977; Chen y Ramírez, 1981) y se basa fundamentalmente en la circulación constante del medio de incubación que se recoge en fracciones, en las cuales se

puede determinar la concentración de la o de las sustancias deseadas.

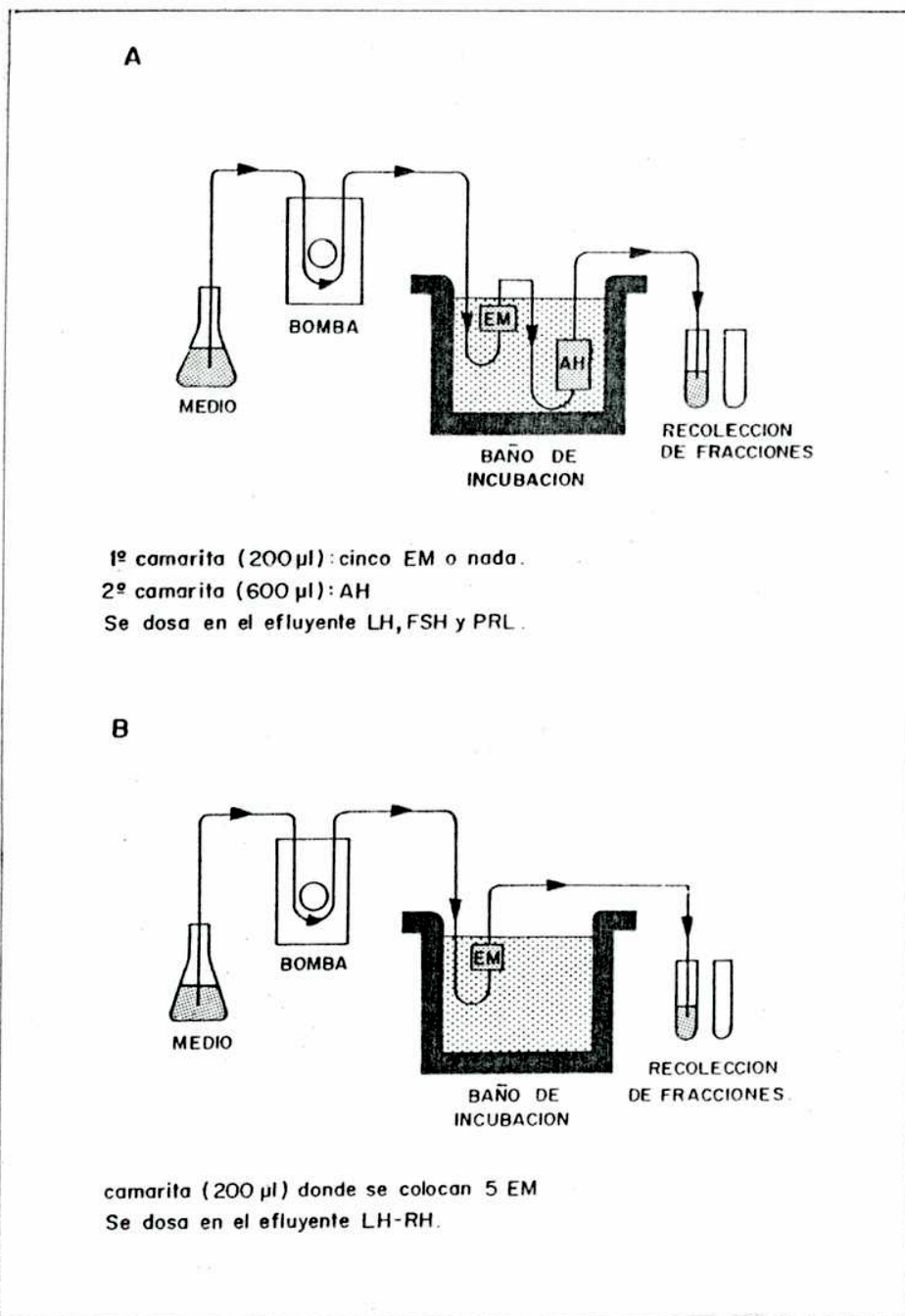
Parte experimental

Se evaluó el efecto de la 5-HT sobre las secreciones hipofisarias (LH, FSH, PRL) e hipotalámicas (LH-RH). Con tal sentido se procedió a incubar (perifusión) anterohipófisis (AH) solas o en serie con eminencias medias (EM) y, eminencias medias solas. En el primer caso se utilizó un dispositivo compuesto por dos camaritas en serie: las eminencias medias (cinco) se colocaron en la primera, que tiene un volumen de 200 μ l; en la segunda, con un volumen de 600 μ l, se colocó una anterohipófisis. Ambas cámaras están unidas entre sí a través de una conexión de plástico, de esta manera, el medio que se encuentra en la primera camarita puede pasar a la segunda. En los casos en los que se incubaron eminencias medias solas únicamente se utilizó la primera camarita (200 μ l) colocándose también 5 EM/camarita (fig 3).

Como medio de incubación se utilizó el Medio 199 (Gibco, sales de Hank adicionado con L-glutamina, pH ajustado en 7,20 con NaHCO_3 (s)). El medio es bombeado mediante una bomba peritáltica de velocidad constante (Gilson modelo HP 4, Villiers-le-bel, Francia).

Las eminencias medias y anterohipófisis se tomaron de

Fig 3: esquema de los sistemas de perfusión empleados en la realización de las incubaciones descriptas en las secciones 3.2. a y b.



ratas machos adultas y de hembras en proestro. La autopsia de los animales se realizó entre las 12.00 y 13.00 hs, sacrificándolos por decapitación. Los tejidos se disecaron en fresco, las anterohipófisis con pinzas finas y las eminencias medias con tijeras de microdissección, en ambos casos siguiendo los pasos descriptos (Chiocchio y col., 1976a). Después de la disección los tejidos se mantuvieron en frío sobre lana de vidrio embebida en medio de incubación. Una vez finalizada la toma de muestra se los colocó en la correspondiente camarita.

Las incubaciones se realizaron en un baño termostático tipo Dubnoff a 37°C con agitación constante y rápida. Cuando se incubaron anterohipófisis, ya sea solas o en serie con eminencias medias, el sistema se preincubó durante tres horas; en los casos en que las eminencias medias se incubaron solas se realizó una preincubación de una hora. Después de estas preincubaciones se comenzó a recoger el medio de perifusión en fracciones de 10 min (0,8 ml). Estas fracciones se recogieron en hielo e inmediatamente se congelaron a -20°C hasta el dosaje de hormonas.

Las diluciones de las drogas: 5-HT (complejo creatinina-sulfato, Sigma) y LH-RH (acetato, Sigma) se prepararon en el medio de incubación y 10 veces más concentradas que la concentración final deseada. Luego de ser precalentadas, se

las inyectó (20 μ l) en la primera camarita salvo indicación en caso contrario; la inyección se realizó en la forma de un pulso y después de una hora de incubación (cuando ya se habían recogido 6 fracciones). Cuando se estudió el efecto de antagonistas serotoninérgicos éstos se incluyeron en el medio de incubación. Como bloqueantes de receptores se utilizaron: ciproheptadina (clorhidrato, Merk, Sharp y Dohm) y metiotepín (maleato, La Roche).

Los valores de las hormonas en las fracciones de medio se expresan como porcentaje del valor basal, considerado éste como el 100% y calculado como el promedio de los valores correspondientes a las 6 primeras fracciones recogidas. Los datos experimentales se analizaron mediante el test "t" de Student comparando el promedio de los valores anteriores al agregado de las drogas con los posteriores al mismo. El cálculo de las pendientes se realizó mediante el método de regresión lineal.

En estas condiciones se realizó la siguiente serie de experimentos:

- a. Perifusión de anterohipófisis en serie con eminencias medias o solas
 - a.1. Anterohipófisis + 5 eminencias medias
 - a.1.1. tejidos obtenidos en ratas hembras en proestro, se

estudió el efecto de diferentes concentraciones de 5-HT (finales instantáneas 6,0; 0,6 y 0,06 μ M).

a.1.2. tejidos obtenidos en ratas machos, se estudió el efecto de la 5-HT (concentración final instantánea 0,6 μ M)

a.1.3. tejidos disecados en ratas hembras en proestro, se evaluó el efecto de la 5-HT (0,6 μ M) inyectada en la conexión que une la primera camarita con la segunda (50 μ l).

a.2. Anterohipófisis solas

a.2.1. tejidos obtenidos en ratas hembras en proestro, se estudió el efecto de LH-RH (100 pg) y de la 5-HT (concentración final instantánea en la primera camarita 6,0; 0,6 y 0,06 μ M)

b. Perifusión de eminencias medias

b.1. tejidos obtenidos en ratas hembras en proestro, se evaluó el efecto de la 5-HT (concentraciones finales instantáneas 60; 6,0; 0,6; 0,06 y 0,006 μ M).

3.2.3. Lesiones del núcleo dorsal del rafe. Sus consecuencias sobre el ciclo estral y la secreción de las gonadotrofinas y de la prolactina

Poco puede decirse aún acerca de la importancia fisiológica de la participación de la serotonina en los mecanismos que intervienen en la regulación de la secreción preovulatoria de las gonadotrofinas.

Los datos experimentales descriptos en la bibliografía sólo se refieren a las modificaciones que producen las lesiones del sistema serotoninérgico en la descarga "inducida" de LH (Héry y col., 1978; van de Kar y col., 1980; Waloch y col., 1981). De todas maneras, en estos casos ha sido posible determinar la necesidad de la integridad de este sistema para que la secreción "inducida" de LH proceda normalmente. Aún más, estos experimentos pusieron en relieve la importancia de las proyecciones serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe al hipotálamo (van de Kar y col., 1980).

El ciclo estral de la rata es un modelo que permite estudiar las consecuencias de la lesión del sistema serotoninérgico sobre diferentes parámetros relacionados con la secreción de las gonadotrofinas: a) modificaciones de la periodicidad de aparición de los estadios del ciclo (diestro, proestro, estro);. representan una desincronización de los mecanismos que determinan la constancia en la sucesión de las

manifestaciones más características del ciclo (descargas hormonales hipofisarias y ováricas); b) medición de la secreción preovulatoria de gonadotrofinas y prolactina: pueden producirse alteraciones en la duración y magnitud de las descargas y/o variaciones en la hora de comienzo de las mismas.

La lesión del núcleo dorsal del rafe elimina parte de la inervación serotoninérgica al hipotálamo, fundamentalmente elimina aferencias serotoninérgicas a las regiones donde se ubican las neuronas LH-RH (Palkovits y col., 1977 b; Jennes y col., 1982). La importancia que pudiera tener la 5-HT de este origen en los mecanismos regulatorios de las descargas hormonales del ciclo quedaría manifestada si la lesión del núcleo dorsal del rafe produjese modificaciones en algunas de las características de la secreción preovulatoria de las gonadotrofinas hipofisarias.

Parte experimental

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Holtzman que hubieran tenido por lo menos dos ciclos estrales regulares de cuatro días. Los animales se lesionaron durante la mañana del diestro I del tercer ciclo. Se formaron tres grupos experimentales: a) controles: sólo recibieron anestesia (Nembutal 40 mg/kg de peso), b) operación simulada (sham): anestesia y descenso del electrodo hasta tocar el piso del acueducto,

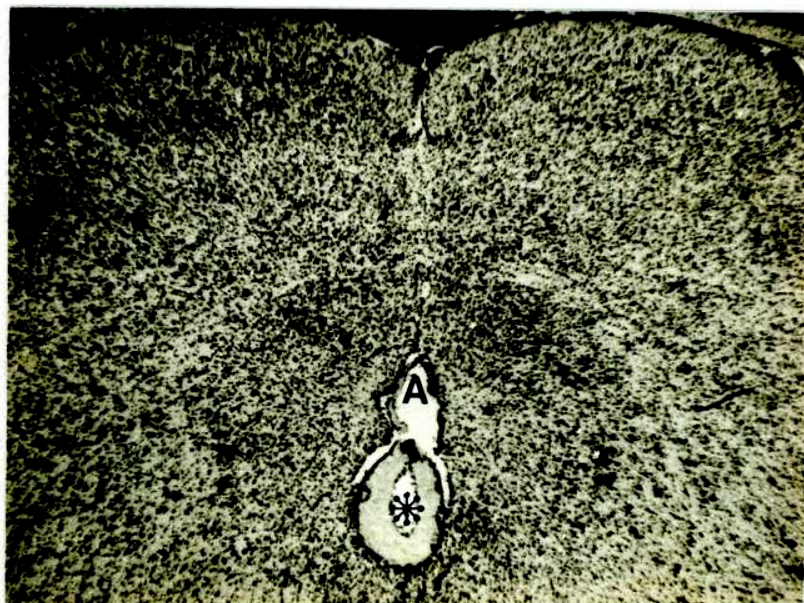
sin pasaje de corriente eléctrica y, c) lesionados: se realizaron lesiones electrolíticas, luego de colocado el animal en un aparato estereotáxico y mediante una aproximación dorsal se descendió dos veces el electrodo (Wolframio); en cada descenso se aplicó una corriente de 2 mA de intensidad durante 10 segundos, quedando destruidas en estas condiciones los tercios rostral y medio del núcleo (desde los planos 620 μm al 1270 μm del atlas de König y Klipel) (foto 1).

Los animales se sacrificaron por decapitación a las 11.00, 14.00, 16.30, 18.30, 21.00 y 01.00 hs. La autopsia de un grupo se realizó durante el primer proestro post-lesión (efecto agudo de la lesión), otro grupo de animales se sacrificó luego de 35-40 días de sobrevivida (efecto crónico de la lesión). En ambos casos se disecó la eminencia media para la medición del contenido de 5-HT y se recogió sangre para el dosaje de LH, FSH y PRL. En los animales en los que se evaluó el efecto crónico de la lesión se continuó con el registro de los estadios del ciclo vaginal hasta el día de la autopsia. En los animales de este grupo, sacrificados a las 14.00 se disecaron y pesaron las hipófisis (enteras), ovarios y úteros.

Luego de la autopsia y de la disección de la eminencia media los cerebros se fijaron en formol y se tiñeron con la técnica de Nissl para el control histológico de la lesión.

Las comparaciones estadísticas entre dos grupos experimentales se hicieron mediante el test "t" de Student; cuando el número de grupos era mayor se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) y el grado de significación entre los grupos se evaluó aplicando el test de Newman-Keuls.

Foto 1: Microfotografía de una sección coronal del tronco encefálico, donde se observa una lesión (*) del sector rostral del núcleo dorsal del rafe.



A = acueducto
Cs = colículo superior

ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE LA SEROTONINA DURANTE EL CICLO ESTRAL

4.1. Resultados

Como hemos mencionado inicialmente, el primero de los objetivos de esta Tesis es poder demostrar una relación entre la serotonina y la secreción preovulatoria de la hormona luteinizante. Con tal motivo se midió el contenido de 5-HT en el lóbulo hipofisario anterior y en la eminencia media en momentos claves del ciclo estral.

Durante el ciclo la actividad secretora de la glándula hipofisaria presenta un franco incremento en la tarde del proestro, tal como se ilustra en la Tabla I; en esta Tabla figuran los valores de las gonadotrofinas y de prolactina (promedio \pm error estándar y entre paréntesis se indica el número de animales) durante determinadas horas de cada estadio del ciclo. Las concentraciones séricas de LH y de FSH, que durante los dos días de diestro y la mañana del proestro permanecen bajas, aumentan rápidamente en la tarde (16.30 hs) del proestro; los niveles vuelven a ser basales en la mañana y tarde del estro. La secreción de prolactina durante el ciclo sigue un modelo similar al de las gonadotrofinas, con la salvedad de una descarga que se produce en la tarde del estro y que tendría la misma magnitud que la preovulatoria.

Tabla I: concentraciones séricas de LH, FSH y PRL (ng/ml de suero) durante el ciclo estral. (* $p < 0,01$).

Estadio	LH	FSH	PRL
Diestro I			
11.00 hs	35 ₋ 6 (10)	2,9 ₋ 0,2 (10)	27 ₋ 5 (10)
16.30 hs	41 ₋ 6 (6)	3,1 ₋ 0,2 (6)	40 ₋ 13 (6)
Diestro II			
11.00 hs	31 ₋ 6 (9)	2,8 ₋ 0,3 (9)	36 ₋ 11 (9)
16.30 hs	36 ₋ 6 (9)	2,2 ₋ 0,2 (9)	40 ₋ 6 (9)
Proestro			
11.00 hs	32 ₋ 5 (9)	3,3 ₋ 0,4 (9)	20 ₋ 3 (9)
14.00 hs	38 ₋ 6 (11)	2,9 ₋ 0,3 (10)	21 ₋ 3 (11)
16.30 hs	204 ₋ 35 (10)*	7,5 ₋ 0,8 (8)*	377 ₋ 90 (10)*
Estro			
11.00 hs	33 ₋ 6 (10)	2,3 ₋ 0,3 (7)	51 ₋ 14 (8)
16.30 hs	36 ₋ 6 (6)	2,4 ₋ 0,2 (6)	331 ₋ 125(6)*

Lóbulo hipofisario anterior.

A pesar de las alteraciones de la actividad secretora de la anterohipófisis, la concentración de serotonina del lóbulo hipofisario anterior no se modifica en ningún momento durante el ciclo. En la Tabla II se pueden observar los valores correspondientes para cada estadio; las determinaciones se hicieron a las 11.00 y 16.30 hs, cada valor corresponde al promedio \pm error estándar y entre paréntesis se indica el número de animales.

Tabla II: concentración de 5-HT (ng/mg de proteína) en el lóbulo hipofisario anterior durante el ciclo estral.

Estadio	11.00 hs	16.30 hs
Diestro I	1,22 \pm 0,13 (7)	1,24 \pm 0,13 (6)
Diestro II	1,18 \pm 0,15 (8)	1,48 \pm 0,12 (9)
Proestro	1,37 \pm 0,13 (8)	1,30 \pm 0,12 (12)
Estro	1,19 \pm 0,13 (6)	1,34 \pm 0,05 (6)

Un estudio más detallado durante el proestro tampoco pone de manifiesto alguna modificación en la concentración de 5-HT de la hipófisis anterior, así lo indican los valores (promedios \pm error estándar) que figuran en la Tabla III.

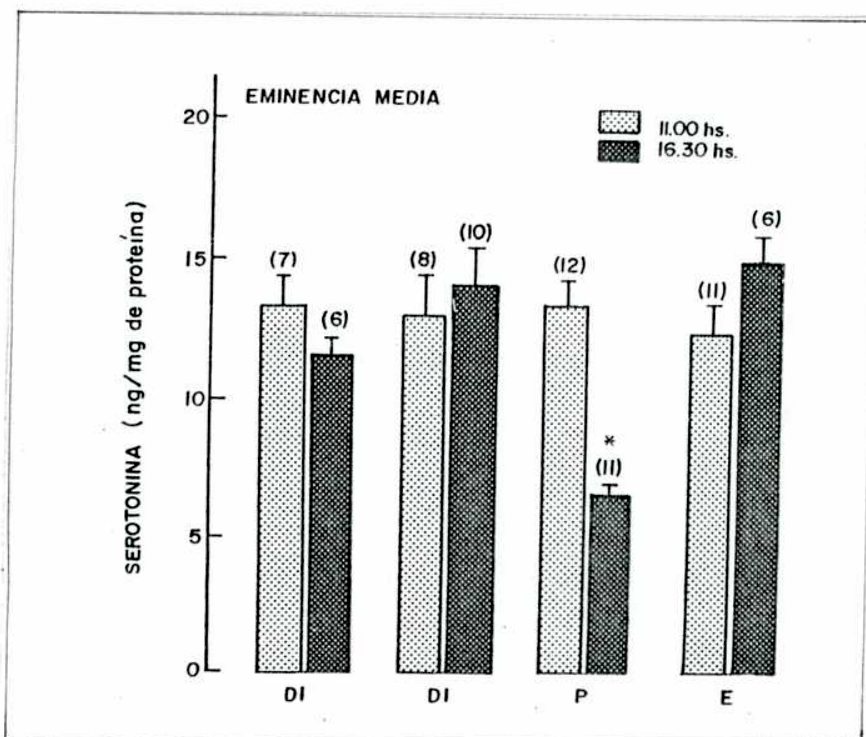
Tabla III: concentración de 5-HT (ng/mg de proteína) en el lóbulo hipofisario anterior durante el proestro.

horas	5-HT
11.00 hs	1,35 \pm 0,11 (14)
14.00 hs	1,07 \pm 0,09 (15)
16.30 hs	1,24 \pm 0,12 (12)

Eminencia media

Contrariamente a la estabilidad que presenta la serotonina de la adenohipófisis durante el ciclo estral, la de la eminencia media sufre importantes variaciones, las que se han esquematizado en la figura 4. En ella, cada barra representa el promedio de () determinaciones, el asterisco indica el grado de significación.

Fig. 4: concentración de 5-HT en la eminencia media durante el ciclo estral.



En el diestro I y II (DI y DII) la concentración de serotonina de la eminencia media permanece estacionaria; en ambos estadios los valores medidos a la mañana (11.00 hs) son similares a los de la tarde (16.30 hs). Este nivel se mantiene durante la mañana del proestro (P), pero, en la tarde de este día se detecta una depleción en la concentración del orden del 50% (* $p < 0,0001$ vs las demás horas y estadios). En la mañana del estro (E) se vuelven a recuperar los valores previos a la caída de la concentración.

Al aumentarse el número de horas durante el proestro, en las cuales se midió la serotonina de la eminencia media, puede verse (Tabla IV) que la disminución de la concentración ocurre entre las 14.00 y 16.30 hs y no antes; no obstante, a las 14.00 hs se observa una mayor dispersión de los datos individuales respecto de los obtenidos a las 11.00 hs como lo denota el mayor error. Cada valor colocado en la Tabla representa el promedio \pm error estándar y el número de animales se indica entre paréntesis.

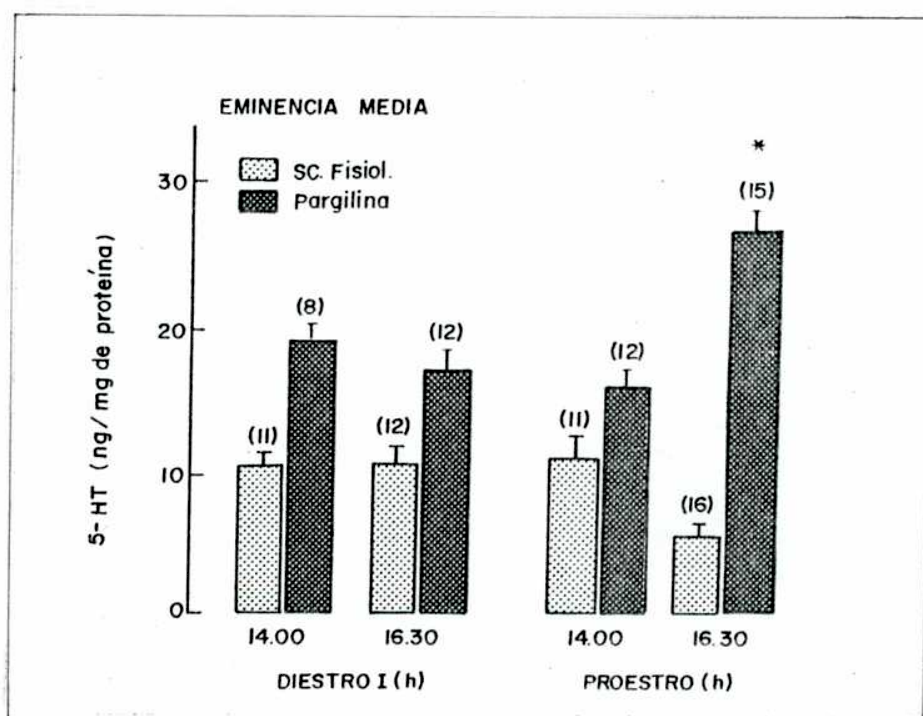
Tabla IV: concentración de 5-HT (ng/mg de proteína) en la eminencia media durante el proestro.

horas	5- HT
11.00 hs	11,78 \pm 0,72 (12)
14.00 hs	13,00 \pm 2,23 (9)
16.30 hs	0,87 \pm 6,72 (10)*

* $p < 0,05$ vs 11.00 y 14.00 hs.

Posteriormente estudiamos el metabolismo de la serotonina en la eminencia media utilizando la inhibición de la degradación del neurotransmisor mediante el bloqueo de la MAO con pargilina. (fig 5).

Fig 5: concentración de 5-HT en la eminencia media luego de la inhibición de la MAO (pargilina)



Los animales inyectados con el inhibidor presentan una acumulación de serotonina en la eminencia media (fig 5, pargilina). Esta acumulación es máxima en la tarde del proestro (* $p < 0,0001$).

Los valores hormonales de estos animales figuran en la Tabla V (promedios \pm error estándar y número de animales

observados entre paréntesis).

Tabla V: Valores séricos de LH, FSH (ng/ml) en los animales inyectados con solución fisiológica o pargilina 1 hora previa a la autopsia

	LH	FSH
Diestro I		
14.00 hs S.F.	47±5 (10)	2,7±0,3 (9)
Parg.	48±3 (8)	2,5±0,2 (8)
16.30 hs S.F.	44±6 (12)	2,4±0,2 (10)
Parg.	45±7 (10)	2,7±0,2 (10)
Proestro		
14.00 hs S.F.	48±6 (10)	3,0±0,4 (10)
Parg.	40±5 (11)	3,1±0,3 (8)
16.30 hs S.F.	200±25 (16)*	8,8±0,6 (13)*
Parg. P	248±36 (14)*	9,3±0,4 (11)*

* $p < 0,01$

4.2. Discusión

La descarga preovulatoria de las gonadotrofinas y de prolactina involucra la puesta en funcionamiento de una serie de mecanismos de diversa índole, muchos de ellos de naturaleza nerviosa (Everett, 1972). La posibilidad de que el sistema serotoninérgico forme parte de estos mecanismos proviene principalmente de resultados obtenidos en experimentos farmacológicos (Labhsetwar, 1971; Kordon, 1971; Kordon y Glowinski, 1972; Héry y col., 1975b; Coen y col., 1980; Walker, 1980). En nuestros estudios, utilizando un enfoque experimental diferente, hemos obtenido evidencias de la participación de la serotonina de la eminencia media en la secreción preovulatoria de LH y de FSH.

La medición de la concentración de 5-HT en la eminencia media a lo largo del ciclo estral muestra un descenso del orden del 50% en la tarde del proestro (16.30 hs). El hecho de que en los demás estadios no se adviertan diferencias entre los valores de las 11.00 y 16.30 hs nos permite descartar la posibilidad de que la fluctuación corresponda a un ritmo circadiano. Por otra parte, si se aumenta el número de horas durante el proestro en las cuales se mide la concentración de serotonina, se observa que el descenso del contenido se produce entre las 14.00 y 16.30 hs, intervalo que coincide con el comienzo de la descarga preovulatoria de LH, FSH y

PRL. Esto sugiere una correlación temporal entre ambos fenómenos.

Muchos son los resultados experimentales que adjudican a la 5-HT un papel estimulador en el control de la liberación de PRL (Kordon y col., 1973; Caligaris y Taleisnik, 1974; Gallardo y col., 1975; Clemens y col., 1978; Weiner y Ganong, 1978; Krulich, 1979; Culman y col., 1980; Meites y Sonntag, 1981; Johnston y col., 1984). No obstante, todavía no está claro si la 5-HT participa a través de un PRF (prolactin releasing factor) o inhibiendo la secreción de un PIF (prolactin inhibiting factor) o a nivel hipofisario.

Mena y sus colaboradores (1976) describieron un descenso del contenido de serotonina en el hipotálamo durante la descarga de prolactina inducida por la succión de las crías en ratas lactantes. En nuestros experimentos hemos observado que en la tarde del estro hay una liberación preferencial de prolactina que no está acompañada por ninguna modificación de la concentración de 5-HT en la eminencia media. Si bien este resultado y el obtenido por el grupo de Mena no son comparables, sugieren en conjunto, que de existir una relación entre el sistema serotoninérgico y la secreción de PRL, tal relación no se verificaría a nivel de la eminencia media sino que posiblemente se localice en otro núcleo o áreas hipotalámicas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la depleción del contenido de serotonina de la eminencia media que se produce en la tarde del proestro estaría relacionada con la secreción preovulatoria de LH y de FSH, más que con la de PRL.

La "caída" de la concentración de la serotonina puede interpretarse de dos maneras: como una disminución de su síntesis o como un aumento de su catabolismo, asociado a un incremento de la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico, puesto que la serotonina que se degrada es, preferentemente, la que ha sido liberada a la hendidura sináptica y recaptada por el terminal. En el primer caso, una disminución de la velocidad de síntesis podría significar la remoción de una interferencia para la descarga hormonal preovulatoria. Si esto es así, la serotonina tendría una función inhibitoria. La segunda interpretación, en cambio, sugiere el ejercicio de una influencia positiva sobre los mecanismos que determinan la secreción de LH.

Los datos aportados por la medición del contenido de 5-HT no permiten optar por ninguna de las dos posibilidades. Sin embargo, proporcionan una información muy interesante y es que en el momento en que se produce la secreción preovulatoria de las gonadotrofinas, el sistema serotoninérgico sale del estado estacionario caracterizado por la invariabilidad en el tiempo de las características macroscópicas del sistema (v.g.,

la concentración). La pérdida de la condición de estado estacionario es típica de los mecanismos de "disparo" de los fenómenos biológicos.

Una manera de medir la actividad de un sistema neuronal es inhibir la degradación del neurotransmisor; así, la acumulación que se produce en el terminal representa el balance neto entre lo que se sintetiza, se libera y se recapta. En el caso del sistema serotoninérgico, el 80% de lo que se libera en la sinapsis es retomado por el terminal, en consecuencia, como primera aproximación, los dos últimos términos se anulan y el balance puede considerarse como el resultado de la síntesis. Por lo tanto, si la velocidad de síntesis ha aumentado, la cantidad de 5-HT acumulada en el terminal durante un intervalo constante es proporcionalmente mayor. En nuestro caso el inhibidor de la MAO utilizado (pargilina), produce una acumulación lineal de serotonina dentro de la hora y media posterior a su administración (Neckers y Meek, 1976; van Loon y col., 1981). La MAO es una enzima compartida con el sistema catecolaminérgico, pero, las catecolaminas son degradadas preferentemente por la catecol-O-metiltransferasa (COMT); por esto mismo, la inhibición de la MAO no se utiliza para medir la actividad de los sistemas dopaminérgicos y noradrenérgicos.

La inhibición de la degradación de la 5-HT durante

distintas horas del diestro I y del proestro muestra que la actividad del sistema aumenta significativamente en la tarde (16.30 hs) del proestro. Este resultado sugiere que la depleción de la concentración del neurotransmisor en la eminencia media, que habíamos hallado inicialmente, representaría la liberación de la 5-HT.

Es interesante comparar estos resultados con los obtenidos por Wise y col., (1981) en relación a los movimientos de la concentración de LH-RH en la eminencia media. Este grupo de investigación observó que la concentración de LH-RH en la eminencia media sufre variaciones previas y concomitantes con la secreción preovulatoria de LH y FSH. Adaptando el horario del bioterio de ellos al nuestro, se advierte entre las 11.00 y 14.00 hs un aumento de la concentración de LH-RH posiblemente como consecuencia de una mayor síntesis y de un mayor tránsito del péptido hacia la zona de liberación. A este aumento le sucede una disminución de la concentración entre las 14.00 y 17.00 hs que se puede considerar como el resultado de su secreción a la circulación portal, ya que en este momento se detecta un descenso del LH-RH inmunorreactivo en la eminencia media (Polkovska y Justisz, 1974), un aumento de la velocidad de secreción de LH-RH (Levine y Ramírez, 1982), una mayor concentración de LH-RH en los vasos portales (Sarkar y col., 1976) y aumentan los niveles séricos de las gonado-

trofinas (ver Resultados).

El metabolismo de la 5-HT en la eminencia media experimenta un aumento entre las 14.00 y 16.30 hs, justamente cuando se libera LH-RH. Esto sugiere una correlación, a nivel de la eminencia media, entre la serotonina y la secreción pre-ovulatoria de LH-RH. Además, puesto que la actividad del sistema serotoninérgico es máxima en el momento en que se descargan LH-RH y las gonadotrofinas, la 5-HT tendría un papel estimulador en este proceso. El hecho de que la alteración del metabolismo de la serotonina se produzca en la eminencia media sugiere que la 5-HT estimula la liberación de LH-RH.

El aumento de la liberación de la serotonina en la eminencia media podría tener otra interpretación. El neurotransmisor podría liberarse a la circulación portal y, actuando a nivel hipofisario, regular el efecto del LH-RH. En general, los datos experimentales sugieren un papel central para la serotonina en la secreción del LH (Cramer y Barraclough, 1978; Ryu y col., 1980). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos experimentos no se realizaron, en la mayoría de los casos, en condiciones óptimas. Aún más, datos recientes describen la captación específica de 5-HT por una población de células anterohipofisarias tal vez gonadotropas (Núñez y col., 1980; Johns y col., 1982; Payette y col., 1985).

Los movimientos de la concentración de serotonina en el lóbulo hipofisario anterior pueden ser considerados como consecuencia de la liberación del neurotransmisor desde la eminencia media y su captación por las células hipofisarias, o bien reflejar alteraciones de su metabolismo intrapituitario. Johnston y col. (1983) dosaron el contenido de 5-HT en los vasos portales y observaron que la sangre portal es levemente más concentrada en 5-HT que la periférica, sugiriendo la posibilidad de que el neurotransmisor se libere en parte desde la eminencia media. Ya hemos mencionado que una explicación alternativa de la depleción del contenido de 5-HT de la eminencia media era justamente su liberación a la circulación portal. Si el origen de la serotonina presente en la "pars distalis" es exclusivamente intrahipofisario (Friedman y col., 1983), modificaciones de su concentración podrían significar alteraciones de su metabolismo o bien cambios en las posibles poblaciones o "pools" serotoninérgicos que pudieran estar asociados a las poblaciones o "pools" de LH (Mukhopadhyay y col., 1979) como se ha sugerido para la dopamina y la prolactina (Gallardo y col., 1985).

La concentración de serotonina en la "pars distalis" no se modifica en ninguno de los estadios del ciclo estral. Por lo tanto, la caída de su concentración en la eminencia media durante la tarde del proestro no está acompañada de un aumento

de su concentración anterohipofisaria. Esto permite descartar, en principio, la hipótesis de la liberación del neurotransmisor a la circulación portal en el momento en que se comienzan a descargar las gonadotrofinas. De todas maneras, se necesita realizar estudios "in vitro" para poder establecer definitivamente si esta hipótesis es válida o no. La ausencia de alteraciones en la "pars distalis", no sólo a lo largo del ciclo estral sino también durante diferentes horas claves del proestro en las cuales se producen cambios agudos en la actividad secretoria hipofisaria, también sugiere la 5-HT intrahipofisaria no estaría asociada a la secreción preovulatoria de gonadotrofinas a este nivel.

Cuando la prolactina se secreta sola en la tarde del estro, no hay un movimiento concomitante de la 5-HT en el lóbulo hipofisario anterior, descartando un efecto de la 5-HT intrapituitaria sobre la secreción de PRL.

Concluyendo, nuestros resultados demuestran que la serotonina de la eminencia media está relacionada con la secreción preovulatoria de LH y no lo está con la de prolactina. El incremento del metabolismo serotoninérgico sugiere una función estimuladora, inclinándose las evidencias hacia una interacción a nivel de la secreción de LH-RH, aun cuando no se pueda excluir definitivamente la posibilidad de la liberación de 5-HT a la circulación portal. En apoyo de la primera

hipótesis, contamos con las observaciones aportadas por Jen-
nes y col. (1982) acerca de una superposición espacial de
fibras serotoninérgicas y de LH-RH en la eminencia media.

La serotonina intrahipofisaria no participaría en la
secreción de las gonadotrofinas ni en la de prolactina.

EFECTO DE LA SEROTONINA SOBRE LA SECRECIÓN "IN VITRO" DE LH

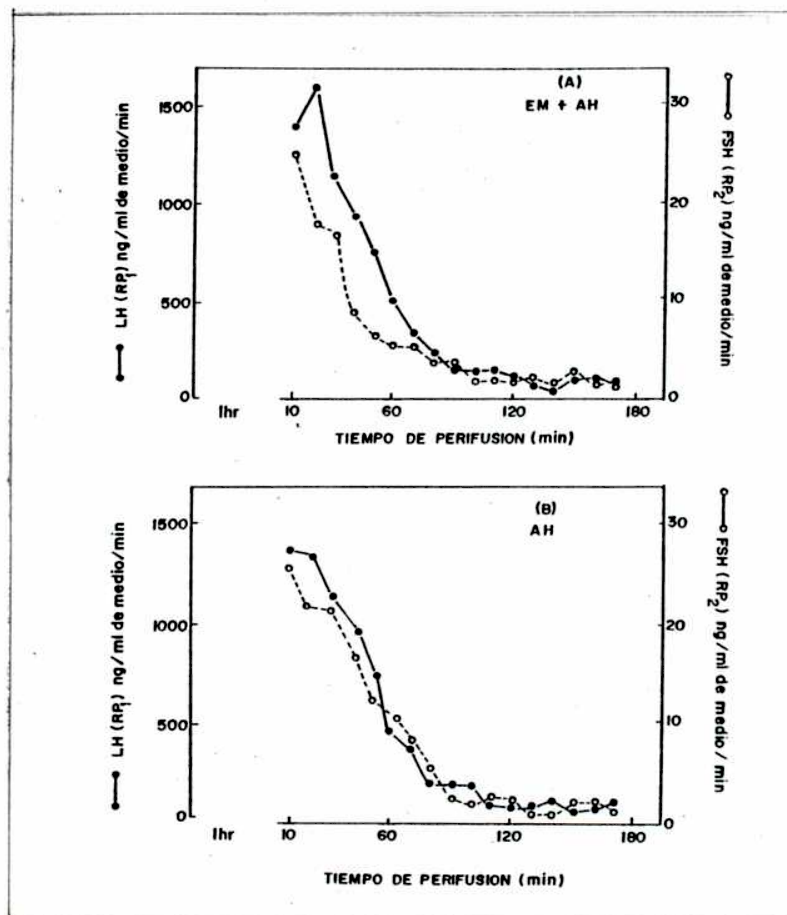
5.1. Resultados

La incubación dinámica del lóbulo hipofisario anterior y de zonas discretas de tejido nervioso (eminencias medias) posibilita la investigación y evaluación del efecto de la serotonina sobre la secreción de las gonadotrofinas y, al mismo tiempo, permite ubicar su nivel de acción.

Colocadas las hipófisis anteriores en el medio de incubación, alcanzan el estado estacionario de secreción después de tres horas de perfusión, independientemente de la presencia de las eminencias medias en la primera camarita (fig 6) (ver Materiales y Métodos, sección 3.2.2.). Como puede apreciarse en la figura, luego de este período de adaptación las velocidades basales que se registran son:

A) EM+AH: LH=141 \pm 8 ng/ml/min; FSH=2,7 \pm 0,2 ng/ml/min; PRL=273 \pm 14 ng/ml/min; B) AH: LH=148 \pm 6 ng/ml/min; FSH=2,9 \pm 0,2 ng/ml/min; PRL=264 \pm 11 ng/ml/min. No se registran diferencias significativas entre las velocidades de secreción de las tres hormonas en el sistema donde se incuban eminencias medias en serie con un lóbulo hipofisario anterior (A) y las velocidades alcanzadas en el sistema donde sólo se incubaba un lóbulo hipofisario anterior (B). Estos resultados se obtuvieron con tejidos disecados en ratas hembras en proestro.

Fig. 6: Liberación de LH y de FSH al medio de perfusión. Los tejidos incubados se diseccionaron en ratas hembras en proestro. EM+AH= 5 eminencias medias + lóbulo hipofisario anterior; AH= 1 lóbulo hipofisario anterior.



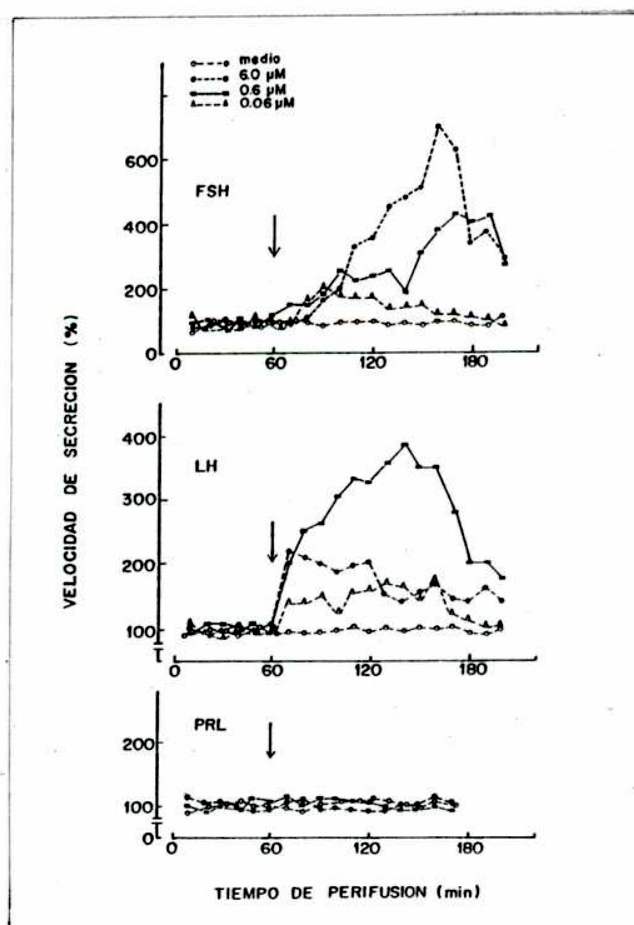
Efecto de la serotonina sobre el sistema "eminencias medias + lóbulo hipofisario anterior"

Ratas hembras en proestro

Utilizando el sistema completo, es decir, cinco eminencias medias en la primera camarita y una anterohipófisis en

la segunda y, empleando tejidos de ratas hembras en proestro, estudiamos el efecto de diferentes concentraciones de serotonina sobre la secreción hipofisaria de LH, FSH, y PRL. La 5-HT se inyecta en la camarita que contiene las eminencias medias en la forma de un pulso, de manera tal de alcanzar las siguientes concentraciones finales instantáneas: 6,0; 0,6 y 0,06 μM . En la figura 7 se muestra como ejemplo un experimento tipo.

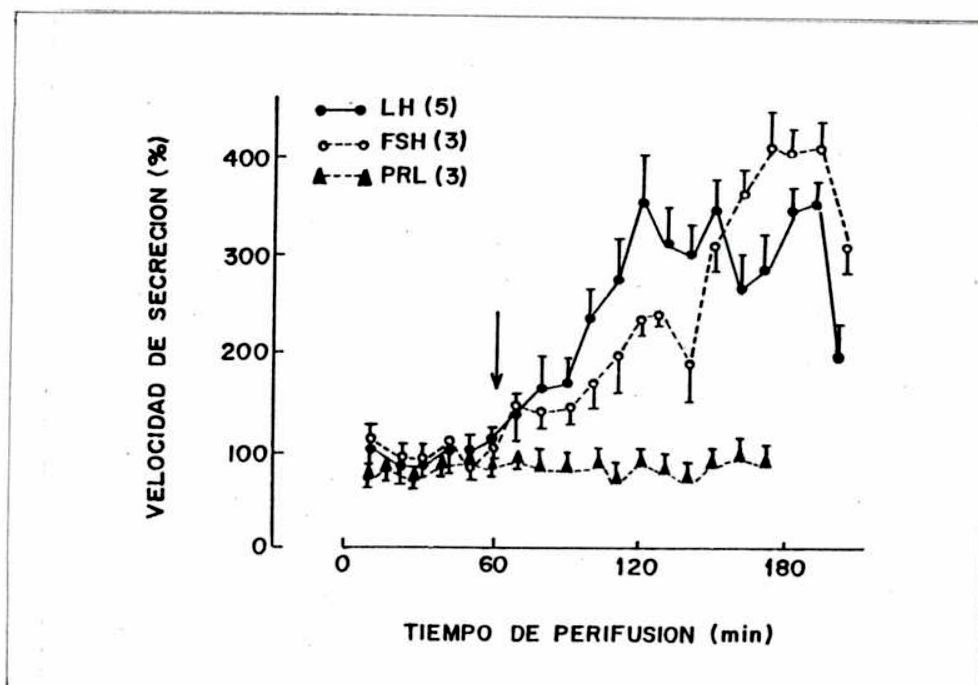
Fig. 7: efecto de la 5-HT (flecha) sobre la velocidad de secreción de las gonadotrofinas y prolactina. Se incubaron en serie EM+ 1 AH (proestro).



En esta figura se ha graficado el efecto que produce la inyección de diferentes concentraciones de 5-HT sobre la secreción hormonal hipofisaria. En cada caso (cada concentración) se evaluó la respuesta secretoria de un mismo sistema (EM+AH). Como puede observarse en la figura, la serotonina, en las tres concentraciones escogidas, incrementa la velocidad de liberación de las gonadotrofinas sin modificar la de prolactina (los valores se expresan como porcentaje respecto de la velocidad de secreción basal (100%)). La concentración de 0,6 μ M es la que produce una mayor estimulación en la velocidad de secreción de LH, en consecuencia, se eligió esta concentración para realizar nuevos experimentos.

El efecto que sigue a la inyección de 5-HT (0,6 μ M) sobre las eminencias medias puede observarse fácilmente si se promedian para cada fracción de medio recogida los valores hormonales (en porcentajes) correspondientes a varios ensayos (el número se indica en el gráfico). Así, queda demostrado en la figura 8 que la 5-HT induce un incremento en la velocidad de liberación de LH y FSH, sin que se vea mayormente afectada la liberación de prolactina.

Fig 8: efecto de la inyección de 5-HT (0,6 μ M) (flecha) sobre la velocidad de secreción de LH, FSH y PRL. (5 EM+ 1 AH, hembras en proestro).



Analizando esta figura, la aceleración que causa la serotonina sobre la velocidad de secreción de las gonadotropinas puede caracterizarse de la siguiente manera:

LH: el incremento de la velocidad de secreción de esta hormona es rápido (pendiente de ascenso $4,35 \pm 0,61$ %/min) y prácticamente inmediato, en la segunda fracción post-inyección ya se ha alcanzado un 150% de estimulación; la máxima (360%) se produce a los 60 min después del agregado de 5-HT. Durante los siguientes 80 min la velocidad de secreción se mantiene elevada, comenzando a decaer a los

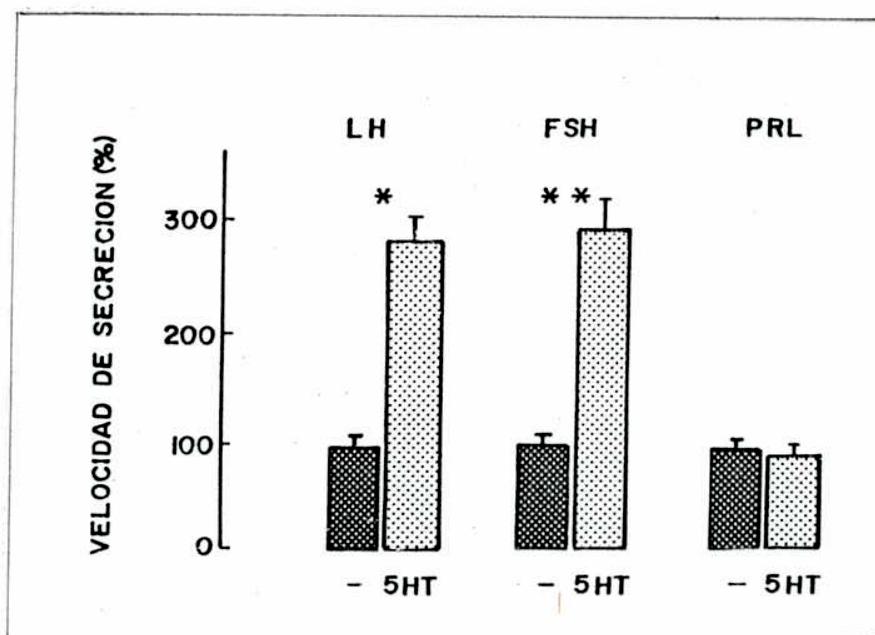
190 min post-inyección.

FSH: la respuesta es en este caso más lenta, el primer aumento significativo se observa a los 40 min después de haberse agregado la serotonina y es de 160%; se llega al máximo (400%) a los 110 min post-inyección. La pendiente, que ejemplifica la aceleración con que aumenta la velocidad de secreción, es de $1.92 \pm 0,34\%/min$. Hay una diferencia significativa ($p < 0,01$) entre ésta y la de LH. A los 190 min la velocidad de liberación de FSH al medio de perfusión comienza a disminuir.

PRL: la serotonina no modifica la secreción de esta hormona en las condiciones en que se desarrollaron los experimentos.

Una comparación entre la capacidad de estimulación que posee la 5-HT sobre la velocidad de liberación de cada hormona puede realizarse, en forma práctica, en un gráfico de barras como en la figura 9. Cada barra representa el promedio de los valores previos (-) y posteriores (5-HT) al agregado de serotonina al medio de perfusión de la primera camarita.

Fig 9: estimulación diferencial de la 5-HT sobre la velocidad de secreción de LH, FSH y PRL
 * $p < 0,001$; ** $p < 0,0005$.

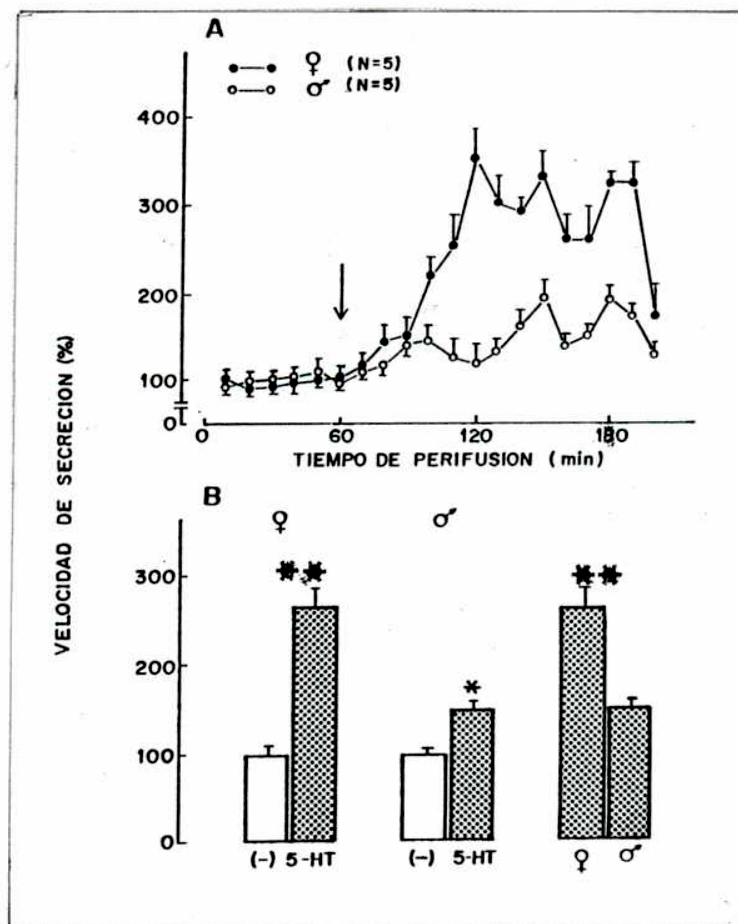


Ratas machos

Posteriormente estudiamos el efecto de la serotonina sobre eminencias medias y anterohipófisis incubadas en serie, pero esta vez disecadas en ratas machos. Como sucede en el caso de las hembras, el sistema alcanza el estado estacionario en la secreción de LH luego de tres horas de incubación; en este momento la velocidad de liberación de la hormona es de 129 ± 10 ng/ml/min, valor que no difiere del observado en la incubación de eminencias medias y anterohipófisis de ratas hembras (141 ± 8 ng/ml/min).

Luego de este período de estabilización, la inyección de serotonina en el medio de incubación de la primera camarita (concentración final instantánea $0,6 \mu\text{M}$) estimula la velocidad de secreción de LH (fig 10a), aunque el aumento es mucho más lento que en el caso de las hembras (fig 10a) y significativamente menor (fig 10b).

Fig 10a): estimulación de la velocidad de secreción de LH en tejidos (EM+AH) de ratas hembras y machos por acción de la 5-HT ($0,6 \mu\text{M}$); b) comparación de la velocidad de secreción pre (-) y post-inyección de 5-HT en hembras y machos. * $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

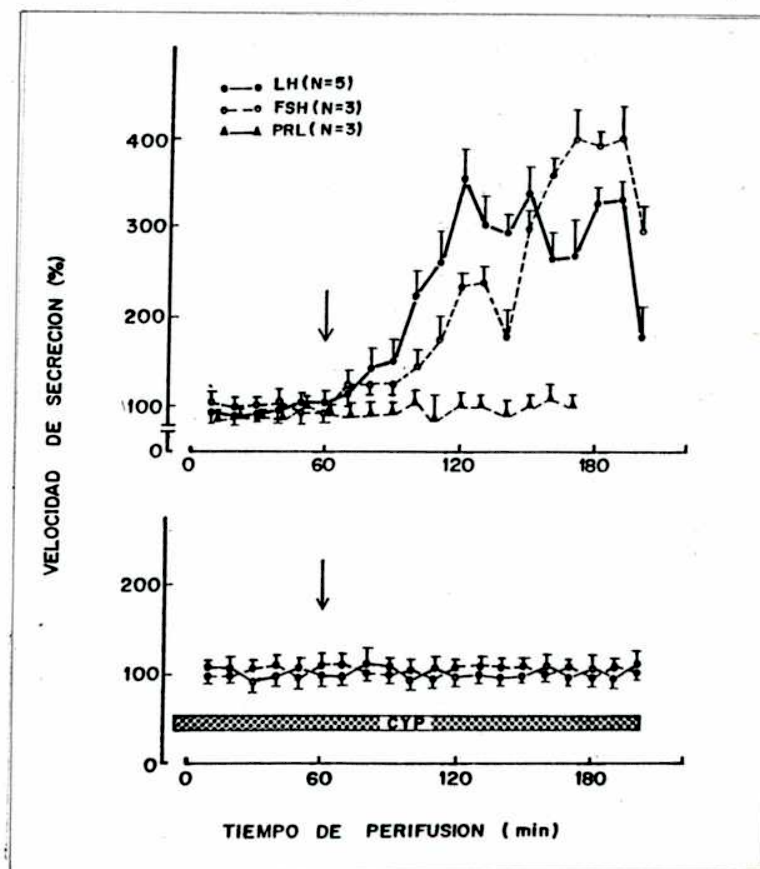


Especificidad del efecto de la 5-HT sobre la secreción de las gonadotrofinas

La especificidad del efecto de la serotonina se evaluó a través de la acción de un bloqueante de los receptores serotoninérgicos: la ciproheptadina (CYP). Para la realización de estas experiencias decidimos utilizar eminencias medias y anterohipófisis de ratas hembras en proestro, por ser este sistema mucho más sensible a los cambios en la velocidad de secreción de las gonadotrofinas que el de las ratas machos.

La inclusión de este antagonista serotoninérgico en el medio de perfusión (ver Materiales y Métodos sección 3.2.2.) no modifica la secreción de LH, FSH ni la de PRL; en cambio, anula totalmente la acción estimuladora de la serotonina ($0,6 \mu\text{M}$) sobre la liberación de las gonadotrofinas. Estos resultados se ilustran en la figura 12. En la zona superior de la figura se vuelve a mostrar el efecto estimulador de la 5-HT sobre la velocidad de secreción de LH y FSH a efectos de facilitar la visualización del bloqueo que produce la presencia de CYP ($1 \mu\text{M}$) (se indica mediante una barra horizontal punteada) en el medio de perfusión.

Fig 12: arriba: incremento de la velocidad de secreción de LH y FSH por acción de la 5-HT; abajo: bloqueo del efecto de la 5-HT por inclusión en el medio de incubación de ciproheptadina (CYP 1 μ M).



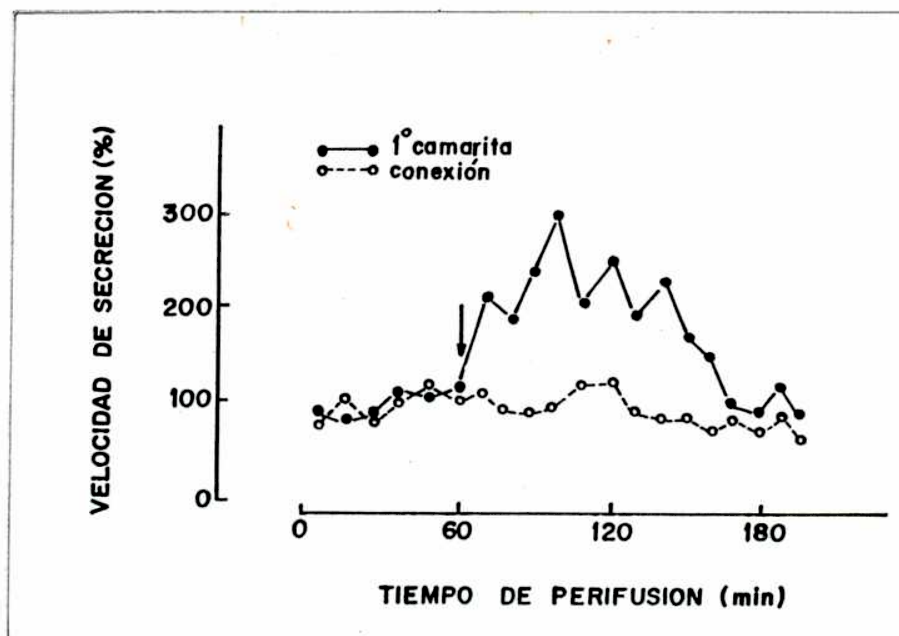
Con la finalidad de determinar el sitio de acción de la serotonina en su actividad estimuladora de la liberación de LH y FSH se realizaron los siguientes experimentos.

Efecto de la 5-HT sobre el lóbulo hipofisario anterior

Se inyectaron 50 μ l de una solución de serotonina 0,6 μ M

en la conexión que une la primera camarita con la segunda en un sistema completo, es decir, cuando se incuban en serie eminencias medias y anterohipófisis de hembras en proestro. Bajo tales condiciones la 5-HT no estimula la liberación de LH (fig 13).

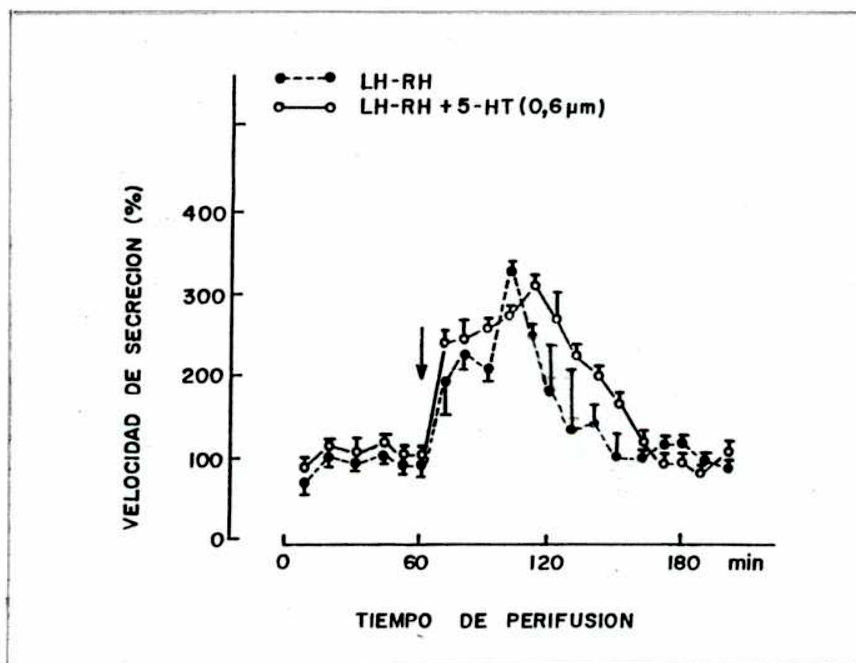
Fig 13: efecto diferencial de la 5-HT (flecha) sobre la secreción de LH cuando se la inyecta en la primera camarita o en la conexión que une a ésta con la segunda.



Cuando las anterohipófisis de ratas hembras en proestro se incuban solas (experimentos a.2., ver Materiales y Métodos sección 3.2.2.) la inyección de 100 pg de LH-RH en la primera camarita incrementa inmediatamente la secreción de LH al medio de perifusión de una manera bastante similar a

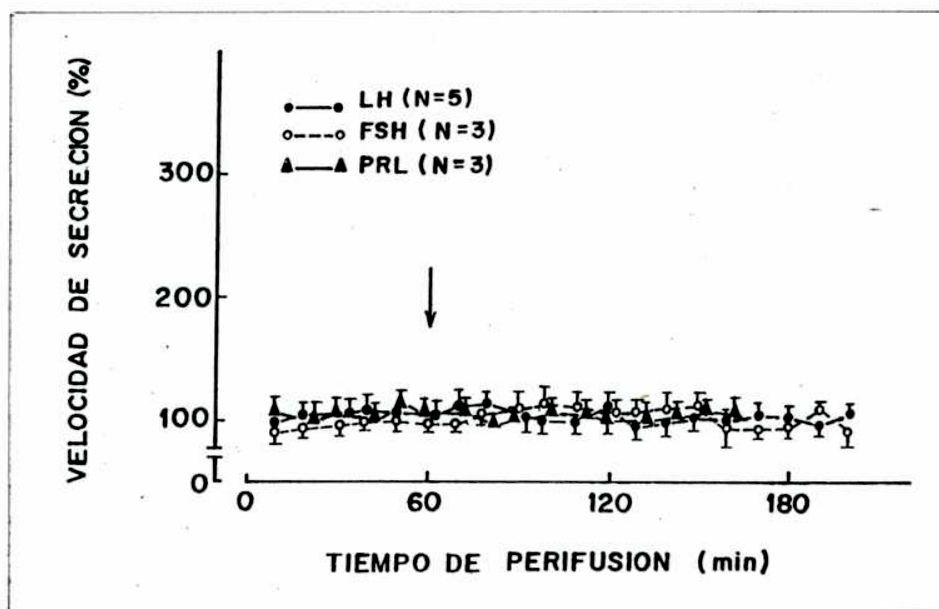
la estimulación que produce la adición de serotonina ($0,6 \mu\text{M}$) en un sistema completo (eminencias medias + anterohipófisis) (fig 8). El efecto del LH-RH parecería ser, no obstante, de menor duración que el que causa la serotonina. La 5-HT ($0,6 \mu\text{M}$) inyectada en forma conjunta con el LH-RH no modifica el efecto estimulador de la neurohormona (fig 14).

Fig 14: efecto del LH-RH y de LH-RH + 5-HT sobre la secreción de LH en un sistema donde se incubaba una anterohipófisis de rata hembra en proestro



Por otra parte, la inyección de serotonina ($0,6 \mu\text{M}$) en la primera camarita no altera la velocidad de secreción de las gonadotrofinas, así como tampoco afecta la liberación de prolactina (fig 15).

Fig 15: efecto de la 5-HT (flecha) sobre la velocidad de secreción de LH, FSH y PRL, en un sistema donde se incubaba una anterohipófisis de rata hembra en proestro. Entre paréntesis se indica el número de experimentos.

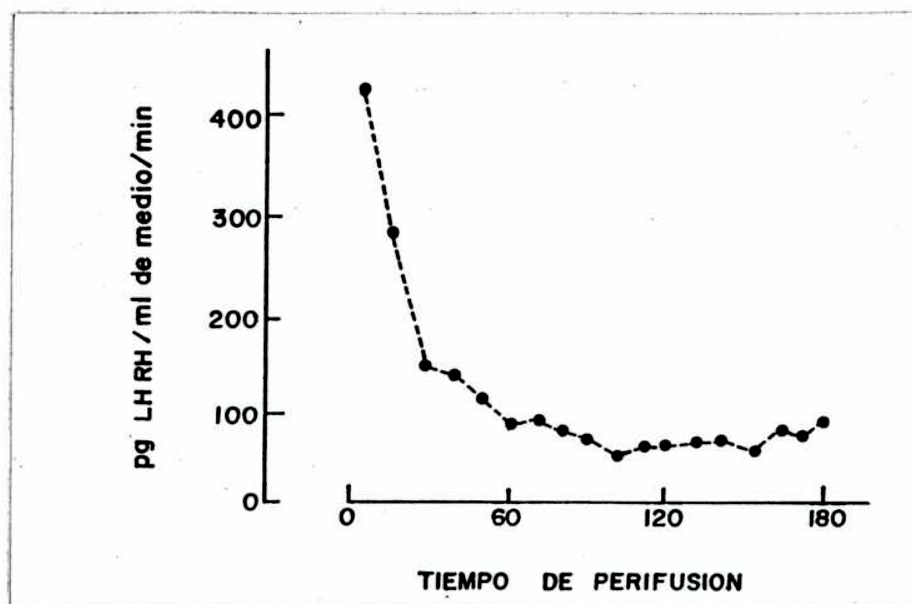


Efecto de la 5-HT sobre la eminencia media

En vista de los resultados obtenidos, que señalan la existencia de un efecto acelerador de la 5-HT sobre la velocidad de liberación de las gonadotropinas sólo cuando se encuentra presente en el sistema la eminencia media, decidimos estudiar directamente la acción del neurotransmisor sobre la liberación de LH-RH (experimentos b., ver Materiales y Métodos, sección 3.2.2.).

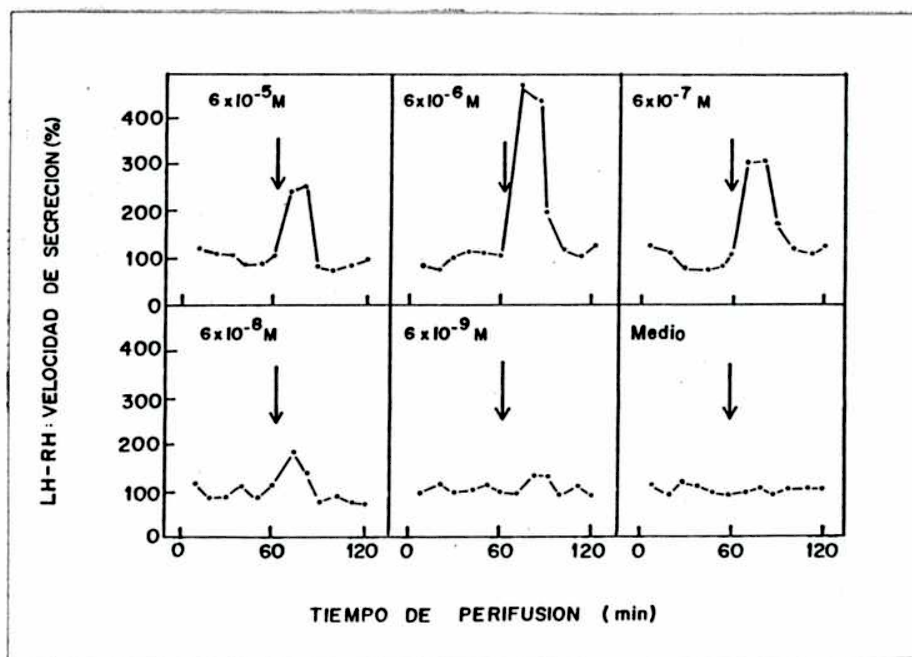
El sistema formado por 5 eminencias medias de ratas hembras en proestro alcanza el estado estacionario para la secreción de LH-RH luego de una hora de incubación (fig 16), con una velocidad basal de 51 ± 8 pg/ml/min.

Fig 16: liberación de LH-RH al medio de perfusión



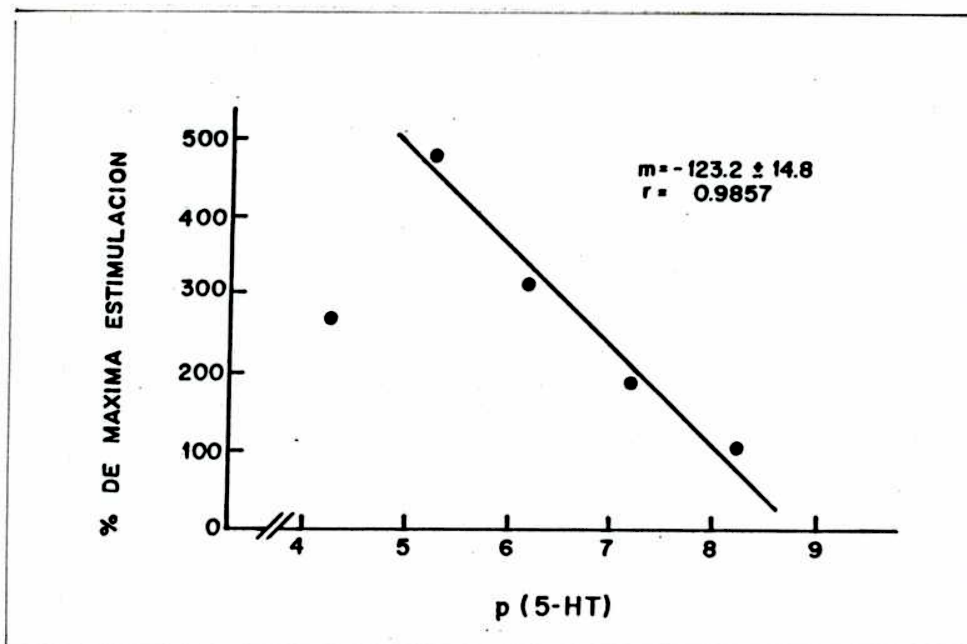
En estas condiciones se examinó la respuesta de las eminencias medias a concentraciones crecientes de serotonina (60; 6,0; 0,6; 0,06 y 0,006 μ M) (fig 17). Todas las concentraciones de 5-HT estimulan la velocidad de liberación de LH-RH. El aumento es inmediato y dura unos 30 min.

Fig 17: efecto de concentraciones decrecientes de 5-HT (flecha) sobre la velocidad de secreción de LH-RH.



La aceleración ocasionada por la serotonina en la velocidad de secreción de LH-RH es dosis dependiente, verificándose una respuesta lineal si se grafica el porcentaje de máxima estimulación versus- $\log(5\text{-HT})$; con la excepción de la concentración de 5-HT más elevada ($6 \times 10^{-5} \text{ M}$), cuyo efecto es inferior al que se logra con la concentración más diluida que le sigue ($6 \times 10^{-6} \text{ M}$) (fig 18, m = pendiente, r = coeficiente de correlación).

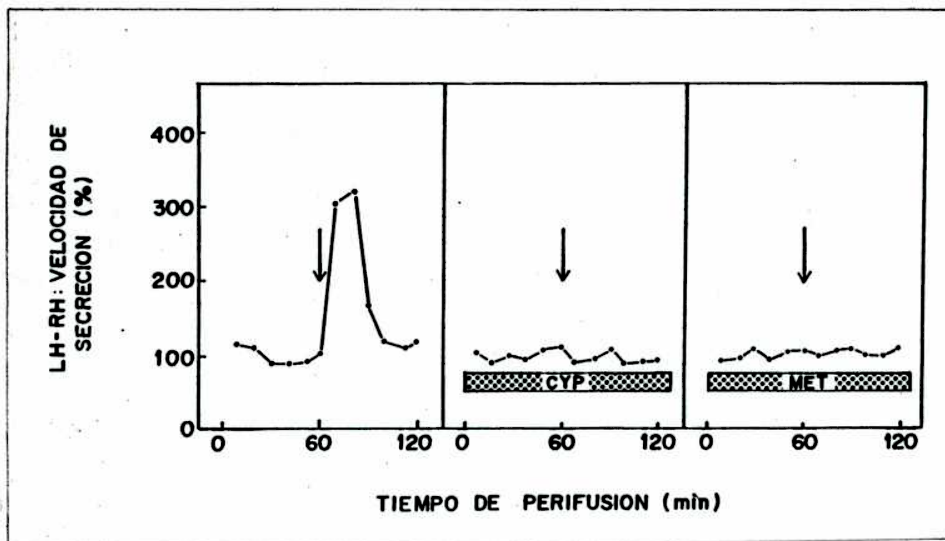
Fig 18: relación lineal entre la concentración de 5-HT (- log) y la respuesta máxima obtenida.



El efecto estimulatorio de la 5-HT se anula si se hallan presentes antagonistas serotoninérgicos como la ciproheptadina (CYP) o el metiotepín (MET) (barra punteada, fig 19).

Ambos antagonistas no tienen efecto sobre la liberación basal de LH-RH.

Fig 19: bloqueo del efecto de la 5-HT ($0,6 \mu\text{M}$) por antagonistas serotoninérgicos (CYP y MET)



5.2. Discusión

Los resultados del capítulo anterior muestran la existencia de una correlación temporal entre la secreción pre-ovulatoria de LH y el aumento de actividad del sistema serotoninérgico de la eminencia media, sugiriendo un papel estimulador del neurotransmisor en este proceso hormonal. No obstante, como hemos señalado oportunamente, estos experimentos no permiten deducir si la serotonina actúa a nivel de la eminencia media estimulando la secreción de LH-RH o si, liberándose a la circulación portal, tiene su sitio efectivo a nivel hipofisario, ya sea actuando "per se", es decir como un factor hipotalámico o, modulando el efecto del LH-RH.

La demostración de tales posibilidades se encaró a través de la realización de experimentos "in vitro". Aun cuando la utilización de estos métodos presuponga la aceptación de muchas aproximaciones, sobre todo cuando se trabaja con fragmentos de tejido nervioso, es una forma rápida y directa de obtener información acerca de la influencia de la serotonina sobre las secreciones de la eminencia media y de la anterohipófisis. Como se ha indicado en Materiales y Métodos (sección 3.2.2.) utilizamos una técnica de incubación dinámica, la perifusión. En esta técnica, gracias a la circulación constante del medio, se evita la

acumulación de las sustancias agregadas y/o de las liberadas, una de las principales fuentes de error de los métodos "in vitro". Otra ventaja de la perifusión respecto de la incubación estática es la posibilidad de detectar cambios transitorios en la secreción hormonal durante la incubación y de evaluar la velocidad de liberación que es un parámetro más dinámico que la concentración. Para trabajar con un sistema muy sensible empleamos tejidos provenientes de ratas hembras en proestro y las tomas de las muestras se realizaron a las 12.00 hs. En este momento del ciclo el sistema LH-RH y las gonadotropas se hallan en óptimas condiciones de sensibilidad para responder a los eventuales efectos de la 5-HT. En este estudio se incluyeron también ratas machos a fin de poder evaluar la existencia de una diferencia en el efecto de la serotonina entre los dos sexos. Las respuestas de los tejidos deben considerarse válidas pues se ha demostrado la perfecta conservación de los mismos luego de prolongadas incubaciones, fundamentalmente en el caso de la eminencia media que tiene terminales nerviosos (Zamora y Ramirez, 1982).

Bajo estas condiciones se realizaron distintas incubaciones con el objeto de explorar el sitio de acción (eminencia media o anterohipófisis) y el efecto (estimulador o inhibitorio) de la serotonina sobre la secreción de

LH, FSH y PRL.

Cuando se agrega 5-HT a un sistema que sólo incluye al lóbulo hipofisario anterior de hembras en proestro, no hay efecto liberador de LH, FSH ni de PRL. Este resultado descarta la posibilidad de que la serotonina extrapituitaria ejerza "per se" una acción sobre la secreción de las gonadotrofinas y prolactina. Se confirma así lo que fue propuesto por otros investigadores utilizando diferentes modelos experimentales (Moskowska, 1965; Birge y col., 1970; Schneider y McCann, 1960; Martin y col., 1977; Ryu y col., 1980).

En cambio, la serotonina induce un aumento en la velocidad de secreción de las gonadotrofinas, sin modificar la de prolactina, cuando se incuban en serie eminencias medias y anterohipófisis. La aceleración que se produce en la liberación de LH es mucho más rápida que la que sufre la secreción de FSH. Un resultado similar se observa "in vivo" al administrar LH-RH (Wise y col., 1979). Inyectada la serotonina en la conexión entre la primera y la segunda camarita no altera la secreción de LH. La 5-HT tampoco modifica la acción del LH-RH sintético. Estos datos en conjunto sugieren que la estimulación producida sobre la liberación de LH y FSH se debe a un efecto del neurotransmisor a nivel de la eminencia media y no a su eventual liberación a la circulación portal para modular la acción de las secreciones hipotalámicas, in

cluido el LH-RH, involucradas en la descarga de LH.

El efecto estimulador desaparece en presencia de ciproheptadina, un antagonista serotoninérgico (Fuller, 1980), lo que implica que receptores específicos para la 5-HT participan en el mecanismo por el cual este neurotransmisor incrementa la secreción de LH y FSH.

La serotonina también aumenta la liberación de LH al medio de perfusión cuando se incuban anterohipófisis y eminencias medias de ratas machos. Sin embargo, la estimulación es significativamente menor que en las hembras. Una posible explicación de esta diferencia es la mayor sensibilidad de la eminencia media y de la anterohipófisis de las hembras en proestro como consecuencia de una mayor exposición a los estrógenos (Sarkar y Fink, 1980). Esta sensibilidad más elevada se ve reflejada en una mayor liberación de LH-RH desde la eminencia media (Palka y col., 1966; Miyake y col., 1982) y en un aumento de la respuesta al LH-RH a nivel hipofisario (Apfelbaum y Taleisnik, 1976; Leblanc y col., 1983). Sin embargo, el fenómeno es más complejo puesto que los estrógenos modulan también el número de receptores serotoninérgicos del hipotálamo (Biegon y McEwen, 1982) que, como hemos demostrado, median el efecto estimulador de la 5-HT. Paralelamente, hay evidencias experimentales de que las hembras son más sensibles que los machos a una elevación de los niveles endóge-

nos de serotonina en el sistema nervioso central (Biegon y col., 1979).

El efecto estimulador de la serotonina a nivel de la eminencia media y, el hecho de que como consecuencia de esta estimulación se observe una respuesta hipofisaria semejante a la que se obtiene cuando se agrega LH-RH al medio, sugieren que la 5-HT estimula la liberación de LH-RH. Para evaluar esta posibilidad se incubaron eminencias medias de ratas en proestro con diferentes concentraciones de serotonina y se midió en el fluido de perifusión la masa de LH-RH liberada.

La serotonina estimula la secreción de LH-RH de una manera proporcional a la concentración de 5-HT, con la excepción de la dosis más alta utilizada ($6 \times 10^{-5} M$) que es menos efectiva que la inmediata inferior. El aumento en la liberación de LH-RH es sumamente rápido lo que sugiere que la acción de la serotonina es directa o que por lo menos involucra pocos pasos intermedios. Repitiéndose lo hallado al incubarse en serie eminencias medias y anterohipófisis, el bloqueo de receptores serotoninérgicos, anula el efecto estimulador de la 5-HT. Aunque los dos antagonistas empleados, ciproheptadina y metiotepín, no son capaces de discriminar de una manera absoluta entre los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂, la ciproheptadina es unas 500 veces más afín al 5-HT₂ y el metiotepín unas 75 veces

(Peroutka y Snyder, 1980). Sugestivamente, los receptores 5-HT₂ han sido postulados como los mediadores de los efectos excitatorios de la serotonina en el sistema nervioso central (Peroutka y Snyder, 1980). Ninguna de los bloqueantes empleados es un antagonista serotoninérgico puro; la ciproheptadina es un antihistamínico y el metiotepín un antagonista α_1 -adrenérgico; sin embargo, dado que carecen de una acción propia sobre la velocidad de secreción de LH-RH y que efectivamente anulan la acción de la serotonina, es factible proponer que el efecto de este neurotransmisor se verifica a través de receptores serotoninérgicos específicos de la eminencia media, posiblemente ubicados sobre los terminales nerviosos de las neuronas LH-RH.

Las discrepancias observadas entre los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, que muestran un efecto estimulador de la 5-HT sobre la secreción de LH-RH y, los de otros investigadores que, o bien no hallaron efecto o lo encontraron inhibitorio, puede deberse a varios factores tales como la elección de las concentraciones de serotonina, la naturaleza y tamaño de las muestras de tejido o la realización de incubaciones estáticas prolongadas.

Con elevadas concentraciones de serotonina se describieron efectos inhibitorios (Moskovska, 1965) o nulos (Schneider y McCann, 1969). En nuestro caso, observamos

que con dosis superiores a 6×10^{-6} M disminuía la eficacia de la estimulación de la secreción de LH-RH.

Ninguno de los trabajos "in vitro" realizados por otros investigadores utilizó ratas hembras para la disección de los tejidos. Como hemos señalado, las zonas del sistema nervioso central que participan en los mecanismos que regulan la secreción de las gonadotropinas, así como la hipófisis, presentan un máximo de sensibilidad durante el proestro, con lo cual el sistema se optimiza si se realizan los experimentos en ese momento del ciclo estral.

El diferente tamaño de las muestras tiene considerable importancia. En principio en muestras muy grandes la difusión suele ser escasa, impidiéndose el acceso de las sustancias, cuyo efecto se estudia, a las estructuras blanco. Por otra parte, muchas veces se escogieron muestras de tejido que incluían, además de la eminencia media, estructuras vecinas, como el núcleo arcuato y ventromediano (Charli y col., 1978; Kao y Weizs, 1977) o zonas más alejadas llegando a veces hasta el área preóptica (Roskowska, 1965, Schneider y McCann, 1969). Se ha demostrado que fragmentos hipotalámicos que contienen a la eminencia media presentan menor capacidad de liberación de LH-RH que la misma eminencia media (Sherwood y col., 1976; Negro-Vilar y col., 1979), posiblemente debido a la presencia de neuronas que inhiben tóni-

camente la liberación de LH-RH (Callo y Osland, 1976). Además si se utilizan muestras que incluyen áreas hipotalámicas rostrales se ofrece la posibilidad de estimular los cuerpos de las neuronas que sintetizan LH-RH perdiéndose la oportunidad de disociar síntesis, transporte y liberación.

La realización de incubaciones estáticas muy prolongadas y sin tomar precauciones para evitar la oxidación de la serotonina o la degradación de péptidos y proteínas y, el nulo o escaso período de preincubación al que se someten los tejidos que no permite la estabilización de la velocidad de secreción, fundamentalmente cuando se incuban hipófisis, también son causas que bien pueden invalidar los resultados obtenidos en estos experimentos.

Teniendo en cuenta todas las consideraciones señaladas nuestros estudios "in vitro" demuestran que la serotonina estimula la liberación de las gonadotrofinas, tanto en ratas hembras en proestro como en machos, a través de un aumento de la secreción de LH-RH. La acción de la serotonina a este nivel involucra la estimulación de receptores serotoninérgicos específicos ubicados en los terminales nerviosos de la eminencia media. Queda descartada la posibilidad de que la serotonina presente en la eminencia media se libere a la circulación portal para modular el efecto del

LH-RH en la hipófisis o para actuar ella misma sobre la secreción de las gonadotrofinas independientemente del LH-RH.

Confirmando lo sugerido por los experimentos de medición de la actividad del sistema serotoninérgico durante el ciclo estral, la serotonina no modifica la secreción de prolactina actuando a nivel de la eminencia media ni a nivel de las células lactotropas hipofisarias.

LESION DEL NUCLEO DORSAL DEL RAPE. SUS CONSECUENCIAS SOBRE EL CICLO ESTRAL Y LA SECRECION DE LAS GONADOTROFINAS Y PRO-LACTINA

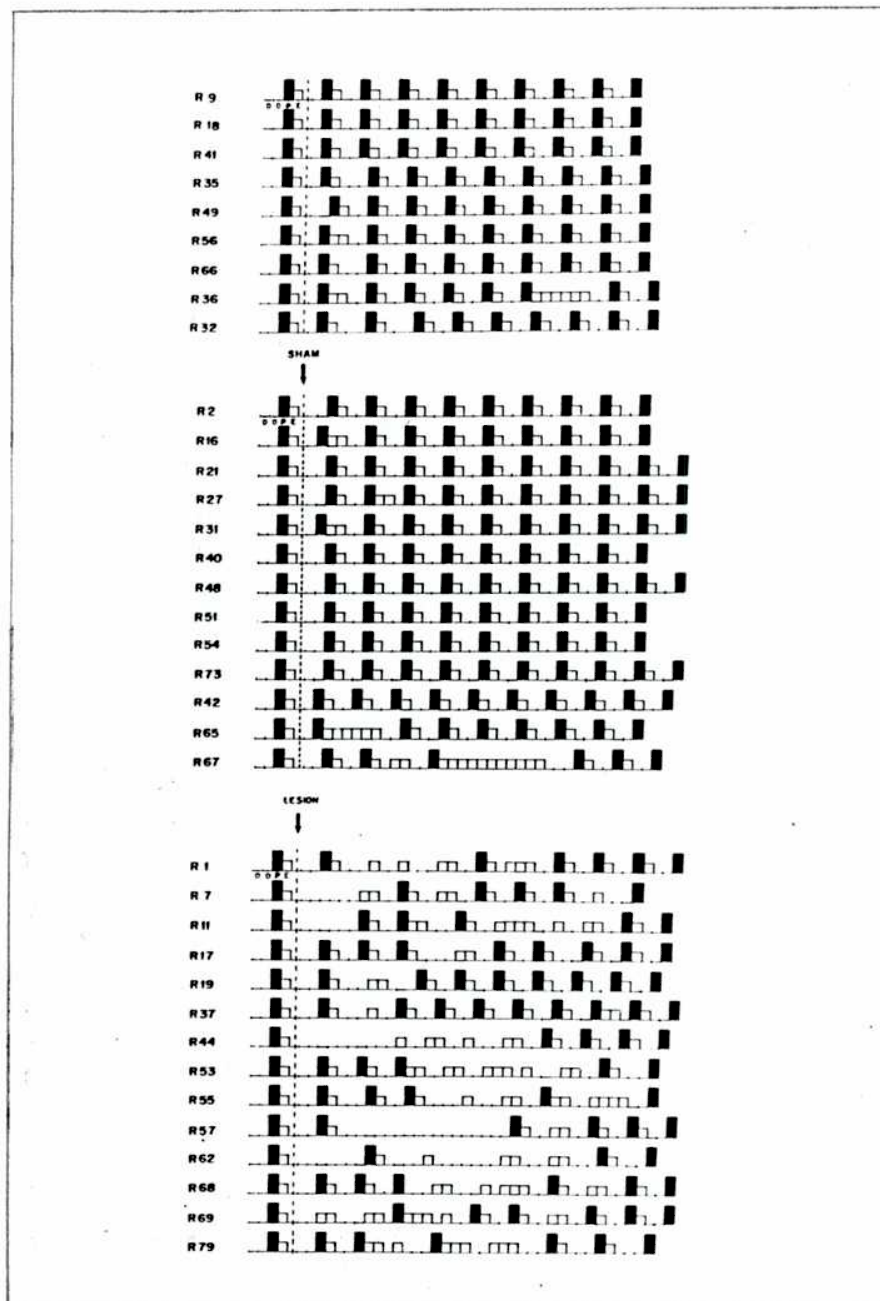
6.1. Resultados

Con el fin de determinar la participación de la inervación serotoninérgica ascendente en la regulación del ciclo estral y en el control de la secreción preovulatoria de las gonadotrofinas y prolactina se procedió a lesionar el área rostral y media del núcleo dorsal del rafe (DR) durante el primer día de diestro en ratas adultas con ciclos de 4 días de duración. Como parámetros para estimar la ingerencia del DR en estos mecanismos regulatorios, luego de la lesión, se continuó con el registro de los estadios del ciclo vaginal, se estudió la descarga preovulatoria de LH, FSH y PRL y se determinó la concentración de 5-HT en la eminencia media en horas claves del proestro.

Ciclo vaginal: la lesión del DR causa una desorganización progresiva pero transitoria, en la sucesión periódica de los estadios del ciclo vaginal. En la figura 20 se ilustra este efecto. Como puede observarse, los animales con operación simulada mantienen la periodicidad de los ciclos, mientras que. en los lesionados, es evidente la alteración que se produce. Esta alteración consiste en la pérdida de la secuencia cíclica con la que se suceden los estadios,

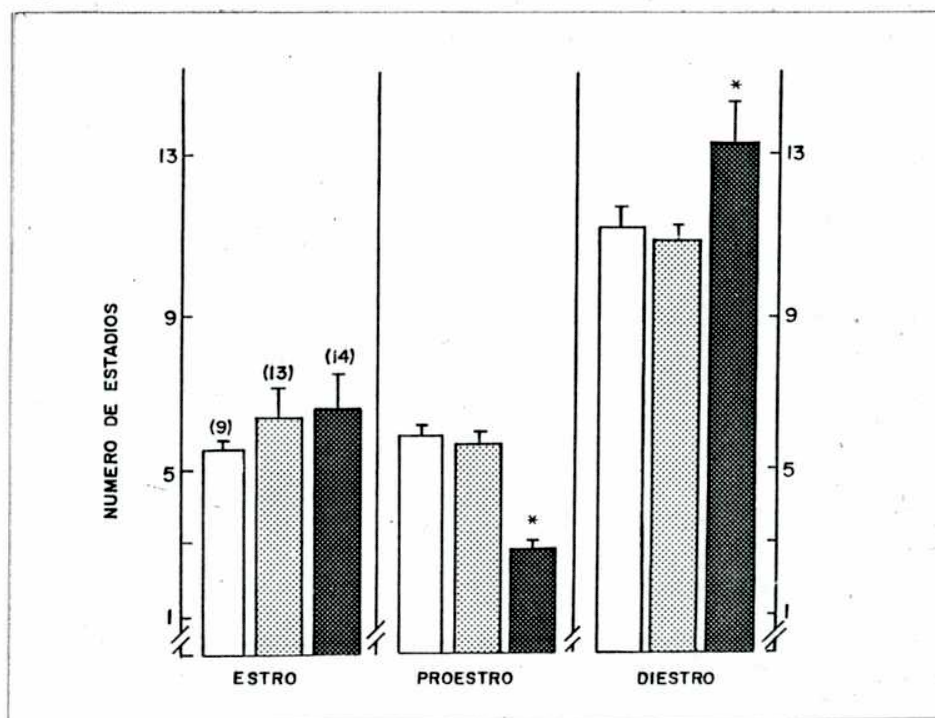
hay prolongados períodos de extendidos vaginales leucocitaríos (diestros) pero, no se encontraron períodos de estro persistente.

Fig 20: Estadios del ciclo vaginal en animales con lesión del DR (panel inferior) ↔ diestro, ■ proestro □, estro.



Los animales mal lesionados (lesión por encima o por detrás de la región media y rostral del DR) no presentan modificaciones en la periodicidad de los estadios. Luego de 30 días de sobrevida el 60% de los animales lesionados ha normalizado sus ciclos. Si se realiza una evaluación de la frecuencia de aparición de cada uno de los estadios sobre un número fijo de días (24 días = 6 ciclos), es posible observar en los lesionados una disminución significativa del número de proestros (* $p < 0,01$) y un aumento concomitante de diestros (fig 21). Los animales con operación simulada presentan las mismas frecuencias en los tres estadios que los controles.

Fig 21: Frecuencia de aparición de los estadios del ciclo en los grupos: control \square , sham \square y lesión \blacksquare
* $p < 0,01$



Peso de hipófisis, ovarios y úteros: se pesaron estos órganos en los animales lesionados (35-40 días de sobrevivida), en los sham (mismas condiciones) y en los controles todos ellos sacrificados a las 14.00 hs del proestro (tabla VI). No se hallaron diferencias en el peso de estos tejidos en ninguno de los tres grupos experimentales.

Tabla VI: Peso de hipófisis, ovario y útero en los controles, sham y lesionados sacrificados a las 14.00 hs del proestro (35-40 días)

	control (9)	sham (13)	lesionados (14)
hipófisis ($\mu\text{g/g}$)	56 \pm 2	53 \pm 1	53 \pm 1
ovario ($\mu\text{g/g}$)	301 \pm 23	307 \pm 28	321 \pm 16
útero (mg/g)	2,97 \pm 0,13	4,22 \pm 0,53	3,27 \pm 1,22

Los pesos de los tejidos están referidos al peso corporal de los animales; el número de animales observados se indica entre paréntesis.

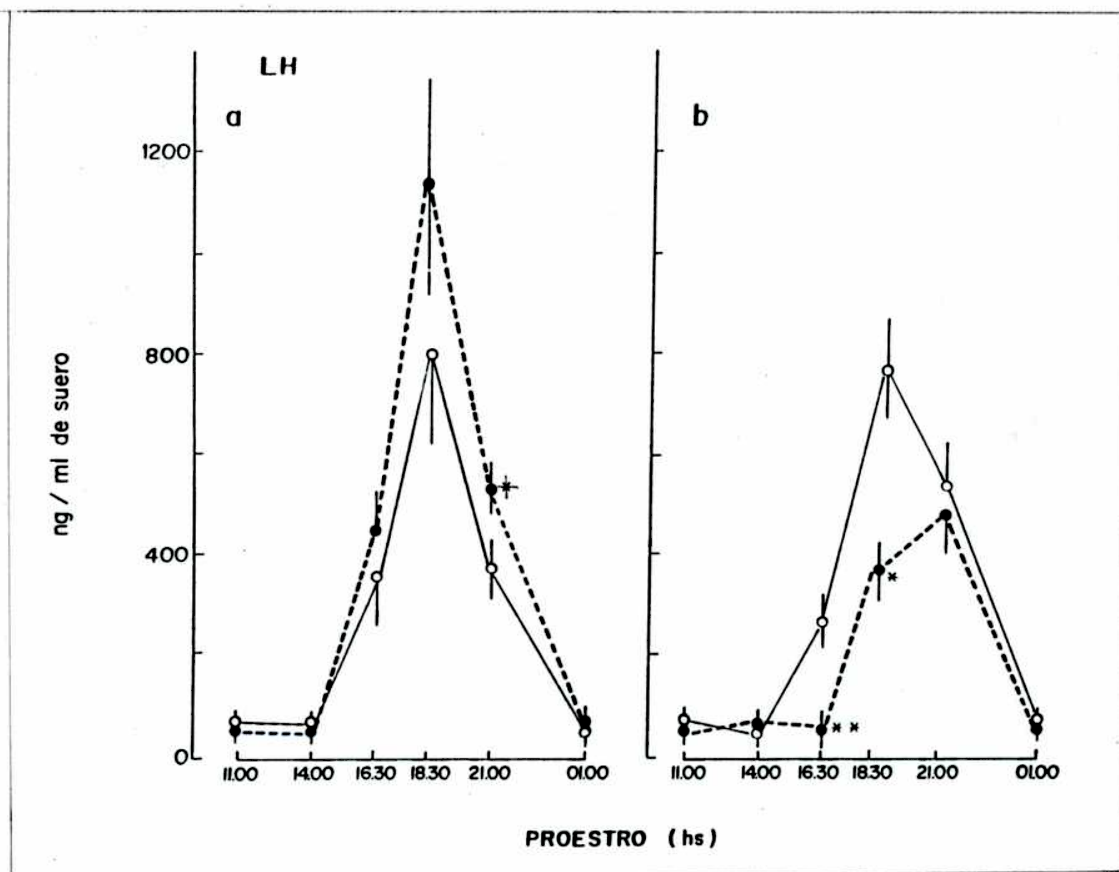
Descargas hormonales

Hormona luteinizante: durante el día de proestro la secreción de LH en los animales controles y en los sham se produce según las siguientes características: la descarga comienza alrededor de las 16.30 hs y alcanza su máximo a las 18.30 hs; a partir de ese momento los niveles séricos comienzan a descender, a las 01.00 hs ya se ha recuperado la concentración basal (fig 22 a y b, línea continua).

En los animales lesionados, la descarga de LH que ocurre en el proestro inmediatamente posterior a la lesión (fig 22 a, línea discontinua) es de mayor magnitud que la de los controles y sham; sin embargo, posiblemente debido a la gran dispersión de los datos individuales, sólo se alcanza una diferencia significativa a las 21.00 hs (+ $p < 0,05$ vs 21.00 hs sham).

En la situación experimental crónica, es decir luego de 35-40 días de sobrevida, la secreción preovulatoria de LH (fig 22 b, línea discontinua) sufre dos tipos de alteraciones. En primer lugar, hay un retraso en la hora de comienzo de la descarga: en estos animales la secreción se inicia entre las 16.30 y las 18.30 hs; en segundo lugar, disminuye la magnitud de la secreción. Como consecuencia de ambas modificaciones el pico de máxima concentración se alcanza a las 21.00 hs en vez de las 18.30 hs y es significativamente menor que el de los animales controles ($p < 0,05$ lesión 21.00 hs vs control 18.30 hs).

Fig 22. Descarga preovulatoria de LH en animales controles y sham (líneas continuas) y lesionados (líneas discontinuas). a) lesión aguda del DR, b) lesión crónica del DR.



El número de animales observados en cada punto oscila entre 14 y 9.

+ $p < 0,05$

* $p < 0,01$

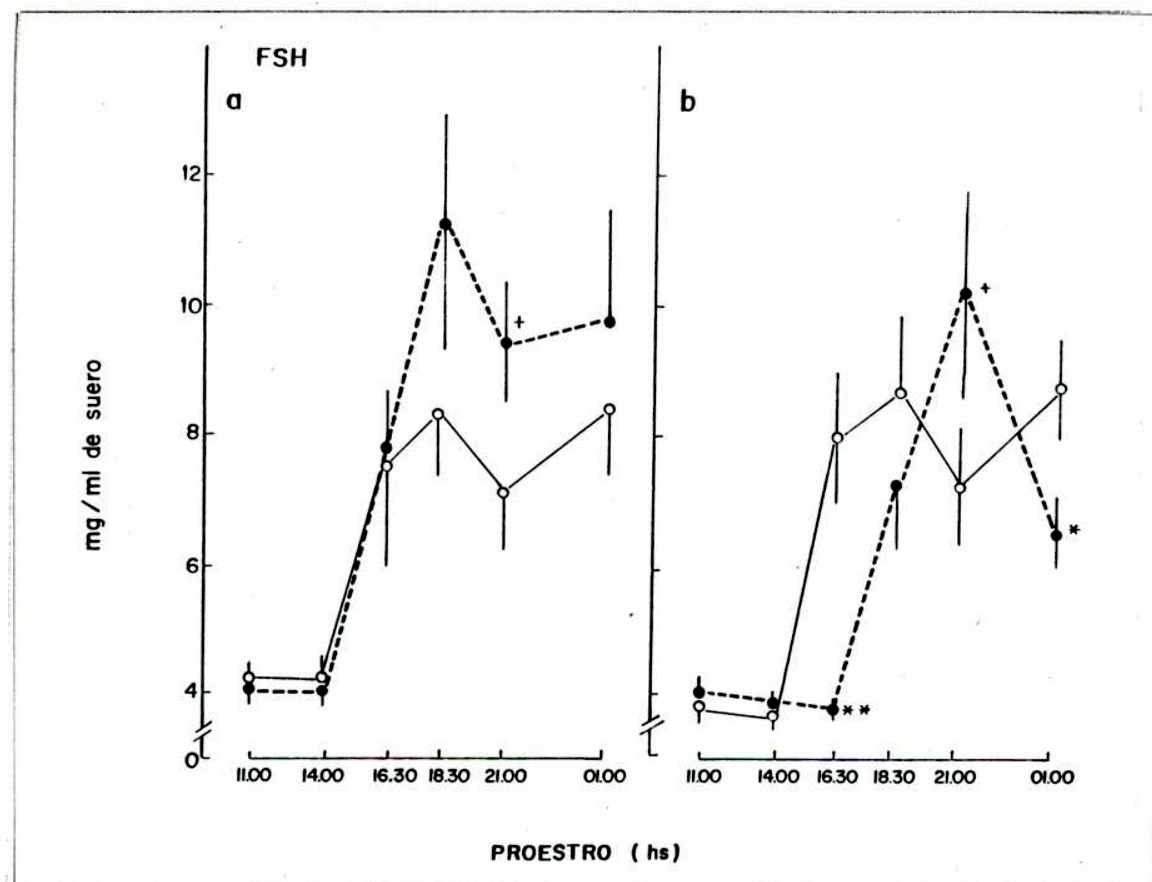
** $p < 0,005$

Hormona folículo-estimulante: la descripción del perfil de secreción de FSH, en las ratas controles y sham (fig 23, líneas continuas) muestra que el comienzo de la descarga preovulatoria se produce alrededor de las 16.30 hs; después los niveles hormonales se mantienen elevados, aunque fluctuantes, durante las 5 horas siguientes.

En los animales lesionados la descarga de FSH que ocurre durante el primer proestro post-lesión (fig 23 a, línea discontinua) es de mayor magnitud que la observada en controles y sham, aun cuando, al igual que en el caso de LH, sólo se alcanza una diferencia significativa a las 21.00 hs ($+p < 0.05$ vs sham 21.00 hs).

El efecto crónico de la lesión del DR sobre la secreción preovulatoria de FSH (fig 23 b, línea discontinua) es doble y similar al observado para LH. Se produce una postergación del comienzo de la descarga de la hormona, que ocurre, entonces, entre las 16.30 y las 18.30 hs (** $p < 0,005$ lesión 16.30 hs vs control 16.30 hs). La alteración de la magnitud de la descarga no es tan evidente como en el caso de LH. La secreción de FSH en los animales con lesión crónica del DR sería también fluctuante como en los controles y sham.

Fig 23. Descarga preovulatoria de FSH en animales controles y sham (líneas continuas) y lesionados (líneas discontinuas). a) lesión aguda del DR, b) lesión crónica del DR.



El número de animales observados en cada punto oscila entre 14 y 9.

+ $p < 0,05$

* $p < 0,01$

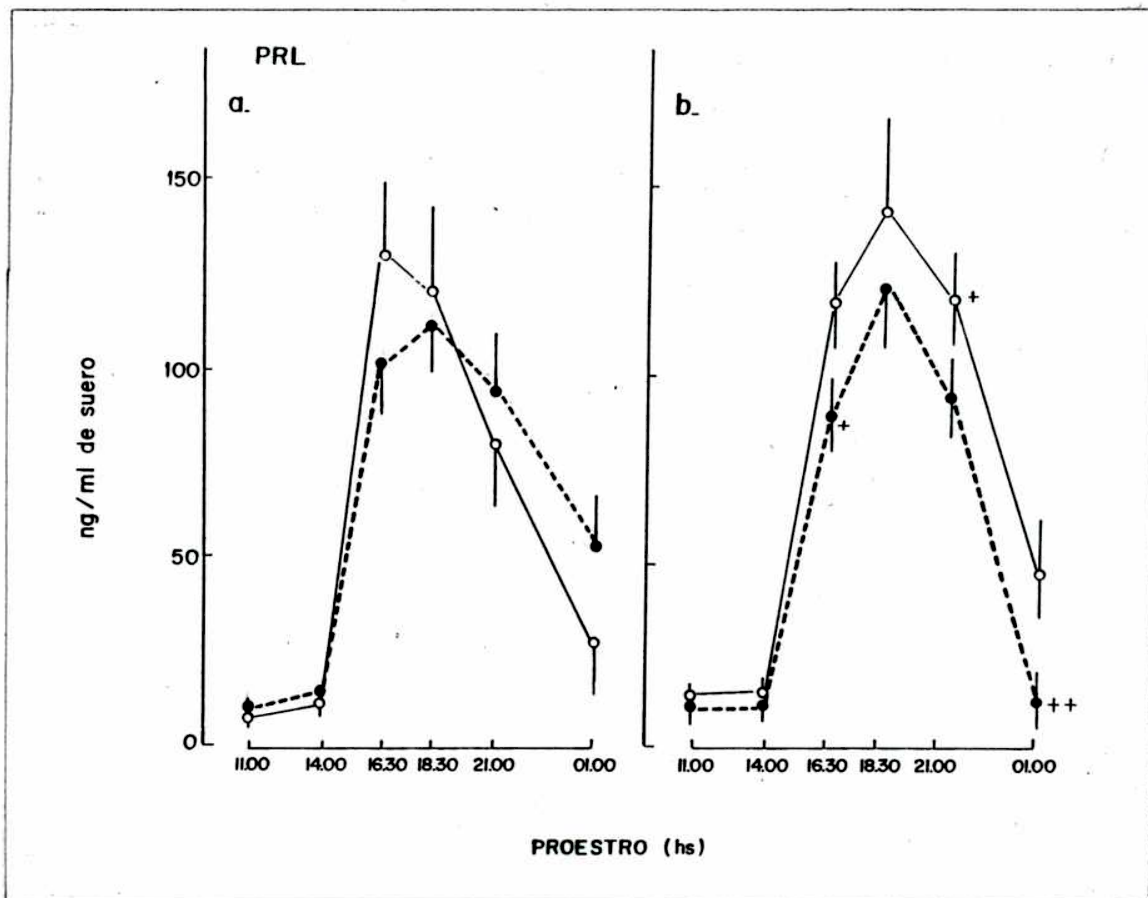
** $p < 0,005$

Prolactina: en los animales controles y con operación si mulada el comienzo de la secreción preovulatoria de PRL tiene lugar entre las 14.00 y 16.30 hs; posteriormente, la concentración de la hormona se mantiene elevada por unas 2-3 ho ras, para luego disminuir lentamente; a las 01.00 hs del es tro los niveles séricos de PRL son aún superiores a los ba sales (fig 24 a y b, líneas continuas).

Durante el primer proestro post-lesión (fig 24 a, línea discontinua) la descarga de prolactina se desarrolla de ma- nera similar a la de los sham, aunque parecería ser más pro longada; pero no se alcanza una diferencia significativa a las 01.00 hs.

A diferencia de lo que sucede con las gonadotrofinas, la lesión crónica del DR no afecta la hora de comienzo de la secreción preovulatoria de prolactina (fig 24 b, línea discontinua) aunque sí modifica la magnitud de la misma: la descarga que se observa en los animales lesionados es menor que la que se produce en los controles (* $p < 0,01$ 16.30 hs lesión vs control y 21.00 hs lesión vs control). A su vez, la duración de la secreción es menor en los le- sionados pues, como puede observarse en la figura corres- pondiente, la concentración de PRL a las 01.00 hs en los animales con lesión crónica del DR es significativamente inferior a la de los controles (++) $p < 0,02$).

Fig 24: Descarga preovulatoria de PRL en animales controles y sham (líneas continuas) y lesionados (líneas discontinuas). a) lesión aguda del DR, b) lesión crónica del DR.



El número de animales observados en cada punto oscila entre 14 y 9.

+ $p < 0,05$

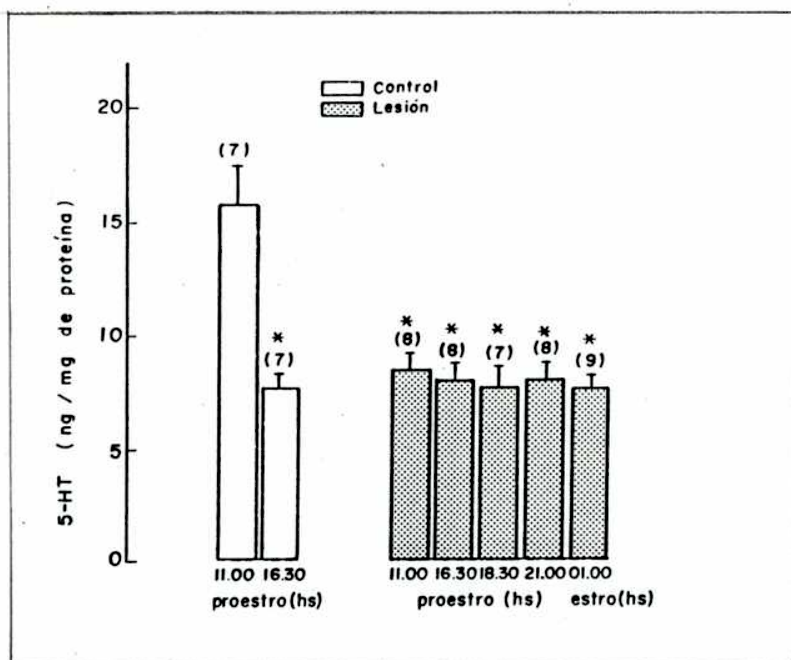
++ $p < 0,02$

* $p < 0,01$

5-HT de la eminencia media: la concentración de 5-HT en la eminencia media de los animales controles y sham sufre una caída a las 16.30 hs del proestro (fig 25, control). La lesión "aguda" (48-72 horas de sobrevida) y la crónica (35-40 días de sobrevida) del DR disminuyen en un 50% la concentración de 5-HT de la eminencia media (* $p < 0,01$; lesión 11.00 hs vs control 11.00 hs) y anula cualquier modificación ulterior de 5-HT durante el proestro (fig 25, lesionados).

Fig 25: Concentración de 5-HT en la eminencia media de animales controles y con lesión crónica del DR

* $p < 0,01$



6.2. Discusión

Una considerable proporción de la inervación serotoninérgica ascendente se origina en los núcleos mesencefálicos del rafe (Andén y col., 1965; Ungerstedt, 1971). Entre estos núcleos, el dorsal (DR) y el mediano (MR), constituyen las principales aferencias al área preóptica y al hipotálamo (Palkovits y col., 1977). Según datos experimentales recientes la distribución de estas proyecciones sería diferencial, es decir, que mientras ciertas zonas son inervadas en forma preferencial por uno de los dos núcleos, otras reciben casi la misma proporción de fibras provenientes de ambos núcleos. Así, el MR proyectaría principalmente al área preóptica, al área hipotálamica anterior y a las zonas anterior y posterior del hipotálamo lateral, en tanto el DR lo haría hacia el área preóptica media y el hipotálamo medio basal (van de Kar y col., 1980).

Trabajos pioneros en neuroendocrinología sugieren una vinculación del DR y del MR con los mecanismos nerviosos que desencadenan la ovulación (Carrer y Taleisnik, 1970; 1971). En efecto, el DR sería un engranaje importante de estos mecanismos, aún cuando los resultados experimentales acerca de su función son todavía inconcluyentes: a este núcleo se le han adjudicado tanto efectos inhibitorios (Arendash y Gallo, 1978; Waloch y col., 1981) como una acción estimuladora o permisiva (Meyer, 1978; Héry y col., 1978; Wuttke y col., 1977; van de

Kar y col., 1980). El núcleo mediano del rafe tendría una menor ingerencia que el dorsal en el control de la secreción de LH (Barofsky, 1975; 1979).

Los experimentos que hemos descrito en el presente capítulo muestran claramente la participación del núcleo dorsal del rafe en los mecanismos nerviosos encargados de la organización del ciclo estral; específicamente, nuestros resultados destacan el papel que desempeña el DR en los procesos que determinan el "timing" y la magnitud de la descarga preovulatoria de las gonadotrofinas y la magnitud de la secreción de prolactina. En relación a las gonadotrofinas, nuestros datos sugieren la probable mediación de fibras serotoninérgicas que proyectan desde los tercios rostral y medio del DR hacia la eminencia media.

Hemos visto que la lesión del DR ocasiona la pérdida del orden en la sucesión de los estadios del ciclo vaginal. Esta alteración, que permanece por un lapso variable, desde 10 a 40 días de sobrevida, está caracterizada por la aparición de períodos de diestro interrumpidos por estros y proestros. La presencia de estos últimos estadios es señal de que los animales han ovulado, si bien es evidente de que lo habrían hecho en forma esporádica y errática. Luego de 45 días de sobrevida, los ciclos se han normalizado prácticamente en todos los animales.

La falta de orden en el ciclo vaginal y en el ciclo ovárico podría ser consecuencia de una alteración en la descarga cíclica de las hormonas hipofisarias. Justamente, según lo descrito en la sección de resultados, la lesión del DR altera las descargas preovulatorias de LH, FSH y PRL.

El efecto temprano de la lesión (48-72 hs de sobrevida) consiste en un ligero aumento en la secreción de las gonadotrofinas durante el proestro, mientras que el crónico produce una disminución de esa misma secreción. Otra interesante consecuencia que tiene la lesión del DR sobre la liberación de las gonadotrofinas, es el corrimiento en el tiempo que sufre la descarga de ambas hormonas. Puesto que este desplazamiento sólo se manifiesta en los crónicos, se puede especular que luego de 35-40 días de sobrevida el sistema encargado de determinar la descarga tiende a reparar el daño que se le ha ocasionado. En este sentido, la ausencia de cambios en el peso de la hipófisis, ovario y útero de los animales lesionados respecto de los controles y sham, apoya la hipótesis. Sin embargo, el nuevo estado estacionario al cual se llega, no es exactamente igual al inicial en cuanto al patrón de secreción hormonal.

En el primer capítulo de resultados hemos mostrado que la actividad del sistema serotoninérgico de la eminencia media aumenta cuando comienza la descarga preovulatoria de las

gonadotrofinas, siendo una de las características de esta mayor actividad, el descenso de la concentración de la 5-HT. Por otra parte, está descrito en la bibliografía, que la lesión del DR afecta en un 60% la cantidad de 5-HT en la eminencia media (Villar y col., 1984). En este capítulo podemos señalar tres aspectos importantes referidos a la relación 5-HT de la eminencia media-dorsal del rafe-ciclo estral. En primer lugar, hay una estrecha similitud, entre machos y hembras, respecto de la cantidad de 5-HT que desaparece en la eminencia media por efecto de la lesión. A su vez, la lesión del DR en las hembras, determina la pérdida de la 5-HT que fluctúa durante el proestro. Continuando con este razonamiento, si comparamos la magnitud de la "depleción preovulatoria" de la 5-HT de la eminencia media con la caída de la misma, ocasionada por la lesión del DR, vemos que son prácticamente iguales en magnitud. Por tanto, teniendo en cuenta todos estos argumentos, podemos considerar que la fracción de 5-HT en la eminencia media cuya actividad se incrementa durante el proestro depende totalmente de la integridad del DR. Asimismo, nuestros resultados sugieren que esa fracción estaría ubicada en terminales serotoninérgicos que proyectan desde las áreas lesionadas del DR hacia la eminencia media.

Según esta interpretación, es posible explicar el efecto "agudo" de la lesión considerándolo como el resultado de la

liberación de 5-HT a nivel de la eminencia media causada por la lesión electrofónica del núcleo y por la degeneración posterior de los terminales dañados. De la misma manera, la disminución de la descarga de las gonadotropinas en los animales con lesión crónica puede considerarse consecuencia de la ausencia de la 5-HT; esta ausencia sería también responsable del nuevo "horario" con que se producen las descargas de LH y FSH.

Estos datos completan lo enunciado en otros capítulos acerca del papel estimulador de la 5-HT en la eminencia media. Aquí es importante destacar que esta estructura constituye el sitio donde convergen los terminales de las neuronas LH-RH que participan en la descarga de LH y FSH del proestro; habiéndose propuesto a la eminencia media como un sitio donde operan mecanismos neuroquímicos regulatorios a nivel de los terminales peptidérgicos (Negro-Vilar, 1982). Por tanto, es posible inferir a partir de nuestros resultados que la lesión del DR ha eliminado neuronas que proyectaban a la eminencia media y que constituían una vía que regulaba la descarga preovulatoria de LH-RH.

Sin embargo, no podemos descartar totalmente la contribución de otras áreas hipotalámicas relacionadas con el control de la descarga de gonadotropinas y que reciben inervación serotoninérgica originada en el DR. En este sentido, el núcleo supraquiasmático (SQ), conocido por su relación con la generación

de ritmos biológicos (Stephan y Zucker, 1972; Mosko y Moore, 1979) y por su participación en la regulación de la descarga de LH (Barraclough y col., 1964; Coen y MacKinnon, 1980b; Wiegand y Terasawa, 1982), presenta interesantes características: tiene una elevada concentración de 5-HT originada en el DR y MR (Azmitia y Segal, 1978) y esta 5-HT estaría involucrada en el control de la secreción de LH (Küng y col., 1976; Meyer y Quay, 1978; Héry y col., 1982). En consecuencia, la alteración en el "timing" y magnitud de la descarga preovulatoria de las gonadotropinas podría deberse a la falta de inervación serotoninérgica en el SQ. Aunque no tenemos evidencias, tanto como para apoyar como para descartar esta posibilidad, hay datos bibliográficos que indican que la lesión del MR, que afecta la inervación del SQ mucho más de lo que lo hace la lesión del DR, no modifica la secreción de LH y lo que es todavía más importante, la desnervación serotoninérgica exclusiva del SQ tampoco altera la descarga de la hormona en ratas machos (van de Kar y col., 1980).

Otra estructura relacionada con la generación de ritmos hormonales y que tiene un elevado contenido de 5-HT es la glándula pineal (Niles, 1979; Reiter, 1980). La pinealectomía, sin embargo, origina diferentes alteraciones en el ciclo estral; Alleva y colaboradores (1970) y Blake (1976) no encontraron cambios en la periodicidad de los estadios, ni en la secreción de LH, FSH, y PRL, ni en la hora de ovulación; Walker y

su grupo (1982), en cambio, observaron que este procedimiento quirúrgico determinaba la aparición en algunos animales (5 sobre 14) de períodos de estro persistente y una desincronización en la hora de comienzo de la descarga preovulatoria de LH. La hormona de la pineal, la melatonina, bloquea la secreción fásica de LH y la ovulación (Chu y col., 1964; Collu y col., 1971; Ying y Greep, 1973; Clemens y col., 1980). Incluso, parecería estar relacionada con la terminación del pico preovulatorio de LH (Walker y col., 1982).

Casi toda la serotonina que se utiliza en la glándula pineal como precursor de la melatonina, se sintetiza "in situ" a partir del triptofano circulante. En la rata no existen evidencias de inervación serotoninérgica central a la glándula pineal, a pesar de la cercanía de los núcleos del rafe. Este hecho, junto con el diferente efecto que produce la pinealectomía o la administración de melatonina, respecto del que causa la lesión del DR, sugieren que la participación de este núcleo en la regulación de la secreción de las gonadotrofinas es independiente de la glándula pineal.

En conclusión, el efecto del DR sobre la descarga preovulatoria de LH y FSH estaría mediado por fibras serotoninérgicas ubicadas a nivel de los terminales de las neuronas LH-RH en la eminencia media.

Muchas evidencias experimentales avalan la existencia de un papel para la 5-HT originada en el DR en la regulación de la secreción de PRL (Mulloy y Moberg, 1975; Advis y col., 1978; van de Kar y Bethea, 1982; Barofsky y col., 1983). En estos trabajos puede observarse que la lesión del núcleo causa una disminución de la liberación de PRL en varios modelos experimentales y fisiológicos; sin embargo, hay escasas referencias acerca del efecto de la lesión del DR sobre la secreción preovulatoria de PRL.

Nuestros experimentos, realizados durante el ciclo estral, muestran que la lesión del núcleo modifica la magnitud del pico preovulatorio de PRL sin que sea evidente una alteración del "timing" de la descarga. Estos resultados coinciden con lo expuesto por otros investigadores e indican que, independientemente de la similitud o diferencia que pueda existir entre los mecanismos que desencadenan la secreción de PRL en diferentes situaciones experimentales y fisiológicas, el DR tendría un papel permisivo, regulando el nivel de la descarga. Por otra parte, nuestros datos también sugieren que el DR no forma parte de los procesos nerviosos que regulan el "timing" de la secreción de PRL durante el proestro.

Las fibras serotoninérgicas involucradas con la descarga de prolactina no serían las que inervan la eminencia media, ya que la 5-HT de esta estructura no estaría relacionada con

la secreción de PRL (ver los dos capítulos anteriores). Posiblemente otras áreas, hipotalámicas o no, relacionadas con la secreción de prolactina y que reciben inervación serotoninérgica originada en el DR, integren los mecanismos que controlan la magnitud de la descarga preovulatoria de esta hormona.

Hasta aquí hemos atribuido el efecto de la lesión del dorsal del rafe a la 5-HT, teniendo en consideración que este núcleo es eminentemente serotoninérgico. Sin embargo, existen muchas evidencias de la presencia de otros neurotransmisores (Battenberg y Bloom, 1975; Orchi y Shimizu, 1978; Glazer y col., 1981; Steinbusch, 1982) y de una conexión hipotalámica-DR (Sawchenko y col., 1983). La lesión, por tanto, ha eliminado seguramente parte de esta inervación "no serotoninérgica". No obstante, la contribución de estas proyecciones a la regulación de la secreción hormonal preovulatoria, si bien no hay que dejarla de lado, es difícil de evaluar pues aún se desconoce que neurotransmisores involucra.

Teniendo en cuenta lo expuesto en este capítulo, hemos logrado evidencias de la participación del núcleo dorsal del rafe en el control del ciclo estral. El DR interviene en los mecanismos que regulan el "timing" y la magnitud de la secreción preovulatoria de LH y FSH, posiblemente, a través de una proyección serotoninérgica que inerva la eminencia media. Nuestros

datos también confirman el papel estimulador del DR sobre la descarga de las gonadotropinas y prolactina.

7. CONCLUSION

La regulación de la secreción preovulatoria de LH es el resultado de la integración coordinada de numerosas informaciones que llegan al sistema nervioso central a través de estímulos externos (luz, temperatura, olores, sonidos) e internos (hormonas) y culmina con la liberación de LH-RH desde la eminencia media hacia la hipófisis. Varios sistemas de neurotransmisores controlan la actividad de las neuronas LH-RH lo que da lugar a un complejo mecanismo regulatorio. La posibilidad de que la 5-HT integre estos mecanismos surgió como consecuencia de las modificaciones en la secreción de LH producidas por las manipulaciones quirúrgicas (Héry y col., 1978; Meyer, 1978) y farmacológicas (Labhsetwar, 1971; Kordon, 1971; Héry y col., 1975 b; Coen y col., 1980; Walker y col., 1980; Horn y Fink, 1985) del sistema serotoninérgico. Sin embargo, a pesar de los datos que brindan estos estudios, aún no hay precisión acerca de cuáles son los circuitos serotoninérgicos involucrados, cuál es o son los sitios efectores ni cuál es la acción de la 5-HT sobre la secreción preovulatoria de LH. Hay que tener en cuenta, no obstante, que la mayoría de estos experimentos se llevaron a cabo en modelos cuya semejanza al fenómeno fisiológico, la descarga preovulatoria de LH, es relativa.

La información obtenida durante el desarrollo de esta Tesis

nos permite postular a la serotonina como uno de los neurotransmisores involucrados en la regulación de la liberación de la hormona luteinizante durante el proestro.

Realizando una recopilación de los datos obtenidos, hemos demostrado que la secreción preovulatoria de las gonadotrofinas está acompañada de un aumento de la actividad del sistema serotoninérgico de la eminencia media; que la 5-HT incrementa la liberación "in vitro" de LH y FSH y, que esta acción se origina como consecuencia de una estimulación de la secreción de LH-RH y no como resultado de un efecto liberador a nivel hipofisario o de una acción moduladora sobre el LH-RH, además, la lesión de los tercios rostral y medio del núcleo dorsal del rafe afecta el "timing" y la magnitud de la descarga preovulatoria de las gonadotrofinas y anula la variación del contenido de 5-HT en la eminencia media que se produce en la tarde del proestro.

A partir de estos datos experimentales es posible desarrollar la siguiente conclusión: "terminales serotoninérgicos de la eminencia media, originados en la zona anterior y media del DR, aumentan su actividad durante el período crítico del ciclo para modular la secreción preovulatoria de LH y FSH".

Considerando los resultados obtenidos luego de la lesión de las neuronas serotoninérgicas que proyectan hacia la eminencia media, surge como una de las funciones de la serotonina, la de mantener un adecuado nivel de descarga de LH y FSH

y un patrón temporal de secreción para ambas hormonas. Es posible que estas actividades se verifiquen a nivel de los terminales de las neuronas LH-RH y que sean mediadas por receptores serotoninérgicos específicos de la eminencia media, según lo observado en los experimentos "in vitro".

Por su puesto, no podemos descartar la influencia que pudieran tener otras áreas, también inervadas por el DR y que están relacionadas con la regulación de la secreción de LH, tal es el caso del área preóptica y del núcleo supraquiasmático (Mosko y Moore, 1979). No obstante, la desnervación serotoninérgica de estas zonas no modifica la secreción de LH en ratas machos (van de Kar y col., 1980).

La desorganización de los ciclos hormonal, ovárico y vaginal y, la "normalización de los mismos luego de aproximadamente un mes post-lesión son compatibles con la puesta en funcionamiento de mecanismos compensatorios tendientes a superar los efectos causados por la lesión. Este hecho pone de manifiesto que la regulación de la secreción preovulatoria de LH depende de más de un sistema de neurotransmisores.

Es claro que la glándula pituitaria, siendo el órgano que sintetiza y secreta LH, sea tenida en cuenta como otro posible sitio donde operan mecanismos serotoninérgicos que regulan la secreción de LH durante el proestro. Al respecto, existe bibliografía que señala la captación específica de 5-HT por células

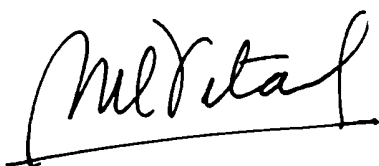
hipofisarias, tal vez gonadotropas (Núñez y col., 1980; Johns y col., 1982; Payette y col., 1985). Sin embargo, nuestros resultados permiten desechar esta hipótesis. En efecto, por un lado, la 5-HT que se libera en la eminencia media no actúa a nivel hipofisario "per se" ni modula la acción del LH-RH; por otro lado, la 5-HT intrahipofisaria, cuyo origen aún se discute, tampoco está relacionada con la secreción de las gonadotrofinas. Teniendo en cuenta estos datos experimentales, es factible descartar a la hipófisis como uno de los sitios efectores de la 5-HT en los procesos que llevan a la secreción preovulatoria de LH y FSH.

El sistema serotoninérgico ejerce un efecto estimulatorio sobre la secreción de PRL. Avalan esta hipótesis evidencias farmacológicas (Kordon y col., 1973; 1974; Gallo y col., 1975; Quattrone y col., 1981), quirúrgicas (Barofsky, 1983) y fisiológicas (Mena y col., 1976; Culman y col., 1980; Johnston y col., 1984). La liberación de PRL inducida por estímulos como la succión y el estrés, así como otros estados hiperprolactinérmicos experimentales, constituyen los modelos más utilizados en el estudio de la regulación nerviosa de la descarga de PRL. En cambio, se tienen pocos datos acerca de la participación del sistema serotoninérgico en la secreción de PRL del proestro.

Los resultados que hemos obtenido durante el ciclo estral

y en los experimentos "in vitro" sugieren que la 5-HT de la eminencia media no está relacionada con la secreción de PRL. Sin embargo, la ausencia de las proyecciones serotoninérgicas originadas en el DR modifica el nivel de la descarga preovulatoria de la hormona. En consecuencia, es posible que aferencias serotoninérgicas de este origen y que inervan áreas anteriores, tal vez hipotalámicas pero no la eminencia media, estén involucradas en la regulación de la magnitud de la descarga de PRL durante el ciclo estral. Nuestros resultados también demuestran que la 5-HT de la glándula hipofisaria tampoco participa en la regulación de la secreción de PRL.

Concluyendo, los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis nos permiten proponer a la 5-HT como un neurotransmisor relacionado con los mecanismos fisiológicos que regulan la descarga preovulatoria de las gonadotrofinas a través de la estimulación de la secreción de LH-RH mediada por fibras serotoninérgicas que proyectan desde el DR hacia la eminencia media. La 5-HT estimula también la secreción de PRL, pero en este caso, otras proyecciones del DR participarían en el control.



ABREVIATURAS

A	Adrenalina
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AH	Anterohipófisis
COMT	Catecol-O-metil transferasa
CYP	Ciproheptadina
DA	Dopamina
5,6-DHT	5,6-Dihidroxitriptamina
5,7-DHT	5,7-Dihidroxitriptamina
DR	Núcleo dorsal del rafe
E ₂	Estradiol
EM	Eminencia media
FSH	Hormona folículoestimulante
FSH-RH	Hormona hipotalámica liberadora de FSH
GABA	Acido gamma-aminobutírico
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
5-HIA	Acido 5-hidroxiindolacético
HIOMT	Hidroxiindol-O-metil transferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
5-HT	5-Hidroxitriptamina, serotonina
5-HTP	5-Hidroxitriptofano
LH	Hormona luteinizante
LH-RH	Hormona hipotalámica liberadora de LH

MAO	Monoamino-oxidasa
MET	Metiotepín
MR	Núcleo mediano del rafe
NA	Noradrenalina
NAS	N-acetil serotonina
NAT	N-acetil transferasa
NMS	N-metil serotonina
OVLT	Organo vasculoso de la lámina terminal
P	Progesterona
pCPA	p-Cloro fenilalanina
PMS	Suero de yegua preñada
PIF	Factor inhibidor de la secreción de PRL
PRF	Factor liberador de PRL
PRL	Prolactina
SAMe	S-Adenosil metionina
SNC	Sistema nervioso central
SQ	Núcleo supraquiasmático

BIBLIOGRAFIA

- ADVIS JP, SIMPKINS JW, BENNET J, MEITES J (1978). Serotonergic control of prolactin in male rats. *Life Sciences* 24:359-366.
- ADVIS JP, McCANN SM, NEGRO-VILAR A (1980). Evidence that catecholaminergic and peptidergic (luteinizing hormone-releasing hormone) neurons in suprachiasmatic-medial preoptic, medial basal hypothalamus and median eminence are involved in estrogen-negative feedback. *Endocrinology* 107:892-901.
- ADVIS JP, KRULICH RD, DEY G (1985). Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) content and total LH-RH degrading activity (LH-RH DA) in the hypothalamus of the ewe. *Endocrinology* 116:2410-2418.
- AGHAJANIAN GK, BLOOM FE (1967). Localization of tritiated serotonin in rat brain by electron-microscopic autoradiography. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* 156:23-30.
- AGHAJANIAN GK, ROSENCRANS JA, SHEARD MH (1967). Serotonin release in the forebrain by stimulation of midbrain raphé nuclei. *Science* 156:402-403.
- AGHAJANIAN GK, BLOOM FE, SHEARD MH (1969). Electron microscopy of degeneration within the serotonin pathway of rat brain. *Brain Research* 13: 266-273.
- AHREN K, FUXE K, HAMBERGER L, HÖKFELT T (1971). Turnover changes in the tubero-infundibular dopamine neurons during the ovarian cycle of the rat. *Endocrinology* 88:1415-1418.
- AL-HAMMOD MH, GILMORE DP, WILSON CA (1985). Evidence for a stimulatory β -adrenergic component in the release of the ovulatory LH surge in pro-oestrous rats. *J. Endocrinology* 106:143-151.
- ALLEVA JJ, OVERPECK JG, UMBERGER EJ (1966). Effect of tranycylpromine and iproniazid on brain monoamine levels and ovulation in the golden hamster. *Life Sciences* 5:1557-1561.

- ALLEVA JJ, WALESKI MV, ALLEVA FR (1970). The zeitgeber for ovulation in rats, non-participation of the pineal gland. *Life Sciences* 9:241-246.
- ANDÉN NE, CARLSSON A, HILLARP NA, MAGNUSSON T (1964). 5-hydroxytryptamine release by nerve stimulation of the spinal cord. *Life Sciences* 3:473-478.
- ANDÉN NE, DAHLSTRÖM A, FUXE L, LARSSON K (1965). Mapping of the catechol-amine and 5-hydroxytryptamine neurons innervating the telencephalon and diencephalon. *Life Sciences* 4:1275-1279.
- ANDÉN NE, DAHLSTRÖM A, FUXE K, LARSSON K, OLSON L, UNGERSTADT U (1966). Ascending monoamine neurons to the telencephalon and diencephalon. *Acta physiologica scandinavica* 67:313-326.
- ANTHONY ELP, KING JC, STOPA EG (1984). Immunocytochemical localization of LH-RH in the median eminence, infundibular stalk and neurohypophysis. Evidence for multiple sites of releasing hormone secretion in humans and other mammals. *Cell and Tissue Research* 236:5-14.
- APFELBAUM ME, TALEISNIK S (1976). Interaction between oestrogen and gonadotrophin-releasing hormone on the release and synthesis of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone from incubated pituitary. *Journal of Endocrinology* 68: 127-136.
- ARENDASH GW, GALLO RV (1978). Serotonin involvement in the inhibition of episodic luteinizing hormone release during electrical stimulation of the midbrain dorsal raphe nucleus in ovariectomized rats. *Endocrinology* 102:1199-1206.
- ARENDASH W, GALLO RV (1979). Effect of lesions in the suprachiasmatic nucleus-retrochiasmatic area on the inhibition of pulsatile LH-release induced by electrical stimulation of the midbrain dorsal raphe nucleus. *Neuroendocrinology* 28:349-357.
- ASHKENAZI R, HOLMAN RB, VOGT M (1972a). Release of transmitters into the perfused third cerebral ventricle of the rat. *Journal of Physiology (London)* 223:195-209.

- ASHKENAZI R, HOLMAN RB, VOGT M (1972b). Release of transmitters on stimulation of the nucleus linearis raphe in the cat. *Journal of Physiology (London)* 223:255-259.
- AZMITIA EC (1978). The serotonin producing neurons of the midbrain median and dorsal raphe nuclei. *Handbook of psychopharmacology. Chemical pathways in the brain.* Iversen LL, Iversen SD y Snyder SM Editores. Plenum Press. Volumen 9:214-233.
- AZMITIA EC (1981). The visualization and characterization of 5-HT reuptake sites in the rodent and primate hippocampus. A preliminary study. *Journal of Physiology (Paris)* 77:175-182.
- AZMITIA EC, SEGAL M (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *Journal of comparative Neurology* 179:641-668.
- BAKER BL, DERMODY WC (1976). Effect of hypophysectomy on immunocytochemically demonstrated gonadotropin-releasing hormone in the rat brain. *Endocrinology* 98:1116-1122.
- BARDEN N, MERAND Y, ROULEVA P, GARON M, DUPONT A (1981). Changes in the β -endorphin content of discrete hypothalamic nuclei during the estrous cycle of the rat. *Brain Research* 204:441-445.
- BARGMANN W (1949). Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. *Z. Zellforschung* 34:610-634.
- BARNEA A, BEN-JONATHAN N, PORTER JC (1976). Characterization of hypothalamic subcellular particles containing luteinizing hormone-releasing hormone and thyrotropin releasing hormone. *Journal of Neurochemistry* 27:427-484.
- BAROFSKY AL (1975). Progesterone-induced luteinizing hormone release in oestrogen-primed ovariectomized rats after destruction of mid-brain inputs to suprachiasmatic nuclei. *Journal of Endocrinology* 66:285-286.
- BAROFSKY AL (1979). Median raphe stimulation and sham procedures inhibit the LH surge. *Neuroendocrinology* 28:358-370.

- BAROFSKY AL, TAYLOR J, MASSARI J (1983). Dorsal raphe hypothalamic projections provide the stimulatory serotonergic input to suckling-induced prolactin release. *Endocrinology* 113:1894-1903.
- BARRACLOUGH CA, SAWYER CH (1955). Inhibition of the release of pituitary ovulatory hormone in the rat by morphine. *Endocrinology* 57:329-337.
- BARRACLOUGH CA, SAWYER CH (1957). Blockade of the release of pituitary ovulating hormone in the rat by chlorpromazine and reserpine: possible mechanism of action. *Endocrinology* 61:341-351.
- BARRACLOUGH CA, WISE PM (1982). The role of catecholamines in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion. *Endocrine Reviews* 3:91-119.
- BARRACLOUGH CA, YRARRAZABAL S, HATTON R (1964). A possible hypothalamic site of action of progesterone in the facilitation of ovulation in the rat. *Endocrinology* 75:838-845.
- BARRY J, CARETTE B (1975). Immunofluorescence study of LRF neurons in primates. *Cell and Tissue Research* 164:163-178.
- BARRY J, DUBOIS MP, CARETTE B (1974). Immunofluorescence study of LRF neurons in primates. *Cell and Tissue Research* 164:163-178.
- BATTEMBERG ELF, BLOOM FF (1975). A rapid, simple and more sensitive method for the demonstration of central catecholamine-containing neurons and axons by glyoglic acid induced fluorescence I. Specificity *Psychopharmacol. Comm.* 1:1-13
- BEAUDET A, DESCARRIES L (1979). Radioautographic characterization of a serotonin accumulating nerve cell group in adult rat hypothalamus. *Brain Research* 160:231-243.
- BELIN MF, AGUERA M, ZAPPA ZM, DEGUEURCE A, BOBILLIER P, PUJOL JF (1979). Gaba-accumulating neurons in the nucleus raphe dorsalis and periaqueductal gray in the rat: a biochemical and radioautographic study. *Brain Research* 170:279-297.

- BELTRAMINO C, TALEISNIK S (1978). Facilitatory and inhibitory effects of electrochemical stimulation of the amigdala on the release of luteinizing hormone. *Brain Research* 144:95-107.
- BELTRAMINO C, TALEISNIK S (1979). Effect of electrochemical stimulation in the olfactory bulbs on the release of gonadotropin hormones in rats. *Neuroendocrinology* 28:320-329.
- BENNETT GW, EDWARDSON JA, HOLLAND D, JEFFCOATE SL, WHITE N (1975). Release of immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone from hypothalamic synaptosomes. *Nature* 257:323-325.
- BIEGON A, SEGAL M, SAMUEL D (1979). Sex differences in behavioral and thermal responses to pargiline and tryptophan. *Psychopharmacology (Berlin)* 61:77-80.
- BIEGON A, BERCOVITZ H, SAMUEL D (1980). Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. *Brain Research* 187:221-225.
- BIEGON A, McEWEN BS (1982). Modulation by estradiol of serotonin receptors in brain. *Journal of Neuroscience* 2:199-205.
- BIRGE CA, JACOBS LS, HAMMER CT, DAUGHADAY WH (1970). Catecholamine inhibition of prolactin secretion by isolated adenohypophyses. *Endocrinology* 86:120-130.
- BISHOP W, FAWCETT CP, KRULICH L, McCANN SM (1972). Acute and chronic effects of hypothalamic lesions on the release of FSH, LH and prolactin in intact and castrated rats. *Endocrinology* 91:643-656.
- BLAKE C (1976a). A detailed characterization of the proestrous luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 98:445-450.
- BLAKE CA (1976b) Stimulation of the early phase of the proestrous follicle-stimulating hormone rise after infusion of luteinizing hormone-releasing hormone in phenobarbital treated rats. *Endocrinology* 98:461-467.

- BLAKE CA (1976c). Effects of pinealectomy on the rat estrous cycle and pituitary gonadotropin release. *Journal of Endocrinology* 69:67-76.
- BOBILLIER P, PETITJEAN F, SALVERT D, LIGIER M, SEGUIN S (1975). Differential projections of the nucleus raphe dorsalis and nucleus raphe centralis as revealed by autorradiography. *Brain Research* 85:205-210.
- BOGDANSKY DF, PLETCHER A, BRODIE BD, UNDERFRIEND S (1956). Identification and assay of serotonin in brain. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* 117:82-88.
- BOGDANSKY DF, WEISSBACH H, UNDERFRIEND S (1957). The distribution of serotonin, 5-hydroxytryptophan decarboxylase and monoamine oxidase in brain. *Journal of Neurochemistry* 1:272-278.
- BOWKER RM, WESTLUND KM, SULLIVAN MC, WILKER JF, COULTER JD (1983). Descending serotonergic, peptidergic and cholinergic pathway from the raphe nuclei: a multiple transmitter complex. *Brain Research* 288:33-48.
- BRODAL A (1981). *Neurological anatomy in relation to clinical medicine*. Oxford University Press. New York.
- BRODAL A, TABER E (1960). The raphe nuclei of the brain stem of the cat III. Afferent connections. *Journal of comparative Neurology* 114:261-281.
- BROWMAN LG (1937). Light in its relation to activity and estrous rhythms in the albino rat. *Journal of experimental Zoology* 75:375-388.
- BROWN PS (1966). The effect of reserpine, 5-hydroxytryptamine and other drugs on induced ovulation in immature mice. *Journal of Endocrinology* 35:507-514.
- BROWN PS (1967). The effect of 5-hydroxytryptamine and two of its antagonists on ovulation in the mouse. *Journal of Endocrinology* 37:327-333.

- BROWN PS (1971). Pituitary follicle-stimulating hormone in immature female rats treated with drugs that inhibit the synthesis or antagonise the actions of catecholamines and 5-hydroxytryptamine. *Neuroendocrinology* 7:183-192.
- BURGUS R, GUILLEMIN R (1970). Hypothalamic releasing factors. *Annual Reviews of Biochemistry* 39:499-525.
- BUTCHER RL, COLLINS WE, FUGO NW (1974). Plasma concentrations of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol 17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94:1704-1709.
- CALAS A, ALONSO G, ARNAULD E, VINCENT JO (1974). Demonstration of indoleaninergetic fibers in the median eminence of the duck, rat and monkey. *Nature* 256:241-243.
- CALIGARIS L, TALEISNIK S (1974). Involvement of neurons containing 5-hydroxytryptamine in the mechanism of prolactin release induced by oestrogens. *Journal of Endocrinology* 62:25-33.
- CARDINALI DP (1981). Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocrine Reviews* 2:327-346.
- CARRER HF, TALEISNIK S (1970). Effect of mesencephalic stimulation on the release of gonadotrophins. *Journal of Endocrinology* 48:527-539.
- CARRILLO AJ, RABII J, CARRER HF, SAWYER CH (1977). Modulation of the proestrous surge of luteinizing hormone by electrochemical stimulation of the amygdala and hippocampus in the anesthetized rat. *Brain Research* 128:81-92.
- CLEMENS JA, SAWYER BP, CERIMELE B (1977). Further evidence that serotonin is a neurotransmitter involved in the control of prolactin secretion. *Endocrinology* 100:692-697.
- CLEMENS JA, ROUSH ME, FULLER RW (1978). Evidence that serotonin neurons stimulate secretion of prolactin releasing factor. *Life Sciences* 22:2209-2214.

- CLEMENS JA, FLAUGH ME, PARLI J, SAWYER BD (1980). Inhibition of luteinizing hormone release and ovulation by 6-chloro-and 6-fluoro-melatonin. *Neuroendocrinology* 30:83-87.
- COEN CW, MACKINNON PCB (1979). Serotonin involvement in the control of phasic luteinizing hormone release in the rat: evidence for a critical period. *Journal of Endocrinology* 82:105-113.
- COEN CW, FRANKLIN M, LAYNES RW, MACKINNON PCB (1980). Effects of manipulating serotonin on the incidence of ovulation in the rat. *Journal of Endocrinology* 87:195-201.
- COEN, CW, MACKINNON PCB (1980). Lesions of the suprachiasmatic nuclei and the serotonin-dependent phasic release of luteinizing hormone in the rat: effect of drinking rhythmicity and on the consequences of preoptic and stimulation. *Journal of Endocrinology* 84:231-236.
- COEN CW, COMBS MC (1983). Effects of manipulating catecholamines on the incidence of the preovulatory surge of luteinizing hormone and ovulation in the rat: evidence for a necessary involvement of hypothalamic adrenalin in the normal or "mid night" surge. *Neuroscience* 10:187-206.
- COLLU R, FRASCHINI F, MARTINI H (1971). Blockade of ovulation by melatonin. *Experientia* 27:844-845.
- COLLU R, FRASCHINI F, MARTINI L (1973). Role of indoleamine in the control of gonadotropin and growth hormone secretion. *Progress in Brain Research* 39:289-300.
- CONRAD LCA, LEONARD CM, PFAFF DW (1974). Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *Journal of Comparative Neurology* 156:179-206.
- COOMBS MC, COEN CW (1983). Adrenaline turnover rates in the medial preoptic and medial basal hypothalamus in relation to the release of luteinizing hormone in female rat. *Neuroscience* 10:207-210.
- CORBIN AL, SCHOTTELIUS A (1961). Hypothalamic neurohumoral agents and sexual maturation of immature female rats. *American Journal of Physiology* 201:1176-1180.

- CRAMER OH, BARRACLOUGH CA (1978). The actions of serotonin, norepinephrine and epinephrine on hypothalamic processes leading to adenylylating hormone release. *Endocrinology* 103:694-703.
- CROWLEY WR, O'DONOHUE TL, JACOBOWITZ DM (1978). Changes in catecholamine content in discrete brain nuclei during the estrous cycle of the rat. *Brain Research* 147:315-326.
- CROWLEY WR, TERRY LC, JOHNSON MD (1982). Evidence for the involvement of central epinephrine systems in the regulation of luteinizing hormone, prolactin and growth hormone release in female rats. *Endocrinology* 110:1102-1107.
- CROWLEY WR, TERRY LC (1981). Effects of epinephrine synthesis inhibitor, SKF 64139, on the secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rat. *Brain Research* 204:231-235.
- CULMAN J, KETNANSKY R, TORDA T, MURGÁS K (1980). Serotonin concentration in individual hypothalamic nuclei of rats exposed to acute immobilization stress. *Neuroscience* 5:1503-1506.
- CHAPPEL SC, BARRACLOUGH CA (1976). Hypothalamic regulation of pituitary FSH secretion. *Endocrinology* 98:927-935.
- CHARLI JL, ROTSZTJEN WH, PATTOU E, KORDON C (1978). Effect of neurotransmitters on "in vitro" release of luteinizing hormone-releasing hormone from mediobasal hypothalamus of male rats. *Neuroscience Letters* 10:159-163.
- CHEN YF, RAMIREZ VD (1981). Serotonin stimulates thyrotropin-releasing hormone release from superfused rat hypothalamus. *Endocrinology* 108:2359-2366.
- CHEN HT, SYLVESTER PW, IERI T, MEITES J (1981). Potentiation of luteinizing hormone release by serotonin agonists in ovariectomized steroid primed rats. *Endocrinology* 108:948-952.
- CHIOCCHIO SR, CANNATA MA, TRAMEZZANI JH (1976 a). The size, weight and catecholamine content of the median eminence of the rat. *Brain Research* 110:612-618.

- CHIOCCHIO SR, NEGRO-VILAR A, TRAMEZZANI JH (1976 b). Acute changes in norepinephrine content in the median eminence induced by orchidectomy or testosterone replacement. *Endocrinology* 99:629-635.
- CHIOCCHIO SR, CHAFUEN S, TRAMEZZANI JH (1980). Changes in adeno-hypophysial dopamine related to prolactin release. *Endocrinology* 106:1682-1685.
- CHU EW, WURTMAN RJ, AXELROD J (1964). An inhibitory effect of melatonin on the estrous phase of the estrous cycle of the rodents. *Endocrinology* 75:238-242.
- DAHLSTRÖM A, FUXE K (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain neurons. *Acta Physiologica Scandinavica* 62: Suppl 232:1-55.
- DENCE JB (1980). Introduction to the peptides. En: *Steroids and peptides*. John Wiley and sons. N York pag 175.
- DOMANSKY E, PRZEKOP F, SKYBISZEWSKI B, WOLINSKA E (1975). The effect and site of action of indoleamines on the hypothalamic centers involved in the control of LH release and ovulation in sheep. *Neuroendocrinology* 17:265-273.
- DONOSO AO, BANZAN AM, BORZINO MI (1976). Prolactin and luteinizing hormone release after intraventricular injection of histamine in rats. *Journal of Endocrinology* 68:171-172.
- DONOSO AO, BANZAN AM (1976). Acute effect of histamine on plasma prolactin and luteinizing hormone levels in male rats. *Journal of neural Transmission* 39:95-101.
- DONOSO AO (1978). Induction of prolactin and luteinizing hormone release by histamine in male and female rats and the influence of brain transmitter antagonists. *Journal of Endocrinology* 76:193-202.
- DROUVA SV, GALLO RV (1976). Catecholamine involvement in episodic luteinizing hormone release in adult ovariectomized rats. *Endocrinology* 99:651-658.

- DROUVA SV, GALLO RV (1977). Further evidence for inhibition of episodic luteinizing hormone release in ovariectomized rats by stimulation of dopamine receptors. *Endocrinology* 100:792-798.
- DROUVA SV, EPELBAUM J, TAPIA-ARANCIBIA L, LAPLANTE E, KORDON C (1981). Opiate receptors modulate LH-RH and SRIF release from mediobasal hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 32:163-167.
- ELIAS AN, VALENTA JL, SZEKERES AV, GROSSMAN MK (1982). Regulatory role of gamma-aminobutyric acid in pituitary hormone secretion. *Psychoneuroendocrinology* 7:15-30.
- EVERETT JW (1964). Central neural control of reproductive functions of the adenohypophysis. *Physiological Reviews* 44:373-396.
- EVERETT JW (1970). Photoregulation of the ovarian cycle in the rat. En: *La photorégulation de la reproduction chez les oiseaux et les mammifères*. Benoit J y Assemacher I. Eds. CRNS (Paris) pag 387-403.
- EVERETT JW (1972). Brain, pituitary gland and the ovarian cycle. *Biology of Reproduction* 6:3-12.
- EVERETT JW (1978). The mammalian hypothalamo-hypophysial system. En: *The Endocrine Hypothalamus*. Jeffcoate SL y Hutchinson JSM Eds. Acad Press (London) pag 1-25.
- EVERETT JW, RADFORD HW, HOLSINGER J (1964). Electrolytic irritative lesions in the hypothalamus and other forebrain areas: effect on luteinizing hormone release and the ovarian cycle. En: *Hormonal Steroids*. Martini L y Pecile A Eds. Acad Press NY.
- EVERETT JW, SAWYER CH, MARKEE JE (1949). A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 44:234-250.
- FALCK B, HILLARP NA, THIEME G, TORP A (1962). Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 10:348-354.

- FEE AR, PARKES AS (1929). Studies on ovulation I. The relation of the anterior pituitary body to ovulation in the rabbit. *Journal of Physiology (London)* 67:383-388.
- FEE AR, PARKES AS (1930). Studies on ovulation II. Effect of vaginal anesthesia on ovulation in the rabbit. *Journal of Physiology (London)* 70:385-388.
- FICHERA G (1905). Sur l'hypertrophie de la glande pituitaire consecutive à la castration. *Archives italiens de Biologie* 43:405-426.
- FRANCI JAA, ANTUNES-RODRIGUEZ J (1985). Effect of Locus ceruleus lesions on luteinizing hormone secretion under different experimental conditions. *Neuroendocrinology* 41:44-51.
- FRANK S, McELHONE J, YOUNG SN, KRAULIS I, RUF KB (1980). Factors determining the diurnal variation in progesterone-induced gonadotropin release in the ovariectomized rat. *Endocrinology* 107:353-358.
- FRANKFURT M, LANDEN JM, AZMITIA EC (1981). The immunocytochemical localization of serotonergic neurons in the rat hypothalamus. *Neuroscience Letters* 24:227-232.
- FREEMAN MC, DUPKE KC, CROTEAU CM (1976). Extinction of the estrogen-induced daily for LH release in the rat: a role for the proestrous surge of progesterone. *Endocrinology* 99:223-229.
- FRIEDMAN E, KRIEGGER DT, MEZEY E, LERANTH CS, BROWNSTEIN MJ (1983). Serotonergic innervation of the rat pituitary intermediate lobe: decrease after stalk section. *Endocrinology* 112:1943-1947.
- FUCHS E, MANSKY T, STOCK KW, VIJAYANE E, WUTTKE W (1984). Involvement of catecholamines and glutamate in GABAergic mechanism regulatory to luteinizing hormone and prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 38:484-489.
- FULLER RW (1980). Pharmacology of central serotonin neurons. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* 20:111-127.

- FUXE K (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. Acta Physiologica Scandinavica 64 suppl 247:39-85.
- FUXE K, HÖKFELT T (1969). Catecholamines in the hypothalamus and the pituitary gland. En: Frontiers in Neuroendocrinology vs. Ganong WF y Martin L Eds. Oxford University Press pag 47-96.
- FUXE K, HÖKFELT T, UNGERSTEDT U (1968). Localization of indolealkylamines in CNS. Adv Pharmacology 6A:235-251.
- GABRIEL SM, SIMPKINS JW, KALRA SP (1983). Modulation of endogenous opioid influence on luteinizing hormone secretion by progesterone and estrogen. Endocrinology 113:1806-1811.
- GALLO RV, MOBERG GP (1977). Serotonin mediated inhibition of episodic luteinizing hormone release during electrical stimulation of the arcuate nucleus in ovariectomized rats. Endocrinology 100:945-954.
- GALLO RV, OSLAND RB (1976). Electrical stimulation of the arcuate nucleus in ovariectomized rats inhibits episodic hormone (LH) release but excites LH release after estrogen priming. Endocrinology 99:659-668.
- GALLO RV, RABII J, MOBERG GP (1975). Effect of methysergide, a blocker of serotonin receptors on plasma prolactin levels in lactating and ovariectomized rats. Endocrinology 97:1096-1105.
- GALLARDO E, RAMIREZ VD (1977). A method for the superfusion of rat hypothalamus: secretion of luteinizing hormone-releasing hormone. Proceedings of the society of experimental Biology and Medicine 155:79-84.
- GALLARDO EGP, BILINSKI M, CHIOCCIO SR, TRAMEZZANI JH (1985). Dopamine enters lactotrophs and reaches their secretory granules. Journal of Endocrinology 104:23-28.
- GAY VL, MIDGLEY AR Jr., NISWENDER GD (1970). Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation. Federation Proceedings 29:1880-1187.

- GLAZER ED, STEINBUSCH HWH, VERHOFSTAD AAJ, BASBAUM AJ (1981). Serotonergic neurons of the cat nucleus raphe dorsalis and paragigantocellularis contain enkephalin. *Journal of Physiology (Paris)* 77:241-245.
- GOLDSMITH PC, GANONG WF (1975). Ultrastructural localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence of the rat. *Brain Research* 97:181-193.
- GREENGRASS PM, TONGE SR (1971). Changes in brain monoamine concentrations during the estrous cycle in the mouse: possible pharmacological implications. *Journal of Pharmacol. Pharmacology* 23:897-898
- GRIFFITHS EW, McDERMOTT JR (1984). Biotransformation of neuropeptides. *Neuroendocrinology* 39:573-581.
- GUBLER U, SEEBURG P, HOFFMAN BJ, GAGE LP, UNDEFRIENDS S (1982). Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* 295:206-208.
- HARRIS GW (1937). Induction of ovulation in the rabbit by electrical stimulation of the hypothalamo-hypophyseal mechanism. *Proceedings of the Royal Society (London)* 122:374-394.
- HARRIS GW (1948). Neural control of the pituitary gland. *Physiological Reviews* 28:139.
- HATERIUS HD, DERBYSHIRE AJ (1937). Ovulation in the rabbit following stimulation of the hypothalamus. *American Journal of Physiology* 119:329-330.
- HAMON M, BOURGOIN S, ARTAUD F, EL MESTIKAWAY S (1981). The respective roles of tryptophan uptake and tryptophan hydroxylase in the regulation of serotonin synthesis in the central nervous system. *Journal of Physiology (Paris)* 77:269-279.
- HENDRICKSON AE, WAGONER N, COUVAN WM (1972). An autoradiographic and electron microscopic study of retinohypothalamic connections. *Z. Zellforschung* 135:1-26.

- HÉRY M, ROUER E, GLOWINSKI J (1972). Daily variations of serotonin metabolism in the rat brain. *Brain Research* 43:445-465.
- HÉRY M, LAPLANTE E, KORDON C (1975a) Role of pituitary sensitivity and adrenal section in the effect of serotonin depletion on luteinizing hormone regulation. *Journal of Endocrinology* 67:463-464.
- HÉRY M, LAPLANTE E, PATTOU E, KORDON C (1975b). Interaction de la sérotonine cérébrale avec la libération cyclique de LH chez le ratte. *Annales d'endocrinologie (Paris)* 36:123-130.
- HÉRY M, LAPLANTE E, KORDON C (1976). Participation of serotonin in the phasic release of LH. I. Evidence from pharmacological experiments. *Endocrinology* 99:496-503.
- HÉRY M, LAPLANTE E, KORDON C (1978). Participation of serotonin in the phasic release of luteinizing hormone II. Effects of lesions of serotonin containing pathway in the central nervous system. *Endocrinology* 102:1019-1025.
- HÉRY M, FRAUDON M, HÉRY F (1982). Daily variations in serotonin metabolism in the suprachiasmatic nucleus of the rat: influence of oestradiol impregnation. *Journal of Endocrinology* 94:157-166.
- HÉRY M, FRAUDON M, HÉRY F (1983). In vitro release of newly synthesized serotonin from superfused rat suprachiasmatic area. Ionic dependency. *European Journal of Pharmacology* 89:9-18.
- HINSEY JC, MARKEE JE (1933). Pregnancy following bilateral section of the cervical sympathetic trunks in the rabbit. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine* 31:270-271.
- HONG E, SANCILIO LF, VARGAS R, PARDO EG (1969). Similarities between the pharmacological actions of quipazine and serotonin. *European Journal of Pharmacology* 6:274-280.
- HORN AM, FINK G (1985). Effect of 5-hydroxytryptamine uptake blockers on the release of LH and prolactin in several different experimental steroid models in the rat. *Journal of Endocrinology* 104:397-406.

- HORN AM, WATTS AG (1985). Effect of 5-hydroxytryptamine uptake blockers on the concentration in brain of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in male rats, pro-oestrous rats and ovariectomized rats treated with oestrogen and progesterone. *Journal of Endocrinology* 104:407-413.
- HOUSLAY MD, TRIPTON KF, JOUDIN MBH (1976). Multiple forms of monoamine oxidase: fact and artifact. *Life Sciences* 19:467-478.
- HOUSSAY BA, BIASSOTTI A, SANMARTINO R (1935). Modifications fonctionelles de l'hypophyse après les lésions infundibulo-tubériennes chez le crapaud. *Comptes rendus Societée Biologie* 120:725-727.
- IGARASHI M, McCANN SM (1964). A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing factor. *Endocrinology* 74:446-452.
- JAIM-ETCHEVERRY G, ZIEHER LM (1974). Localizing serotonin in central and peripheral nerves. En "The neurosciences. Third study program". Schmitt F.O and Worden FG eds. The MIT Press. Cambridge Mass. pag 917-924.
- JAIM-ETCHEVERRY G, ZIEHER LM (1980). Stimulation-depletion of serotonin and adrenaline from vesicles of sympathetic nerves in the pineal gland of the rat. *Cell and Tissue Research* 207:13-20.
- JEFFCOATE SL, FRAZER HM, HOLLAND DT, GUNN A (1979). Radioimmunoassay of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in serum from man, sheep and rat. *Acta Endocrinologica (Kbh)* 75:625-635.
- JENNES L, STUMPF WE (1980). LH-RH Systems in the brain of the golden hamster. *Cell and Tissue Research* 209:239-256.
- JENNES L, BECKMAN WC, STUMPF WE, GRZANNA R (1982). Anatomical relationship of serotonergic and noradrenalinergic projections with Gn-RH system in septum and hypothalamus. *Experimental Brain Research* 46:331-338.
- JOHNS M, FEDER H, KOMISARU B, MAYER A (1978). Urine-induced reflex ovulation in anovulatory rats may be a vomeronasal effect. *Nature* 272:446-448.

- JOHNS MA, AZMITIA EC, KRIEGER DT (1982). Specific "in vitro" uptake of serotonin by cells in the anterior pituitary of the rat. *Endocrinology* 110:754-760.
- JOHNSTON CA, GIBBS DM, NEGRO-VILAR A (1983). High concentrations of epinephrine derived from a central source and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in hypophysial portal plasma. *Endocrinology* 113:819-821.
- JOHNSTON CA, TESONE M, NEGRO-VILAR A (1984). Cellular mechanisms of acute estrogen negative feedback on LH secretion: norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine metabolism in discrete regions of the rat brain. *Brain Research Bulletin* 13:363-369.
- JOHNSTON CA, DEMAREST KT, MOORE KE (1984). 5-hydroxytryptamine synthesis and metabolism in discrete nuclei of the rat brain during surges of prolactin associated with restraint of suckling. *Neuroendocrinology* 38:117-122.
- KALRA SP (1985). Catecholamine involvement in preovulatory LH release. Reassessment of the role of epinephrine. *Neuroendocrinology* 40:139-144.
- KALRA SP, McCANN SM (1974). Effect of drugs modifying catecholamine synthesis on plasma LH and ovulation in the rat. *Neuroendocrinology* 15:79-91.
- KALRA SP, KALRA PS (1983). Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrine Reviews* 4:311-357.
- KALRA SP, KALRA PS, KRULICH L, FAWCETT CP, McCANN SM (1972). Involvement of norepinephrine in transmission of the stimulatory influence of progesterone on gonadotropin release. *Endocrinology* 90:1168-1174.
- KAMBERI I, DANHOF I (1968). Monoamine-oxidase activity in hypothalamus, amygdala and cerebral cortex during the estrous cycle. *Federation Proceedings* 27:288-291.
- KAMBERI IA, MICAL RS, PORTER JC (1970a). Effect of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines and indoleamines on LH release. *Endocrinology* 87:1-12.

- KAMBERI IA, SCHNEIDER HPG, McCANN SM (1970b). Action of dopamine to induce release of FSH-releasing factor (FRF) from hypothalamic tissue "in vitro". *Endocrinology* 86:278-282.
- KAO LIUL, WEISZ J (1977). Release of Gn-RH from isolated perifused MBH by melatonin. *Endocrinology* 100:1723-1726.
- KAWAKAMI M, TERASAWA E, SETO K, WAKABAYASHI K (1973). Modulatory effect of limbic structures on gonadotropin release. *Neuroendocrinology* 12:1-16.
- KAWAKAMI M, ARITA J, KIMURA F, HAYASHI K (1979). The stimulatory roles of catecholamines and acetylcholine in the regulation of gonadotropin release in ovariectomized estrogen-primed rats. *Endocrinology Jpn* 26:275-280.
- KENT DL, SLADEK JR (1978). Histochemical pharmacological and microspectrofluorometric analysis of new sites of serotonin localization in the rat hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 180:221-236.
- KING JC, ANTHONY ELP (1983). Possible differences in the dynamics of molecular processing of LH-RH in rats vs other mammals suggested by immunocytochemical studies. *Society of Neuroscience Abstr.* 9:1017.
- KING JC, ANTHONY E (1984). LH-RH neurons and their projections in humans and other mammals: species comparisons. *Peptides* 5: 195-207.
- KIMURA F, KAWAKAMI M (1978). Reanalysis of the preoptic afferents and efferents involved in the surge of LH, FSH and PRL release in the P surge. *Neuroendocrinology* 27:74-85.
- KIZER JS, PALKOVITS M, KOPIN IJ, SAAVEDRA JM, BROWNSTEIN MJ (1976). Lack of effect of various endocrine manipulations on tryptophan hydroxylase activity of individual nuclei of the hypothalamus, limbic system and midbrain of the rat. *Endocrinology* 98:743-747.
- KOBAYASHI RM, LU KH, MOORE RY, YEN SSC (1978). Regional distribution

of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone in proestrous rats: effect of ovariectomy and estrogen replacement. *Endocrinology* 102:98-105.

KOCH DD, KISSINGER DT (1973). Determination of tryptophan and several metabolites in physiological samples by reverse phase chromatography with electrochemical detection. Dept Chemistry. Purdue Univ. West Lafayette In.

KÖNING JFR, KLIPPEL RA (1963). The rat brain. A stereotaxic atlas of forebrain and lower parts of the brainstem. The Williams and Wilkins Comp. Ed. Baltimore.

KORDON C (1969). Effect of selective experimental changes in regional hypothalamic monoamine levels on superovulation in the immature rat. *Neuroendocrinology* 4:129-138.

KORDON C (1971). Involvement of catecholamines and indoleamines in the control of pituitary gonadotropin release. *Journal of Neurovisceral relations*. Suppl X:41-50.

KORDON C, GLOWINSKI J (1972). Role of hypothalamic monoaminergic neurons in the gonadotropin release-regulating mechanisms. *Neuropharmacology* 11:153-162.

KORDON C, JAVOY F, VASSENT G, GLOWINSKI J (1968). Blockade of superovulation in the immature rat by increased brain serotonin. *European Journal of Pharmacology* 4:169-174.

KORDON C, BLAKE CA, TERKEL J, SAWYER CH (1973/74). Participation of serotonin containing neurons in the suckling induced rise in plasma prolactin in lactating rats. *Neuroendocrinology* 13:213-223.

KORDON C, KERDELHUÉ B, PATTOU E, JUSTISZ M (1974). Immunocytochemical localization of LH-RH in axons and nerve terminals of the rat median eminence. *Proceedings of the Society of experimental Biology and Medicine* 147:122-127.

KRAUSE R (1979). Comparative distribution of LH-RH and somatostatin in the supraoptic crest (OVL). *Neuroscience Letters* 11:177-180.

- KRULICH L (1979). Central neurotransmitters and the secretion of prolactin, GH, LH and TSH. *Annual Reviews of Physiology* 41:603-615.
- KRULICH L, McCANN SM, MAYFIELD MA (1981). On the mode of action of the prolactin release-inhibiting action of the serotonin receptor blockers metergoline, methysergide and cyproheptadine. *Endocrinology* 108:1115-1124.
- KÜNG W, CHAPPUIS-ARDNT E, WIRZ-JUSTICE A (1975). Variations of monoamine levels in 18 rat brain regions in relation to the oestrous cycle. *Experientia* 31:722 (Abstr).
- KÜNG W, WIRZ-JUSTICE A, MENZI R, CHAPPUIS-ARDNT E (1976). Regional brain variations of tryptophan, monoamines, monoamine oxidase activity, plasma free and total tryptophan during the estrous cycle of the rat. *Neuroendocrinology* 21:289-296.
- LABHSETWAR AP (1971). Effects of serotonin on spontaneous ovulation: a theory for the dual hypothalamic control of ovulation. *Acta Endocrinologica (Kbh)* 68:334-344.
- LABHSETWAR AP (1972). Role of monoamines in ovulation: evidence for a serotonergic pathway for inhibition of spontaneous ovulation. *Journal of Endocrinology* 54:269-275.
- LADISICH W (1974). Effect of progesterone on regional 5-hydroxytryptamine metabolism in the rat brain. *Neuropharmacology* 13:877-883.
- LEBLANC P, PATTOU E, L'HERITHIER A, GOGAN F, SHAMA A, KORDON C (1983). Biphasic pattern of follicle stimulating and luteinizing hormone responses to gonadotrophin releasing hormone "in vitro". *Neuroendocrinology* 36:88-94.
- LENGYEL AMJ, GROSSMAN A, BOULOUX MG, REES LH, BESSER GM (1985). Effect of dopamine and morphine on immunoreactive somatostatin and LH-releasing hormone secretion from hypothalamic fragments "in vitro". *Journal of Endocrinology* 106:317-322.
- LEVINE JE, RAMIREZ VD (1982). Luteinizing hormone-releasing hormone

release during the rat estrous cycle and after ovariectomy as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology* 111:1439-1448.

LEYSEN JE, AWOUTERS F, KENNIS L, LADURON PM, VAN DENBERK J, JANSSEN PAJ (1983). Receptors binding profile of R 41 468, a novel antagonist at 5-HT₂ receptors. *Life Sciences* 28:1015-1022.

LIBERTUN C, McCANN SM (1976). The possible role of histamine in the control of prolactin and gonadotropin release. *Neuroendocrinology* 20:110-120.

LIPPMAN W (1968) Relationship between hypothalamic norepinephrine and serotonin and gonadotropin secretion in the hamster. *Nature* 218:173-174.

LONG JA, EVANS HM (1922). "The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena". Univ of California Press. Berkeley. CA.

LOWRY OH, ROSENBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.

LUMPKIN MD, McCANN SM (1979). Studies on the possible selective hypothalamic control of FSH secretion. *Federation Proceedings* 38:1107-1111.

LUMPKIN MD, McCANN SM (1984). Effect of destruction of the dorsal anterior hypothalamus on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 115:2473-2480.

LUINE VN, RHODES JC (1983). Gonadal hormone regulation of MAO and others enzymes in hypothalamic areas. *Neuroendocrinology* 36:235-241.

MARKÓ M, FLÜCKIGER E (1976). Inhibition of ovulation in rats by antagonists to serotonin and a new tricyclic component. *Experientia* 32:491-492.

MARKÓ M, FLÜCKIGER E (1980). Role of serotonin in the regulation of

- ovulation. *Neuroendocrinology* 30:228-231.
- MARSHALL FHA, VERNEY EB (1936). The occurrence of ovulation and pseudo-pregnancy in the rabbit as a result of central neurons stimulation. *Journal of Physiology (London)* 86:327-336.
- MARTIN JE, ENGEL JN, KLEIN DC (1977). Inhibition of the "in vitro" pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone by melatonin, serotonin and 5-methoxytryptamine. *Endocrinology* 100:675-680.
- MARTINOVIC JV, McCANN SM (1978). Effect of lesions in the ventral noradrenergic tract produced by microinjection of 6-hydroxydopamine on gonadotropin release in the rat. *Endocrinology* 100:1206-1213.
- MATSUO H, BABA Y, NAIR RMG, ARIMURA A, SCHALLY AY (1971). Structure of the porcine LH-and FSH- releasing hormone I. The proposed amino-acid sequence. *Biochemical Biophysical Research Communications* 43:1334-1339.
- MAZZUCA M, DUBOIS MP (1974). Detection of luteinizing hormone-releasing hormone in the guinea-pig median eminence with an immunoenzymatic technique. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 22:993-996.
- McCANN SM (1962). A hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone. *Annual Journal of Physiology* 202:395-400.
- McCANN SM (1980). Control of anterior pituitary hormone by brain peptides. *Neuroendocrinology* 31:355-363.
- McCANN SM, MOSS R (1976). Putative neurotransmitters involved in discharging gonadotropin-releasing neurohormones and the action of LH-releasing hormone. *Life Sciences* 16:833-852.
- McCANN SM, TALEISNIK S, FRIEDMAN HM (1960). LH-releasing activity in hypothalamic extracts. *Proceedings of the Society of experimental Biology and Medicine* 104:432-434.

- McDERMOTT JR, SMITH AI, BIGGINS JA, EDWARDSON JA, GRIFFITHS EC (1982). Mechanism of luteinizing hormone-releasing hormone degradation by subcellular fractions of rat hypothalamus and pituitary. *Regulatory peptides* 3:257-269.
- MEITES J, SONNTAG WE (1981). Hypothalamic hypophysiotropic hormones and neurotransmitter regulation. *Current news. Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 21:295-322.
- MEITES J, LU KH, WUTTKE W, WELSH W, NAGASAWA R, QUADRI SK (1972). Recent studies on functions and control of prolactin secretion in rats. *Recent Progress in Hormone Research* 28:471-486.
- MEITES J, BRUNI JF, VAN VUGT DA, SMITH AF (1979). Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions. *Life Sciences* 24:1325-1336.
- MELROSE PA, KNIGGE KM (1985). Methods for the isolation of viable gonadotropin-releasing hormone (LRF) neurons. *Peptides* 6:347-351.
- MENA F, ENJALBERT A, CARBONELL L, PRIAM M, KORDON C (1976). Effect of suckling on plasma prolactin and hypothalamic monoamine levels in the rat. *Endocrinology* 99:445-451.
- MERCHENTHALER I, KOVACS G, LOVASZ G, SETALO G (1980). The preoptico-tuberoinfundibular LH-RH tract of the rat. *Brain Research* 198:63-74.
- MEYER DC (1978). Hypothalamic and raphe serotonergic systems in ovulation control. *Endocrinology* 103:1067-1074.
- MEYER DC, QUAY WB (1976). Hypothalamic and suprachiasmatic uptake of serotonin "in vitro". Twenty-four-hour changes in male and proestrous female rats. *Endocrinology* 98:1160-1165.
- MIYAKE A, TASAKA K, KAWAMURA Y, SAKUMOTO T, AONO T (1982). Progesterone facilitates the LRH releasing action of oestrogen. *Acta Endocrinology* 101:321-324.

- MIYAKE A, TASAKA K, AONO T (1984). Involvement of norepinephrine in pituitary LH release induced by oestradiol "in vitro". *Acta Endocrinologica* 107:199-203.
- MOORE RY, HALARIS AE, JONES BE (1978). Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *Journal of Comparative Neurology* 180: 417-438.
- MOSKO SS, MOORE RY (1979). Neonatal suprachiasmatic nucleus lesions: effects on the development of circadian rhythms in the rat. *Brain Research* 164:17-38.
- MOSKOWSKA A (1965). Contribution a l'étude du mécanisme de l'antagonisme épiphysio-hipophysaire. La sérotonine et la fonction gonadotrope. *Progress in Brain Research* 10:564-576.
- MUKHOPADHYAY AK, LEIDENBERGER FA, LICHTENBERG V (1979). A comparison of bioactivity and immunoactivity of luteinizing hormone stored in and released "in vitro" from pituitary glands of rats under various gonadal states. *Endocrinology* 104:925-931.
- MULLOY AL, MOBERG GP (1975). Effects of p-chlorophenylalanine and raphe lesions on diurnal prolactin release in the rat. *Federation Proceedings* 34:251 (Abstr).
- MUNARO NI (1978). The effect of ovarian steroids on hypothalamic 5-hydroxy tryptamine neuronal activity. *Neuroendocrinology* 26:270-276.
- NAIK DY (1975). Immunoreactive: LH-RH neurons in the hypothalamus identified by light and fluorescent microscopy. *Cell and Tissue Research* 157:423-436.
- NALBANDOV A (1976). The estrous cycle. En: *Reproductive physiology of animals and birds*. 3^{ed}. pag 122-134.
- NAUTA WJH, HAYMAKER W (1969). Hypothalamic nuclei and fiber connections. En: *The hypothalamus*. Haymaker W, Anderson E, Nauta WJH eds. Springfield III - pag 136-209.

- NECKERS LM, MEEK JL (1976). Measurement of 5-HT turnover rate in discrete nuclei of rat brain. *Life Sciences* 19:1579-1584.
- NEGRO-VILAR A (1982). The median eminence as a model to study presynaptic regulation of neural peptide release. *Peptides* 3:305-310.
- NEGRO-VILAR A, CHIOCCHIO SR, TRAMEZZANI JH (1977). Changes in catecholamine content of the median eminence precede the pro-oestrous surge of luteinizing hormone and prolactin. *Journal of Endocrinology* 75:339-340.
- NEGRO-VILAR A, OJEDA SR, McCANN SM (1979). Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals "in vitro". *Endocrinology* 104:1749-1757.
- NEQUIN LG, ALVAREZ J, SCHWARTZ NB (1979). Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4-day and 5-day estrous cycles in the rat. *Biology of Reproduction* 20:659-670.
- NIKOLICS K, MASON AJ, SZÖNYI E, RAMACHANDRAN J, SEEBURG PH (1985). A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. *Nature* 316:511-517.
- NILES LP, BROWN GM, GROTA LJ (1979). Role of the pineal gland in diurnal endocrine secretion and rhythm regulation. *Neuroendocrinology* 29:14-21.
- NISWENDER GD, MIDGLEY Jr AR, MONROE SE, REICHERT Jr LE (1968). Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with anti-ovine LH serum and ovine LH - ^{131}I . *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine* 128:807-811.
- NUÑEZ EA, GERSHON MD, SILVERMAN AJ (1981). Uptake of 5-hydroxytryptamine by gonadotrophs of the rat's pituitary: a combined immunocytochemical radioautographic analysis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29:1336-1346.
- ORCHI J, SHIMIZU K (1978). Occurrence of dopamine containing neurons in the midbrain raphe nuclei of the rat. *Neuroscience* 8:317-320.

- O'STEEN WK (1964). Serotonin suppression of luteinization in gonadotropin-treated immature rats. *Endocrinology* 74:885-888.
- O'STEEN WK (1965). Suppression of ovarian activity in immature rats by serotonin. *Endocrinology* 77:937-939.
- PALKA YS, RAMIREZ VD, SAWYER CH (1966). Distribution and biological effects of tritiated estradiol implanted in the hypothalamo-hypophysial region of female rats. *Endocrinology* 78:487-499.
- PALKOVITS M (1979). Effect of surgical deafferentation on the transmitter and hormone content of the hypothalamus. *Neuroendocrinology* 29:140-148.
- PALKOVITS M, ARIMURA A, BROWNSTEIN M, SCHALLY AV, SAAVEDRA JM (1974). Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) content of hypothalamic nuclei in rat. *Endocrinology* 95:534-558.
- PALKOVITS M, SAAVEDRA JM, JACOBOWITZ DM, KIZER JS, ZÁBOSZKY L, BROWNSTEIN MJ (1977 a). Serotonergic innervation of the forebrain: effect of lesions and serotonin and tryptophan hydroxylase levels. *Brain Research* 130:121-134.
- PALKOVITS M, LERÁNTH C, ZABORSKY L (1977 b). Electron microscope evidence of direct connections from the lower brain stem to the median eminence. *Brain Research* 136:339-344.
- PARENT A, DESCARRIES L, BEAUDET A (1981). Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of (3H) 5-hydroxytryptamine. *Neuroscience* 6:115-138.
- PASQUIER DA, KEMPE TL, FORBES WB, MORGANE PJ (1977). Dorsal raphe, substantia nigra and locus coeruleus: interconnections with each other and the neostriatum. *Brain Res Bulletin* 2:323-339.
- PASQUIER DA, VILLAR MJ (1983). A revision of the afferents to the dorsal nucleus. *Revista Boliviana de Investigación* 1:124-127.
- PAYETTE RF, GERSHON MD, NUÑEZ EA (1985). Serotonergic elements of the

- mammalian pituitary. *Endocrinology* 116:1933-1942.
- PELLEGRINO de IRALDI A, ZIEHER LM, JAIM-ETCHEVERRY G (1968). Neuronal compartmentation of 5-hydroxytryptamine stress. *Adv Pharmacology* 6A:257-270.
- PELLETIER G, LECLER R, DUBÉ D (1976). Immunocytochemical localization of hypothalamic hormones. *Journal of Histochemistry Cytochemistry* 24: 864-871.
- PEROUTKA SJ, SNYDER SH (1979). Multiple serotonin receptors: differential binding of (³H)-5 hydroxytryptamine, (³H)-Lysergic acid diethylamide and (³H)-spiroperidol. *Molecular pharmacology* 16:687-699.
- PEROUTKA SJ, SNYDER SH (1981). Two distinct central serotonin receptors with differential physiological functions. *Science* 215:827-829.
- PILOTE NS, PORTER JC (1979). Circulating luteinizing hormone and prolactin concentrations in intact or castrated male rats treated with 5-hydroxytryptamine. *Endocrinology* 105:875-878.
- POHL CR (1978). The radioenzymatic assay of serotonin. Tesis - Universidad de Rochester.
- POLKOWSKA J, JUSTISZ M (1979). Local changes in immunoreactive gonadotropin releasing hormone in the rat median eminence during the estrous cycle. Correlation with the pituitary luteinizing hormone. *Neuroendocrinology* 28:281-288.
- POPA GT, FIELDING V (1930). A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region. *Journal of Anatomy (London)* 65:88-91.
- PORTER JC, MICAL S, CRAMER OM (1971/72). Effect of serotonin and other indoles on the release of LH, FSH and prolactin. *Gynecol Investigation* 2:13-22.
- PRESLOCK JP (1984). The pineal gland: basic implications and clinical correlations. *Endocrine Reviews* 5:282-308.

- QUIJADA M, HILNER P, KRULICH L, McCANN SM (1973). The effect of catecholamines on hormone release from anterior pituitaries and ventral hypothalami incubated "in vitro". *Neuroendocrinology* 13:151-162.
- QUATTRONE A, SCHETINI G, ANNUNZIATO L, DI RENZO G (1981). Pharmacological evidence of supersensitivity of central serotonergic receptors involved in the control of prolactin secretion. *European Journal of Pharmacology* 76:9-13.
- QUAY WB (1968). Differences in circadian rhythms in 5-hydroxytryptamine according to brain region. *American Journal of Physiology* 215:1448-1453.
- RANCE N, WIDE PM, SELMANOFF MK, BARRACLOUGH CA (1981). Catecholamine turnover in discrete hypothalamic areas and associated changes in median eminence luteinizing hormone-releasing hormone and serum gonadotropins on proestrus and diestrus day 1. *Endocrinology* 108:1795-1801.
- RATNER A (1971). Effect of phenoxybenzamine on luteinizing hormone release in the female rat. *Proceedings of the Society of experimental Biology and Medicine* 138:995-998.
- REIGLE GD, MEITES J (1976). The effect of stress on serum prolactin in the female rat. *Proceedings of the Society of experimental Biology and Medicine* 152:441-448.
- REITER RJ (1980). The pineal gland and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Reviews* 1:109-131.
- RICHARDSON SB, PRASARD JA, HOLLANDER CS (1982). Acetylcholine, melatonin and K^+ depolarization stimulate release of LH-RH from rat hypothalamus "in vitro". *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 79:2686-2689.
- RIGGS BL, MALVEN PV (1974). Effects of intraventricular infusion of serotonin, norepinephrine and dopamine on spontaneous LH release in castrated male sheep. *Biology of Reproduction* 11:587-592.
- RISS W, BURSTEIN SD, JOHNSON RW (1963). Hippocampal or pyriform lobe damage in infancy and endocrine development of rats. *American*

Journal of Physiology 204:861-866.

RORKE EA, FAIRCLOTH GT, VAITUKAITIS JL (1984). Metabolism of luteinizing hormone by the pseudopregnant rat ovary. *Endocrinology* 115:962-968.

ROTZTEJN WH, CHARLI JL, PATTOU E, EPELBAUM J, KORDON C (1976). "In vitro" release of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) from rat mediobasal hypothalamus, effects of potassium calcium and dopamine. *Endocrinology* 99:1663-1666.

ROWLAND DL, STEELE MK, MOLTZ H (1978). Concentration and metabolism of serotonin in selected brain areas during pregnancy and lactation in the rat. *Neuroendocrinology* 27:25-31.

RUBINSTEIN L, SAWYER CH (1970). Role of catecholamines in the release of pituitary ovulating hormone(s) in rat. *Endocrinology* 86:988-995.

RUZSAS C, LIMONTA P, MARTINI L (1984). Role of serotonergic neurons in the control of gonadotrophins and prolactin secretion in the rat. *Journal of Endocrinology* 94:83-89.

RYU K, WILLIAMS JA, GALLO RV (1980). Studies on a possible pituitary effect of monoamines on luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Life Sciences* 27:1083-1087.

SAAVEDRA JM, BROWNSTEIN M, AXELROD J (1973). A specific and sensitive enzymatic isotopic microassay for serotonin in tissues. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* 186:508-514.

SAAVEDRA JM, PALKOVITS M, BROWNSTEIN M, AXELROD J (1974). Serotonin distribution in the nuclei of the rat hypothalamus and preoptic region. *Brain Research* 77:157-165.

SAAVEDRA JM, PALKOVITS M, KIZER JS, BROWNSTEIN M, ZIVIN JA (1975). Distribution of biogenic amines and related enzymes in the rat pituitary gland. *Journal of Neurochemistry* 25:257-260.

SAMSON WK, McCANN SM, CHUD L, DUDLEY CA, MOSS RL (1980). Intra and extrahypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH)

distribution in the rat with special reference to mesencephalic sites which contain both LH-RH and single neurons responsive to LH-RH. *Neuroendocrinology* 31:66-72.

SARKAR DK, FINK G (1980). Luteinizing hormone-releasing factor in pituitary stalk: effects of steroid. *Journal of Endocrinology* 86:511-520.

SARKAR DK, YEN SSC (1985). Changes in β -endorphin-like immunoreactivity in pituitary portal blood during the estrous cycle and after ovariectomy in rats. *Endocrinology* 116:2075-2079.

SARKAR DK, CHIAPPA SA, FINK G, SHERWOOD NM (1976). Gonadotropin-releasing hormone surge in proestrous rats. *Nature* 264:461-463.

SAWYER CH, MARKEE JE, HOLLINSHEAD WH (1947). Inhibition of ovulation in the rabbit by the adrenergic blocking agent dibenamine. *Endocrinology* 41:395-402.

SAWYER CH, MARKEE JE, TOWNSEND BF (1949). Cholinergic and adrenergic components in the neurohumoral control of the release of LH in the rabbit. *Endocrinology* 44:18-37.

SCHALLY AV, ARIMURA A, BABA Y, NAIR RMG, MATSUO H, REEDING TW, DEBELJUK L, WHITE WF (1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochemical and Biophysical Research communications* 43:393

SCHALLY AV, ARIMURA A, KASTIN AJ (1973). Hypothalamic regulatory hormones. *Science* 179:341-350.

SCHARRER E, SCHARRER B (1940). Secretory cells within the hypothalamus. *Res. Publ. Ass. new. Res.* 20:170-194.

SCHARRER E, SCHARRER B (1954). Hormones produced by neurosecretory cells. *Recent Progress in Hormone Research* 10:183-240.

SAWCHENKO PE, SWANSON LW, STEINBUSCH HWM, VERHOFSTAD AAJ (1983). The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Research* 277:355-360.

- SHELLER RH, KALDANY RR, KEINER T, MAHON AC, NAMBU JR, SCHAFFER M, TAUSSIG R (1984). Neuropeptides mediators of behavior in Aplysia. *Science* 225:1300-1307.
- SCHNEIDER HPG, McCANN SM (1969). Possible role of dopamine as transmitter to promote discharge of LH-releasing factor. *Endocrinology* 85:121-132.
- SCHNEIDER HPG, McCANN SM (1970). Mono and indoleamines and control of LH-secretion. *Endocrinology* 86:1127-1133.
- SCHNEIDER HPG, CRIGHTON DB, McCANN SM (1969). Suprachiasmatic LH-releasing factor. *Neuroendocrinology* 5:271-280.
- SEEBURG PH, ADELMAN JP (1984). Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone-releasing hormone. *Nature* 311:666-668.
- SELMANOFF MK, PRAMIK-HOLDAWAY MJ, WEINER RI (1976). Concentration of dopamine and norepinephrine in discrete hypothalamic nuclei during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 99:326-329.
- SELMANOFF MK (1981). The lateral and medial median eminence: distribution of dopamine, norepinephrine and luteinizing hormone-releasing hormone and the effect of prolactin on catecholamine turnover. *Endocrinology* 108:1716-1722.
- SELMANOFF MK, WISE PM, BARRACLOUGH CA (1980). Regional distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in the rat brain determined by microdissection and radioimmunoassay. *Brain Research* 192:421-432.
- SÉTÁLÓ G, FLERKÓ B, ARIMURA A, SCHALLY AV (1978). Brain cells as producers of releasing and inhibiting hormones. *Int Review of Cytology* 7:1-50.
- SÉTÁLÓ G, VIGH S, SCHALLY AV, ARIMURA A, FLERKÓ B (1975). LH-RH containing neural elements in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 96:135-142.

- SÉTÁLÓ G, VIGH S, SCHALLY AV, ARIMURA A, FLERKÓ B (1976a). Immunohistological study of the origin of LH-RH containing nerve fibers of the rat hypothalamus. *Brain Research* 103:597-602.
- SÉTÁLÓ G, VIGH S, SCHALLY AV, ARIMURA A, FLERKÓ B (1976b). Changing immunoreactivity of the LH-RH containing nerve terminals in the organum vasculosum of the lamina terminalis. *Acta Biol Acad Sc. Hung* 27:75-77.
- SHAMANESH M, JEFFCOATE SL (1976). Absence of an immunologically distinct-stimulating hormone releasing factor in rat stalk median eminence extracts. *Journal of Endocrinology* 68:89-94.
- SHEAVES R, LAYNES R, MACKINNON PCB (1984). Evidence that central epinephrine neurons participate in the control and regulation of neuroendocrine events during the estrous cycle. *Endocrinology* 116:542-546.
- SHERWOOD NM, CHIAPPA SA, FINK G (1976). Immunoreactive luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk blood from female rats: sex steroid modulation of response to electrical stimulation of preoptic area or median eminence. *Journal of Endocrinology* 70:501-511.
- SHIELDS PJ, ECCLESTONE D (1972). Effects of electrical stimulation of rat mid-brain on 5-hydroxytryptamine synthesis as determined by a sensitive radioisotope method. *Journal of Neurochemistry* 19:265-272.
- SHIVERS BD, HARLAN RE, MORRELL JI, PFAFF DW (1983). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone in male and female rat brains. *Neuroendocrinology* 36:1-12.
- SILVERMANN AJ, KREY LC (1978). The distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) neuronal network of the guinea pig brain I. Intra and extrahypothalamic projections. *Brain Research* 157:233-246.
- SILVERMANN AJ, ANTUNES JL, FERIN M, ZIMMERMANN EA (1977). The distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in the hypothalamus of the rhesus monkey. Light microscopic studies using immunoperoxidase technique. *Endocrinology* 101:134-142.

- SLADEK JR, SLADEK CO (1978). Localization of 5-HT within tanyocytes of the rat median eminence. *Cell and Tissue Research* 186:465-474.
- SMITH MS, FREEMAN ME, NEIL JP (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226.
- SNYDER SH (1984). *Neuroscience: an integrative discipline*. *Science* 225:1255-1257.
- SPINEDI E, NEGRO-VILAR A (1983). Serotonin and adrenocorticotropin release: direct effects at the anterior pituitary level and potentiation of arginine vasopressin-induced ACTH release. *Endocrinology* 112:1217-1223.
- STEINBUSCH HWM (1982). Serotonergic neurons in the central nervous system of the rat. Tesis Universidad de Nijmegen.
- STEINBUSCH HWM, NIEUWENHUYS R (1982a). The raphe nuclei of the rat brainstem: a cytoarchitectural and immunohistochemical study. *Chemical neuroanatomy*. Emerson P. Ed. Raven Press. N York.
- STEINBUSCH HWM, NIEUWENHUYS R (1982b). Localization of serotonin like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special references to the innervation of the hypothalamus. *Advances in experimental Medicine and Biology* 133:7-36.
- STEPHAN FK, ZUCKER I (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 69:1583-1586.
- TURGEON JL (1979). Estradiol-luteinizing hormone relationship during the proestrous gonadotropin surge. *Endocrinology* 105:731-736.
- TURGEON J, BARRACLOUGH CA (1973). Temporal patterns of LH release following graded preoptic electrochemical stimulation in

proestrous rats. *Endocrinology* 92:755-757.

TWAROG BM, PAGE IH (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and method for its determination. *Journal of Physiology (London)* 175:157-161.

TYLER JL, GORSKI RA (1980). Effects of corticomedial amygdala lesions or olfactory bulbectomy on LH response to ovarian steroids in the female rat. *Biology of Reproduction* 22:927-934.

UNGERSTEDT U (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta physiologica scandinavica. Suppl* 367:1-48.

van de KAR LD, LORENZ SA (1979). Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and median raphe nuclei. *Brain Research* 162:45-51.

van de KAR LD, BEHEA CL (1982). Pharmacological evidence that serotonergic stimulation of prolactin secretion is mediated via the dorsal raphe nucleus. *Neuroendocrinology* 35:225-230.

van de KAR LD, LORENZ SA, VODRASKA A, ALLERS G, GREEN M, van ORDEN, DE van ORDEN LS (1980). Effect of selective midbrain and diencephalic 5,7 dihydroxytryptamine lesions on serotonin content in individual preoptico-hypothalamic nuclei and on serum luteinizing hormone level. *Neuroendocrinology* 31:309-315.

van LOON GR, SHUM A, SOLE MJ (1981). Decreased brain serotonin turnover after short term (two-hour) adrenalectomy in rats: a comparison of four turnover methods. *Endocrinology* 108:1392-1402.

VELASCO ME (1972). Opposite effect of platinum and stainless steel lesions of the amigdala on gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology* 10:301-308.

VELASCO ME, TALEISNIK S (1969a). Effect of hippocampal stimulation on the release of gonadotropin. *Endocrinology* 85:1154-1159.

- VELASCO ME, TALEISNIK S (1969b). Release of gonadotropins induced by amigdaloid stimulation in the rat. *Endocrinology* 84:132-139
- VELASCO ME, TALEISNIK S (1971). Effect of the interruption of amigdaloid and hippocampal afferents to the medial hypothalamus on gonadotropin release. *Journal of Endocrinology* 51:41-55.
- VILLAR MJ, CHIOCCHIO SR, TRAMEZZANI JH (1984). Origin and termination of dorsal raphe-median eminence projection. *Brain Research* 324:165-170.
- VIJAYAN E, McCANN SM (1980). Effect of blockade of dopaminergic receptors on acetylcholine (Ach)- induced alterations of plasma gonadotropin and prolactin in conscious ovariectomized rats. *Brain Research Bull.* 5:23-29
- WALKER RF (1980). Serotonin neuroleptics change patterns of preovulatory secretion of luteinizing hormone in rats. *Life Sciences* 27:1063-1068.
- WALKER RF (1983). Quantitative and temporal aspects of serotonin's facilitatory action on phasic secretion of luteinizing hormone in female rats. *Neuroendocrinology* 36:468-474.
- WALKER RF, WILSON CA (1983). Changes in hypothalamic serotonin associated with amplification of LH surges by progesterone in rats. *Neuroendocrinology* 37:200-205.
- WALKER RF, McCAMANT S, TIMIRAS PS (1982). Melatonin and the influence of the pineal gland on timing of the LH surge in rats. *Neuroendocrinology* 35:37-42.
- WALOCH M, GILMAN D, WHITMOYER D, SAWYER CH (1981). The effect of stimulation and lesion of the raphe nuclei on luteinizing hormone release in estrogen-progesterone treated ovariectomized rats. *Brain Research* 217:305-313
- WEICH RF (1978). Acute effects of adrenergic receptors blocking drugs and neuroleptic agents on pulsatile discharge of luteinizing hormone in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 26:108-117

- WEINER RF, GANONG WF (1978). Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiological Reviews* 58:905-975.
- WEINER RI, PATTOU E, KERDELHUE B, KORDON C (1975). Differential effects of hypothalamic deafferentation upon luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis. *Endocrinology* 97:1597-1602.
- WENGER T, LEONARDELLI J (1980). Circadian and cyclic LH-RH variations in the organum vasculosum of the lamina terminalis of female and male rats. *Neuroendocrinology* 31:331-337.
- WESTLUND KN, CHILDS GV (1982). Localization of serotonin fibers in the rats adenohypophysis. *Endocrinology* 111:1761-1763.
- WHEATON JE, KRULICH L, McCANN SM (1975). Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the preoptic area and hypothalamus of the rat using radioimmunoassay. *Endocrinology* 97:30-36.
- WHITTEN WK, CHAMPLIN AK (1973). The role of olfactory in mammalian reproduction. *En Handbook of Physiology. Endocrinology vol 2/1* Greep and Astwood eds. pag 109-123.
- WIEGAND SJ, TERASAWA E (1982). Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology* 34:395-404.
- WILSON CA, McDONALD PG (1974). Inhibitory effect of serotonin on ovulation in adult rats. *Journal of Endocrinology* 60:253-260.
- WILSON CA, ENDERSBY CA (1979). The stimulatory effect and the role of paraventricular nucleus on PMS-induced ovulation in the immature rat. *Neuroendocrinology* 28:415-424.
- WILSON CA, MORTH CE, McNELLY A, McDONALD PG (1975). Effect of serotonin and progesterone on induced ovulation in immature mice. *Journal of Endocrinology* 64:337-347.

- WILSON CA, ANDREWS M, HADLEY JC, LEMON M, YEO T (1977). The role of hypothalamic serotonin (5-HT) before ovulation in immature rats treated with pregnant mare serum (PMS). *Psychoneuroendocrinology* 2:267-274.
- WILLIAMS JH, MIAL-ALLEN VM, KLINOWSKI M, AZMITIA E (1983). Effect of microinjections of 5,7 dihydroxytryptamine in the suprachiasmatic nuclei of the rat serotonin reuptake and the circadian variation of corticosterone levels. *Neuroendocrinology* 36:431-435.
- WIRZ-JUSTICE A, HACKMAN E (1972). Effect of oestradiol propionate and progesterone on monoamine uptake in rat brain. *Experientia* 28:736-740.
- WISE PM, RANCE N, BARR G, BARRACLOUGH CA (1979). Further evidence that luteinizing hormone-releasing hormone is also follicle stimulating hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 104:940-948.
- WISE PM, RANCE N, BARRACLOUGH CA (1981). Effects of estradiol and progesterone on catecholamine turnover rates indiscrete hypothalamic regions in ovariectomized rats. *Endocrinology* 108:2186-2193.
- WISLOSKI GB, KING LS (1936). The permeability of the hypophysis and hypothalamus to vital dyes with the study of the hypophyseal portal supply. *American Journal of Anatomy* 58:421-472.
- WITKIN JM, PADEN CM, SILVERMANN AJ (1982). The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology* 35:429-438.
- WUTTKE W, BJÖRKLUND A, BAUMGARTEN HG, LACHENMAYER L, FENSKE M, KLEMM HP (1977). De- and regeneration of brain serotonin neurons following 5,7-dihydroxytryptamine treatment: effects on serum LH, FSH and PRL levels in male rats. *Brain Research* 134:317-331.
- YING S-Y, GREEP RO (1973). Inhibition of ovulation by melatonin in the cyclic rat. *Endocrinology* 92:333-335.
- ZAMORA AJ, RAMIREZ VD (1982). Ultrastructure of the rat median eminence after superfusion. *Cell and Tissue Research* 226:27-32.

ZOLOVICK AJ, LABHSETWAR AP (1973). Evidence for the theory of dual hypothalamic control of ovulation. *Nature* 245:158-159.

ZOLOVICK AJ, PEARCE R, BOEHLKE KW, ELEFThERION BE (1966). Monoamine oxidase activity in various parts of the rat brain during the estrous cycle. *Science* 154:649-651.

INDICE GENERAL

<u>COMENTARIOS PRELIMINARES</u>	6
1. <u>ANTECEDENTES HISTORICOS</u>	8
1.1. <u>HORMONA HIPOTALAMICA LIBERADORA DE LH</u>	12
1.1.1. Biosíntesis y catabolismo	
1.1.2. Localización en el sistema nervioso central	
1.1.3. Control nervioso de la secreción de LH-RH	
1.2. <u>SEROTONINA</u>	27
1.2.1. Biosíntesis y catabolismo	
1.2.2. Distribución en el sistema nervioso central, con especial referencia al hipotálamo, y en la glándula hipofisaria	
1.3. <u>EVIDENCIAS EXPERIMENTALES SOBRE LA PARTICIPACION DE LA SEROTONINA EN LA REGULACION DE LA SECRECION DE LH</u>	35
1.3.1. Experimentos farmacológicos	
1.3.1.1. Efecto de la serotonina y precursores	
1.3.1.2. Inhibición de la síntesis, degradación y recaptación neuronal de la serotonina	
1.3.1.3. Utilización de agonistas y antagonistas serotoninérgicos	
1.3.2. Estimulaciones eléctricas y lesiones del sistema serotoninérgico	

1.3.3. Alteraciones del metabolismo de la serotonina asociadas a la secreción del LH	
2. <u>OBJETIVOS</u>	50
3. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	52
3.1. <u>TECNICAS UTILIZADAS</u>	52
3.1.1. Radioinmunoensayo	
3.1.1.1. Gonadotrofinas y prolactina	
3.1.1.2. Hormona hipotalámica liberadora de LH	
3.1.2. Dosaje de serotonina	
3.1.2.1. Método radioenzimático	
3.1.2.2. Método cromatográfico (cromatografía líquida de alta presión)	
3.1.3. Determinación de la actividad del sistema serotoninérgico	
3.2. <u>MODELOS EXPERIMENTALES Y OBTENCION DE LAS MUESTRAS</u>	65
3.2.1. Experimentos "in vivo": Alteraciones del metabolismo de la serotonina durante el ciclo estral	
Generalidades	
Parte experimental	
3.2.2. Experimentos "in vitro": Efecto de la serotonina sobre la secreción "in vitro" de LH	
Generalidades	
Parte experimental	

3.2.3. Lesión del núcleo dorsal del rafe. Sus consecuencias sobre el ciclo estral y la secreción de las gonadotrofinas y prolactina	
Generalidades	
Parte experimental	
4. <u>ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE LA SEROTONINA</u> <u>DURANTE EL CICLO ESTRAL</u>	84
4.1. Resultados	
4.2. Discusión	
5. <u>EFEECTO DE LA SEROTONINA SOBRE LA SECRECION</u> <u>"in vitro" DE LH</u>	101
5.1. Resultados	
5.2. Discusión	
6. <u>LESION DEL NUCLEO DORSAL DEL RAPE.</u> <u>SUS CONSECUENCIAS SOBRE EL CICLO ESTRAL Y LA</u> <u>SECRECION DE LAS GONADOTROFINAS Y PROLACTINA</u>	127
6.1. Resultados	
6.2. Discusión	
7. <u>CONCLUSION</u>	148
8. <u>ABREVIATURAS</u>	153
9. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	155

