

Tesis de Posgrado

Serotonina y péptido intestinal vasoactivo : Su participación en la regulación de la liberación de prolactina

Parisi, María de las Nieves

1987

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:

Parisi, María de las Nieves. (1987). Serotonina y péptido intestinal vasoactivo : Su participación en la regulación de la liberación de prolactina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2090_Parisi.pdf

Cita tipo Chicago:

Parisi, María de las Nieves. "Serotonina y péptido intestinal vasoactivo : Su participación en la regulación de la liberación de prolactina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2090_Parisi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

SEROTONINA Y PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO:
SU PARTICIPACION EN LA REGULACION
DE LA LIBERACION DE PROLACTINA.

AUTOR: MARIA DE LAS NIEVES PARISI
DIRECTOR: DRA. SARA R. CHIOCCHIO
LUGAR DE TRABAJO: INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

-- 1987 --

2090-
y 2

Pabl
Juan

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Sara Chiochio, por su dedicación. Por las invaluable horas consagradas a mi formación. Por su calidez y comprensión. Por el eximio ser humano que alienta en ella.

- A María Leiza Vitale, por las largas horas de laboratorio compartidas. Por su apoyo, estímulo y espíritu crítico.

- A Carmen de Vincenzo de Rodríguez e Isabel L. de Farías, por su inestimable y excelente cooperación en el trabajo. Por su compañerismo.

- A Marcelo Villar, por su generosa y amplia colaboración en la realización de los experimentos.

- Al Dr. Juan Tramezzani, por brindarme un lugar para desarrollar las investigaciones que posibilitaron esta Tesis.

- A los Dres. Alcira Aragonés y Carlos Lantos, por su desinteresado asesoramiento.

- A mis compañeros del IDNEU, por estar.

- Al CONICET, por otorgarme las becas que permitieron llevar a cabo este trabajo.

- A todos aquellos que han contribuido a mi formación humana y profesional.

- A mi esposo, padres y hermanos, por su paciencia y apoyo incondicional. Por soportarme.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| <u>ABREVIATURAS</u> | 11 |
| <u>NOTA PRELIMINAR</u> | 14 |
| <u>1. INTRODUCCION</u> | 17 |
| <u>1.1. PROLACTINA</u> | 18 |
| 1.1.1. Generalidades | |
| 1.1.2. Estructura | |
| 1.1.3. La célula lactotropa | |
| 1.1.4. Secreción de PRL en estadios fisiológicos | |
| 1.1.4.1. Ciclo estral | |
| 1.1.4.2. Preñez y pseudopreñez | |
| 1.1.4.3. Lactancia | |
| 1.1.4.4. Estrés | |
| 1.1.5. Regulación de la secreción | |
| 1.1.5.1. Control hipotalámico | |
| 1.1.5.2. Inhibición de la liberación de PRL | |
| 1.1.5.3. Hormonas liberadoras de PRL | |
| 1.1.5.4. Neurotransmisores hipotalámicos y liberación de PRL | |
| 1.1.5.5. Esteroides ováricos | |
| 1.1.5.6. Autorregulación de la secreción de PRL | |
| <u>1.2. SEROTONINA</u> | 33 |
| 1.2.1. Generalidades | |
| 1.2.2. Biosíntesis y catabolismo | |

1.2.3. Distribución

1.2.3.1. Núcleos del rafe del tronco cerebral. Hipotálamo

1.2.3.2. Hipófisis

1.2.4. Control serotoninérgico de la liberación de PRL.

1.2.4.1. Manipulaciones farmacológicas que estimulan la liberación de PRL.

a. Administración de 5-HT y precursores.

b. Drogas que aumentan los niveles de 5-HT en la sinapsis.

c. Agonistas serotoninérgicos.

d. Estimulación de los núcleos del rafe.

1.2.4.2. Manipulaciones farmacológicas que inhiben la secreción de PRL.

a. Inhibición de la síntesis de serotonina

b. Bloqueantes de receptores serotoninérgicos.

c. Neurotoxinas serotoninérgicas.

d. Lesiones de los núcleos del rafe.

1.2.5. Posibles mecanismos de acción de serotonina sobre la secreción de PRL.

1.3. PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)

51

1.3.1. Generalidades

1.3.2. Estructura-Biosíntesis.

1.3.3. Localización en el SNC, hipófisis y sangre portal. Localización subcelular.

1.3.4. Efectos del VIP sobre la liberación de prolactina

1.3.4.1. Evidencias experimentales

1.3.4.2. Sitio de acción

2. OBJETIVOS.

60

| | |
|---|-----|
| 3. <u>MATERIALES Y METODOS.</u> | 63 |
| 3.1. <u>TECNICAS EMPLEADAS.</u> | 64 |
| 3.1.1. Determinaciones radioinmunológicas | |
| 3.1.1.1. Hormonas hipofisarias | |
| a. Dosaje de PRL, FSH, TSH, GH y LH | |
| b. Dosaje de ACTH | |
| 3.1.1.2. Péptido intestinal vasoactivo (VIP) | |
| 3.1.2. Dosaje de serotonina | |
| 3.1.2.1. Método radioenzimático | |
| 3.1.2.2. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección electroquímica. | |
| 3.1.3. Técnica de microdissección de áreas cerebrales | |
| 3.1.3.1. El hipotálamo | |
| 3.1.3.2. Núcleos dorsal y mediano del rafe | |
| 3.2. <u>MODELO EXPERIMENTAL</u> | 94 |
| 4. <u>PERFIL HORMONAL DE LA RATA LACTANTE</u> | 96 |
| 4.1. Objetivos | |
| 4.2. Parte experimental | |
| 4.3. Resultados | |
| 4.4. Discusión | |
| 5. <u>PARTICIPACION DE LA SEROTONINA EN LA DESCARGA DE PRL INDUCIDA POR LA SUCCION.</u> | 107 |
| 5.1. <u>SEROTONINA E HIPOFISIS</u> | 108 |

| | |
|---|-----|
| 5.1.1. Objetivos. | |
| 5.1.2. Parte experimental | |
| 5.1.3. Resultados | |
| 5.1.4. Discusión | |
| 5.2. <u>EFFECTOS DE LA SUCCION SOBRE LA CONCENTRACION DE 5-HT Y 5-HIA EN AREAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</u> | 113 |
| 5.2.1. Objetivos | |
| 5.2.2. Parte experimental | |
| 5.2.3. Resultados | |
| 5.2.4. Discusión | |
| 6. <u>SECTOR ROSTRAL DEL NUCLEO HIPOTALAMICO ANTERIOR: EFFECTO DE LESIONES.</u> | 125 |
| 6.1. Objetivos | |
| 6.2. Parte experimental | |
| 6.3. Resultados | |
| 6.3.1. Control histológico | |
| 6.3.2. Efecto de las lesiones del rNHA sobre el cre- cimiento de las crías | |
| 6.3.3. Efecto de las lesiones del rNHA sobre la res- puesta hormonal de la succión | |
| 6.4. Discusión | |
| 7. <u>EFFECTOS DE LA SUCCION SOBRE LA CONCENTRACION DE VIP EN AREAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.</u> | 140 |

7.1. **Objetivos**

7.2. **Parte experimental**

7.3. **Resultados**

7.4. **Discusión**

8. **CONCLUSIONES**

9. **BIBLIOGRAFIA**

ABREVIATURAS

| | |
|---------|---------------------------------------|
| A | Acueducto de Silvio |
| AcCoA | Acetil Coenzima A |
| ACTH | Adrenocorticotrofina |
| AH | Anterohipófisis |
| CA | Comisura anterior |
| CO | Quiasma óptico |
| DA | Dopamina |
| 5,7-DHT | 5,7-Dihidroxitriptamina |
| DMI | Desmetilimipramina |
| EM | Eminencia media |
| F | Fornix |
| FSH | Hormona folículoestimulante |
| GABA | Acido gamma-aminobutírico |
| GIP | Péptido inhibidor gástrico |
| GH | Hormona de crecimiento |
| 5-HIA | Acido 5-hidroxiindol-3-acético |
| HIOMT | Hidroxiindol-0-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 |

| | |
|-------|---|
| MB | Cuerpos mamilares |
| MFB | Fascículo prosencefálico medial |
| MSH | Hormona melanocitoestimulante |
| n | Núcleo |
| NA | Núcleo arcuato |
| NAS | N-acetil serotonina |
| NAT | N-acetil transferasa |
| NDM | Núcleo dorsomediano |
| NDR | Núcleo dorsal del rafe |
| cNHA | Sector caudal del núcleo hipotalámico anterior |
| rNHA | Sector rostral del núcleo hipotalámico anterior |
| NHP | Núcleo hipotalámico posterior |
| NI ST | Núcleo intersticial de la "stria terminalis" |
| NMR | Núcleo mediano del rafe |
| NMS | N-metil serotonina |
| NPE | Núcleo periventricular |
| NPMD | Núcleo premamilar dorsal |
| NPMV | Núcleo premamilar ventral |
| NPV | Núcleo paraventricular |
| NSC | Núcleo supraquiasmático |
| NSO | Núcleo supraóptico |
| NVM | Núcleo ventromediano |
| PCPA | p-Cloro-fenilalanina |

| | |
|-----|--------------------------------------|
| PHI | Péptido histidina isoleucina |
| PIF | Factor inhibidor de prolactina |
| PN | "Pars nervosa" |
| POM | Area medial preóptica |
| PRF | Factor liberador de prolactina |
| PRL | Prolactina |
| RIA | Radioinmunoanálisis |
| SAM | S-Adenosil metionina |
| SNC | Sistema nervioso central |
| TD | Núcleo de la banda diagonal de Broca |
| TRH | Hormona liberadora de tirotrófina |
| Trp | L-Triptofano |
| TSH | Tirotrófina |
| VIP | Polipéptido intestinal vasoactivo |
| ZI | Zona incerta |

NOTA PRELIMINAR

Existe una extensa bibliografía que apoya la hipótesis de que la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) participa en el control de la liberación de prolactina (PRL). Aun cuando la mayoría de los argumentos son farmacológicos, todos coinciden en que la 5-HT estimula su secreción. No obstante, no se conocen los mecanismos y sitio/s de acción a través de los cuales esta amina regula dicha descarga.

La presencia de serotonina en la hipófisis anterior avala una posible función de esta indolamina en el control de la secreción de trofinas hipofisarias. Aunque aún no se sabe en qué células se encuentra ni a qué estructura subcelular está ligada.

Por otra parte, en el sistema nervioso central existen tractos serotoninérgicos cuyos cuerpos neuronales se localizan principalmente en el mesencéfalo. Al respecto, experimentos farmacológicos sugieren que uno de esos núcleos, el núcleo dorsal del rafe, estaría involucrado en la regulación de la secreción de PRL. Los núcleos dorsal y mediano del rafe constituyen el principal origen de las fibras que inervan el hipotálamo, que ha sido propuesto como sitio efector de tal control. La serotonina podría actuar a nivel hipotalámico estimulando a un factor liberador de PRL (PRF).

Actualmente, un número creciente de observaciones postu-

lan al péptido intestinal vasoactivo (VIP) como PRF. Está localizado en el sistema nervioso central, en terminales del hipotálamo mediobasal y se ha descrito una vía intrahipotalámica conteniendo VIP. La presencia de VIP en el hipotálamo y en los vasos porta hipofisarios en una concentración mayor que en la sangre periférica, hicieron suponer que podría participar en la regulación de la secreción de hormonas hipofisarias.

VIP estimula la liberación de PRL "in vivo" e "in vitro" y fue identificado en las células prolactotropas de hipófisis de rata.

Aunque no se conoce el mecanismo que regula la liberación de VIP del hipotálamo, una serie de hechos señalan que la serotonina estaría involucrada en el mismo.

Los argumentos hasta aquí expuestos nos llevaron a investigar la participación de la 5-HT y del VIP en el control de la secreción de PRL en la rata lactante. Este modelo permite estudiar los mecanismos nerviosos que controlan la descarga de PRL frente a un estímulo natural como es la succión.

La succión del pezón determina una rápida liberación de PRL que produce un aumento de sus niveles plasmáticos antes de los 5 minutos. Por otro lado, cuando a una rata lactante se la separa de sus crías, la PRL cae a niveles basales. La reposición de las crías y la consecuente succión por parte de ellas causa un aumento de la PRL circulante de la madre.

Utilizando este modelo nos proponemos:

1) Encontrar un tiempo de succión que permita la disociación de la descarga de PRL de las modificaciones en la secreción de otras hormonas anterohipofisarias.

2) Localizar el sitio/s de acción de la 5-HT sobre la liberación de PRL.

3) Determinar la relevancia fisiológica de dicho neurotransmisor en la regulación de la secreción de PRL.

4) Investigar la participación del VIP a través de cambios de su contenido en áreas del sistema nervioso central asociadas al control de la descarga de PRL.

I. INTRODUCCION

1.1. PROLACTINA

1.1.1. Generalidades

La prolactina (PRL) es la hormona más importante en la iniciación y el mantenimiento de la lactancia. Su actividad lactogénica fue detectada por primera vez en el año 1928 por Stricker y Grueter, quienes descubrieron en los extractos hipofisarios un principio activo capaz de inducir la actividad secretora de la glándula mamaria del conejo pseudopreñado. Años después quedó demostrada su importancia como reguladora de funciones reproductivas en mamíferos y aves (Meites y Nicoll, 1966; Nicoll, 1974).

Además de sus efectos sobre la glándula mamaria tiene una acción luteotrófica en algunas especies de mamíferos. La prolactina y la hormona luteinizante (LH) mantienen la secreción de esteroides del cuerpo amarillo, particularmente progesterona; aumentan la disponibilidad de esteres del colesterol y el número de receptores de LH en los folículos en crecimiento. La prolactina "per se" puede estimular la secreción de progesterona por las células granulosas en los folículos y por el cuerpo amarillo en la rata y el cerdo (ver revisión de Murphy y Rajkumar, 1985).

Evidencias experimentales agregaron otras funciones significativas a la PRL, que han sido clasificadas en los siguientes grupos: 1) acciones sobre el equilibrio iónico (osmorregulación), 2) acciones en relación con la reproducción, 3) acciones en relación con el crecimiento y desarro-

llo, 4) efectos metabólicos, 5) efectos sobre estructuras ectodérmicas y 6) acciones modulatorias de las hormonas esteroideas (Nicoll, 1980; Houdebine, 1983).

1.1.2. Estructura

La PRL, la hormona de crecimiento (GH) y el lactógeno placentario parecen tener su origen en un gen ancestral común. Esta hipótesis se originó en varias líneas de evidencias: la superposición de propiedades biológicas e inmunológicas (Santomé y Dellacha, 1985), la similitud en las secuencias de aminoácidos y la homología de las secuencias de nucleótidos en sus genes estructurales (Cooke y col., 1981). A pesar de la homología de las secuencias de aminoácidos, la prolactina conservó características estructurales que la distinguen de las somatotrofinas y sus homólogos placentarios (Doneen y col., 1979; Nicoll, 1982).

La aplicación de la electroforesis y la cromatografía en gel al estudio de las hormonas hipofisarias permitió descubrir que la PRL, como la GH, no es una sustancia única sino una familia de hormonas (variantes moleculares) (Lewis, 1984).

Originalmente, este polimorfismo de la PRL se refería a formas con diferentes tamaños moleculares, denominadas "pequeña", "grande" y "muy grande", que correspondían respectivamente al monómero, dímero-trímero y agregados gruesos de PRL (Rogol y Rozen, 1974; Suh y Frantz, 1974;

Farkouh y col., 1979; Lawson y Stevens, 1980; Sinha, 1980). Sin embargo, estudios más recientes han mostrado la existencia de complejidad en la estructura bioquímica de la molécula de PRL monomérica: formas desamidadas, glicosiladas, clivadas, con inmunorreactividad y actividad biológica diferentes (Mitra, 1980 I y II; Sinha y Gilligan, 1981, 1984; Lewis y col., 1984, 1985; Haro y Talamantes, 1985 I y II).

1.1.3. La célula lactotropa.

Hasta hace pocos años se admitía la existencia de un único tipo de células proláctínicas o lactotropas que se identificaban por las características ultraestructurales de sus gránulos: grandes -entre 300 y 700 nm- y polimórficos. Sin embargo, estudios más recientes muestran la existencia de más de un tipo celular de lactotropas en base a sus características morfológicas e inmunohistoquímicas (Sato, 1980; Nogami y Yoshimura, 1982). Más aún, Gallardo y colaboradores (1984) mostraron que existe más de un tipo de células lactotropas en base a su afinidad por la dopamina (DA).

1.1.4. Secreción de PRL y estadios fisiológicos.

1.1.4.1. Ciclo estral.

El perfil de la secreción de PRL durante el ciclo estral de la rata se caracteriza por niveles bajos, excepto en la tarde y noche del proestro. Cuando las ratas se mantienen en un régimen de 12 horas de luz por día (8.00 a 20.00 horas),

La descarga de PRL comienza alrededor de las 16.00 hs. y alcanza sus valores máximos durante la noche del mismo día, para volver a sus niveles basales en la mañana del estro. Algunos autores han descrito una descarga de PRL de menor magnitud en la tarde del estro (Neill, 1974; Chiocchio y col. 1980).

La descarga de PRL del proestro está asociada a los niveles en ascenso de los estrógenos secretados por los folículos pre ovulatorios durante el estadio precedente (diestro 2). La administración de anticuerpos a estrógenos en el mediodía del diestro 2 inhibe la descarga de PRL del proestro (Neill y col. 1971).

1.1.4.2. Preñez y pseudopreñez.

El ciclo estral de los roedores carece de fase luteal. Sin embargo la cópula o estimulación equivalente aplicada al cuello uterino induce una secreción prolongada de progesterona por el cuerpo amarillo. Cuando la cópula es fértil, la progesterona prepara la mucosa uterina para la implantación del blastocisto y el posterior desarrollo de la preñez.

En ausencia de óvulos fertilizados, el cuerpo amarillo persiste alrededor de 12 días después de la ovulación. Este período de actividad luteal se denomina pseudopreñez.

En la rata, la actividad del cuerpo amarillo depende de la PRL (ver revisión de Rotchild, 1981). La PRL se segrega en descargas diurnas y nocturnas durante la pseudopreñez y la primera mitad de la preñez. Estas descargas inducen altos nive-

les de progesterona (Smith, 1980).

Contrariamente a lo que sucede con las descargas de PRL inducidas por los estrógenos (proestro), aquellas provocadas por la cópula no dependen de las hormonas ováricas ya que se producen también en ratas ovariectomizadas.

El perfil de secreción de PRL durante la preñez y la pseudopreñez y sus aspectos neuroendócrinos han sido analizados en profundidad por Gunnet y Freeman (1983).

1.1.4.3. Lactancia.

La PRL es esencial para la iniciación y el mantenimiento de la lactancia. Actúa directamente sobre el alvéolo de la glándula mamaria para promover la síntesis y secreción de las proteínas de la leche.

La secreción de PRL durante la lactancia se mantiene por la frecuente aplicación de la succión, que es el estímulo natural más poderoso para la liberación de PRL (Neill, 1974). A los pocos minutos de comenzada los niveles de PRL aumentan entre 30 y 50 veces, para disminuir rápidamente después de la separación de las crías (Mattheij y col, 1979; Chiocchio y col., 1979; Nagy y Halász, 1983). La cantidad de PRL liberada depende de la intensidad y duración de la succión y del tiempo transcurrido entre los episodios de la misma (Grosvenor y col, 1967; Subramanian y Reece, 1975, Grosvenor y col. 1979 a y b).

El estímulo de succión representa un clásico reflejo neuroendócrino; origina impulsos nerviosos que parten de receptores sensoriales en el pezón, ascienden por la médula espinal a través del mesencéfalo y llegan al hipotálamo (Poulain y Wakerley, 1986).

Además de PRL la succión estimula la liberación de ocitocina, que es la responsable de la eyeción de leche (Lincoln y col, 1973).

1.1.4.4. Estrés

Es un hecho bien conocido que no solo los estímulos agresivos sino el manoseo o la transferencia de las ratas de un cuarto a otro, aumentan los niveles basales de PRL (Riegler y Meites, 1976, Muir y Pfister, 1986). El tratamiento con estrógenos aumentaría la sensibilidad a dichos estímulos (Mattheij y Pijkeren, 1977). Por otra parte, tanto ratas machos como hembras parecen ser igualmente sensibles al estrés (Caligaris y Taleisnik, 1983).

No se conoce aún el mecanismo por el cual el estrés induce un aumento rápido de los niveles de PRL. La descarga producida por el estrés con éter, comienza luego de un período de latencia más corto que la inducida por la succión (Terkel y col., 1972).

Parece ser que la liberación de PRL provocada por los estímulos succión y estrés, está mediada por diferentes mecanismos (Abe y col, 1985). Por ejemplo se encontró que la admi-

ministración de suero anti VIP inhibe completamente la descarga de PRL inducida por el estrés con éter, mientras que lo hace solo parcialmente con la de la succión (Abe y col., 1985).

1.1.5. Regulación de la secreción.

1.1.5.1. Control hipotalámico.

El hipotálamo inhibe la secreción de PRL. Sin embargo, actualmente se conoce que también puede estimular su liberación (Neill, 1980).

La inhibición hipotalámica es conocida desde la década del 40. Entonces se obtuvieron las primeras evidencias de que la separación de la hipófisis del hipotálamo por sección del tallo hipofisario (Jacobsohn, 1954) o su trasplante debajo de la cápsula renal (Declin 1949, 1950) conducía a un aumento de la secreción de PRL. Estos estudios fueron ampliados por Everett (1954, 1956) y Nikitovich-Winer y Everett (1958) utilizando ratas con trasplante hipofisario.

El agregado de extractos hipotalámicos a hipófisis incubadas "in vitro" disminuye la liberación de PRL (Talwalker y col., 1963) mientras que la lesión de hipotálamo mediobasal resultaba en un aumento de su secreción (Chen y col., 1970; Bishop y col., 1972). Esta actividad inhibitoria del hipotálamo fue atribuída a las catecolaminas, desde que varios autores encontraron que al agregarlas se inhibía la liberación de PRL al medio de incubación (MacLeod, 1969; Birge y col., 1970; Koch y col., 1970).

1.1.5.2. Inhibición de la liberación de prolactina.

Datos provenientes de experimentos farmacológicos mostraron que todas las drogas que aumentan los niveles de catecolaminas en el hipotálamo, disminuyen la liberación de PRL y viceversa: la inhibición de la biosíntesis de catecolaminas, lleva a un aumento de PRL. (Ver revisión de Weiner y Ganong, 1978).

La dopamina fue considerada la principal responsable del efecto inhibitorio de las catecolaminas. Inhibía la secreción de PRL "in vitro" (Shaar y Clemens, 1974; MacLeod y Lehmeyer, 1974) e "in vivo" cuando se inyectaba en el tercer ventrículo (Kamberi y col., 1971 b) o directamente en los vasos porta hipofisarios (Takahara y col., 1974).

Posteriormente, se describieron receptores dopaminérgicos en la hipófisis anterior (Brown y col., 1976).

La presencia de neuronas dopaminérgicas en el hipotálamo, con terminaciones nerviosas sobre los vasos porta (Moore y Demarest, 1982), dio origen a la siguiente teoría: "La dopamina sintetizada en las neuronas del sistema tuberoinfundibular, se libera desde los terminales de la eminencia media a la sangre de los vasos porta, que la transportan a la hipófisis anterior donde actúa sobre los receptores dopaminérgicos para inhibir la liberación de PRL."

Esta teoría se confirmó cuando Ben-Jonathan y colaboradores (1977) encontraron dopamina en la sangre de los vasos porta en mayor concentración que en la circulación sistémica.

Sin embargo, la presencia de DA en la hipófisis anterior (Saavedra y col., 1975) sugirió un mecanismo de acción adicional para la DA: actuaría regulando la liberación de PRL a nivel intracelular.

En diferentes situaciones endócrinas se encontró una correlación negativa entre los niveles de DA en la hipófisis anterior y las concentraciones de PRL en sangre (Chiocchio y col., 1979, 1980). Luego de su unión al receptor la dopamina se internalizaría en las lactotropas hipofisarias (Gudelsky y col., 1980) y llegaría a los gránulos prolactínicos donde se la ha localizado con técnicas histoquímicas (Gallardo y col., 1984).

Aparentemente, la DA no se sintetiza en la anterohipófisis (Iturriza y col., 1983), sino que sería transportada por los vasos porta desde la eminencia media y el lóbulo neural a las células prolactínicas (Ben-Jonathan, 1985).

Actualmente es un hecho ampliamente aceptado que la dopamina es un factor fisiológico que inhibe la liberación de PRL (PIF, del inglés: Prolactin Inhibiting Factor), aún cuando se duda que sea la única responsable de la inhibición hipotálamica.

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) puede inhibir la liberación de prolactina. Se sintetiza en el sistema nervioso central (SNC) y es transportado a la hipófisis donde se une a sitios específicos (Apud y col., 1981) e inhibe la liberación de PRL (Grossman y col., 1981). (Ver Revisión de Greef y van der Schoot, 1985) .

Se han publicado evidencias de la existencia de un factor inhibidor no dopaminérgico, no gabaérgico, posiblemente peptídico (Mizunuma y col., 1985). Recientemente se encontró que un péptido de 56 aminoácidos, contenido en la proteína precursora de la hormona hipotalámica liberadora de LH(LH-RH, del inglés: Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) inhibía la liberación basal de PRL cuando se agregaba a un cultivo de células hipofisarias (Nikolics y col., 1985). Se lo conoce como GAP (del inglés: Gonadotrophin Releasing Hormone Associated Peptide) y se lo ha localizado en varias áreas cerebrales, incluyendo áreas hipotalámicas, encontrándose una superposición espacial con la distribución de LH-RH (Phillips y col., 1985).

La administración de suero antiGAP induce un aumento significativo de los niveles plasmáticos de PRL (Nikolics y col., 1985). Sin embargo no existen aún las evidencias para considerar su participación en la regulación de PRL.

1.1.5.3. Hormonas liberadoras de prolactina.

Nicoll y col., (1970) encontraron que extractos hipotalámicos estimulaban la liberación de PRL "in vitro", luego de un período inicial de inhibición. De allí en adelante hay varios estudios "in vivo" e "in vitro" que sugieren que el hipotálamo contiene uno o más factores liberadores de PRL (PRF, del inglés: Prolactin Releasing Factor) (Valverde-R y col., 1972; Milmore y Reece, 1975; Boyd y col., 1976). Sin embargo

su estructura química no se conoce aún.

Varias sustancias encontradas en el hipotálamo han sido propuestas como hormonas hipotalámicas involucradas en la liberación de PRL con una acción directa sobre la hipófisis.

La hormona liberadora de tirotrófina (TRH, del inglés: Thyrotropin Releasing Hormone) estimula la liberación de PRL y está presente en la sangre del tallo hipofisario en mayores concentraciones que en la sangre periférica (Greef y Visser, 1981; Ching y Utiger, 1983; Sheward y col., 1983). Sin embargo algunos estudios cuestionan que el TRH tenga un rol fisiológico en la descarga de PRL del proestro y la inducida por la succión en ratas lactantes (Harris y col., 1978; Koch y col., 1977; Riskind y col., 1984 b).

Recientemente, ha comenzado a surgir un número creciente de evidencias que postulan al polipéptido intestinal vasoactivo (VIP, del inglés: Vasoactive Intestinal Polypeptide) como un probable factor liberador fisiológico de PRL. (Ver más adelante, sección 3 de la Introducción).

Otro péptido hipotalámico presente en los vasos porta (Shimatsu y col., 1983 a) y que estimula la secreción de PRL es el PHI (péptido histidina isoleucina amida) (Werner y col., 1983; Samson y col., 1983; Kaji y col., 1984). Este péptido presenta una homología estructural con el VIP y en menor proporción con la secretina, glucagon y GIP. Se aisló del intestino de porcino (Tatemoto y Mutt, 1980, 1981); más tarde, Hökfelt y colaboradores (1982 a, 1983) describieron una

densa red de fibras de PHI en la capa externa de la eminencia media, cuyos cuerpos neuronales se encuentran en el núcleo paraventricular.

Aún cuando el anti PHI disminuye la liberación de PRL en respuesta al estrés, su rol como un liberador fisiológico de PRL no está demostrado aún (Kaji y col., 1985).

Otros péptidos hipotalámicos como la ocitocina, bombesina, sustancia P, angiotensina II, colecistokinina y neurotensina poseen actividad liberadora de PRL; pero aún no se ha determinado su significado fisiológico (Ver revisión de Greef y van der Schoot, 1985).

1.1.5.4. Neurotransmisores hipotalámicos y liberación de PRL.

Hay varios neurotransmisores hipotalámicos que han mostrado alterar la liberación de PRL. Estos incluyen a las catecolaminas (Maanen y Smelik, 1968), acetilcolina (Gibbs y col., 1979), histamina (Donoso y col., 1983; Alvarez, 1984), glicina (Banzan y Donoso, 1983) y péptidos opioides (Cocchi y col., 1977 a; Rivier y col., 1977; Haskins y col., 1981).

Existe una amplia bibliografía que sugiere que la serotonina está involucrada en la liberación de PRL. Todas las evidencias experimentales le atribuyen un rol estimulatorio, ya que cada vez que se activan las vías serotoninérgicas se aumenta la liberación de PRL y viceversa, si se inhiben, disminuye su liberación. Sin embargo, esto no significa necesariamente que la serotonina esté implicada fisiológicamente

en el control de la secreción de PRL (Ver sección 2 de Introducción).

1.1.5.5. Esteroides ováricos.

Desde los trabajos de Nicoll y Meites (1962), quienes demostraron que cuando se incuban "in vitro" hipófisis con estradiol aumenta la secreción de PRL, hay un número mayor de evidencias que muestran que los estrógenos estimulan la secreción de PRL. Sin embargo, no está bien definido el mecanismo ni el sitio de acción.

El efecto prolactino-liberador del estradiol parecería deberse en parte a su acción sobre el sistema nervioso central, ya que el estradiol activa proyecciones serotoninérgicas al núcleo preóptico medial (Johnson y Crowley, 1983) y aumenta la actividad neuronal noradrenérgica. (Crowley, 1982).

Por otro lado, la administración de estrógenos altera los niveles de dopamina en la eminencia media, en la sangre de los vasos porta y en la hipófisis anterior (Chiocchio y col., 1980; Gudelsky col., 1981). A nivel hipofisario, se observó también la captación y unión del estradiol en las células lactotropas (Keefer y col., 1976). Además, se ha descrito una regulación del número de receptores dopaminérgicos por los estrógenos (Heiman y Ben-Jonathan, 1982; Pilotte y col., 1984).

Para la progesterona han sido encontrados efectos facilitatorios e inhibitorios. En la pseudopreñez, las descargas de

PRL se mantienen mientras los niveles de progesterona son elevados (Greef y Zeilmaker, 1978). Sin embargo la progesterona reduce el efecto estimulador de los estrógenos (Caligaris y col., 1974; Giguere y col., 1982).

1.1.5.6. Autorregulación de la secreción de PRL.

Hay un número considerable de hechos que sugieren que la PRL puede regular su propia secreción.

La hipótesis de que altos niveles circulantes de PRL inhiben la secreción de PRL por la hipófisis, fue sugerida por primera vez en 1953 (Nicolli, 1971). Años más tarde se demostró que el contenido hipofisario de PRL disminuye en ratas con tumores secretores de PRL (MacLeod y col., 1966; Chen y col., 1967) o en ratas normales con trasplante de hipófisis en la cápsula renal (Welsch y col., 1968). Por otro lado, los implantes de "pellets" de PRL en la eminencia media (Voogt y Meites, 1973) o la administración sistémica de PRL ovina disminuyen la secreción de PRL endógena (Advis y col., 1977).

Mientras algunos autores proponen un sitio de acción hipofisario (Melmed y col., 1980; Kadowaki y col., 1984), la mayoría de los estudios sugieren que la PRL actuaría a nivel hipotalámico; específicamente a nivel del sistema dopaminérgico tuberoinfundibular (Haskins y Moss, 1983; Demarest y col., 1984).

Se encontró que la administración intracerebral o periférica de la PRL produce un aumento de la síntesis, "turnover" y liberación de la DA (Moore y col., 1980; Moore y Demarest, 1982; Wise, 1986).

Aún cuando no se conocen las características del mecanismo autorregulador de la PRL, parece ser que la sensibilidad a su acción inhibitoria varía en las diferentes situaciones fisiológicas (Whitworth y col., 1981; Selmanoff y Gregerson, 1984).

1.2. SEROTONINA.

1.2.1. Generalidades.

La serotonina, 5-hidroxitriptamina, (5-HT) es conocida por sus propiedades biológicas desde el siglo pasado y se encuentra ampliamente distribuída en el reino animal y vegetal. Está localizada en las células enterocromafines del tracto intestinal, las plaquetas sanguíneas, los mastocitos, la glándula pineal y es el neurotransmisor liberado por las neuronas serotoninérgicas.

La presencia de 5-HT en el SNC fue demostrada primeramente por Twarog y Page (1953) con métodos bioquímicos. Estos hallazgos fueron confirmados por métodos fluorimétricos (Bogdansky y col., 1956). Posteriormente, por medio de técnicas de histofluorescencia, se demostró su localización dentro de neuronas (Falck y col., 1962; Dahlström y Fuxe, 1964; Fuxe, 1965). Estudios de fraccionamiento celular mostraron que la 5-HT cerebral está concentrada en terminales nerviosos (Zieher y de Robertis, 1963) y más precisamente en vesículas sinápticas (Pellegrino de Iraldi y col., 1968; Jaim-Litcheverry y Zieher, 1974).

1.2.2. Biosíntesis y catabolismo.

La serotonina, es un indol que se sintetiza a partir del aminoácido L-triptofano (Trp), en un proceso que requiere dos pasos enzimáticos.

El Trp es primero hidroxilado en la posición 5 por una en-

zima específica: triptofano hidroxilasa o triptofano-5-mono oxigenasa. La actividad de esta enzima es absolutamente dependiente de la presencia de oxígeno molecular y de tetra-hidrobiopterina (BH_4). El producto, L-5-hidroxitriptofano (5-HTP), es luego descarboxilado para formar serotonina. La enzima que cataliza este paso es una descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, dependiente de fosfato de piridoxal.

Estudios sobre la caracterización de estas dos enzimas han conducido a la conclusión de que la regulación de la síntesis de 5-HT involucra preferencialmente el paso de la hidroxilación del Trp. La actividad específica de la triptofano hidroxilasa en cerebro es 70-100 veces menor que la de la descarboxilasa, indicando que el paso de velocidad limitante para la síntesis de 5-HT es la hidroxilación del Trp (Hamon y col., 1981). Además normalmente la concentración de Trp en el S N C es baja y depende del transporte desde la periferia al cerebro (Baumann, 1985). La hidroxilación del Trp "in vivo" sigue una cinética de primer orden con respecto a los niveles cerebrales de Trp.

La enzima descarboxilasa fue considerada durante mucho tiempo la misma que la que interviene en la síntesis de catecolaminas. Sin embargo, diferencias en las condiciones de temperatura, pH, sustrato óptimo y distribución subcelular de la actividad descarboxilasa en cerebro, sugieren que se trata de dos enzimas distintas (Sims y col., 1973).

Se conoce relativamente poco acerca de la regulación de la síntesis de la serotonina y aún se desconocen los mecanismos que mantienen en estado estacionario los niveles cerebrales de 5-HT.

El principal proceso de inactivación de 5-HT luego de su liberación en la sinapsis, es la recaptación seguida por su catabolismo. La serotonina es desaminada por acción de la monoamino-oxidasa (MAO), de la que se reconocen dos formas: tipo A y tipo B. La serotonina es preferencialmente oxidada por la MAO tipo-A. (Fuller, 1986). El producto de desaminación es el aldehído 5-hidroxi-indólico, el que es oxidado por una aldehído deshidrogenasa al ácido 5-hidroxi-indol-3-acético (5-HIA).

1.2.3. Distribución.

1.2.3.1. Núcleos del rafe del tronco cerebral - Hipotálamo.

El estudio de la distribución de las neuronas serotoninérgicas en la rata fue primeramente realizado por Dahlström y Fuxe (1964), quienes clasificaron los cuerpos neuronales de 5-HT en nueve grupos llamados B₁-B₉.

Estos grupos, distribuidos a lo largo de la línea media del tronco encefálico, corresponden a los llamados clásicamente núcleos del rafe.

Investigaciones bioquímicas y de histofluorescencia mostraron que los núcleos del rafe de ubicación rostral inervan al cerebro anterior, mientras que los de ubicación caudal i-

nervan a la médula espinal (Carlsson y col., 1964; Dahlström y Fuxe, 1964; Palkovits y col., 1977; Steinbusch y Nieuwenhuys, 1982 b). Los tres núcleos rostrales son el linearis centralis, el dorsal y el mediano.

Los núcleos dorsal y mediano del rafe reciben múltiples aferencias provenientes de diversas áreas del tronco encéfalico y del cerebro anterior (Pasquier y col., 1977; Pasquier y Villar, 1983). Ambos núcleos constituyen el principal origen de las fibras que inervan el hipotálamo (Conrad y col., 1974; Azmitia y Segal, 1978; van de Kar y Lorenz, 1979).

Las fibras conteniendo serotonina entran al hipotálamo posterior por debajo del fascículo prosencefálico medial (Palkovits y col., 1977). Más rostralmente, los axones serotoninérgicos pasan a formar parte del fascículo (Fuxe y Jonsson, 1974; Ungerstedt, 1971) y lo abandonan paulatinamente a medida que las fibras se dirigen a inervar a los distintos núcleos hipotalámicos.

Prácticamente todas las áreas hipotalámicas reciben inervación serotoninérgica, pero su distribución no es uniforme.

Lateralmente, la mayor densidad de fibras está contenida en el fascículo prosencefálico medial y en la zona lateral del núcleo (n) preóptico medial, mientras que el n. preóptico lateral posee una menor densidad. En el hipotálamo anterior, hay una gran concentración de fibras en la parte ventrolateral del n. preóptico-supraquiasmático, que se continúa en el n. supraquiasmático.

El hipotálamo medial posee una elevada inervación en la parte central del n. ventromediano y en una zona comprendida entre el n. arcuato y los núcleos premilares dorsal y ventral, en tanto que los núcleos hipotalámico anterior y arcuato están pobremente inervados. En el hipotálamo posterior se encontró una alta densidad de fibras en la parte caudal del n. hipotalámico posterior, parte ventral del n. mamilar medial y en una región comprendida entre el fascículo mamilotalámico y mamilotegmental.

Estos resultados, provenientes de estudios con inmunofluorescencia (Steinbusch y Nieuwenhuys, 1982 a), coinciden en general con los datos encontrados con otras metodologías (Ungerstedt, 1971; Fuxe y Jonsson, 1974; Saavedra y col., 1974; Kent y Sladek, 1978).

La eminencia media posee también inervación serotoninérgica. Las fibras se localizan en la parte lateral de la capa externa con una mayor densidad en la región rostral (Steinbusch y Nieuwenhuys, 1982 a). También se describieron fibras en la capa subependimaria y en la fibrosa (Villar y col., 1984).

No obstante que la mayoría de las fibras que contienen serotonina provienen de neuronas localizadas fuera del hipotálamo, se encontró que el aislamiento total del mismo producía una depleción del 50-70% en la concentración de la 5-HT hipotalámica (Brownstein y col., 1976; Palkovits y col., 1977). Esto sugirió la existencia de una fuente intrahipotalámica de

serotonina.

En efecto, se hallaron cuerpos neuronales serotoninérgicos en la parte ventral del n. dorsomediano (Beaudet y Descarries, 1979; Frankfurt y Azmitia, 1983; Steinbusch y col., 1982; Frankfurt y col., 1981) y en los tanicitos de la eminencia media (Sladek y Sladek, 1978).

1.2.3.2. Hipófisis

Se describió la presencia de serotonina en los tres lóbulos hipofisarios (Saavedra y col., 1975; Friedman y col., 1983; Holzbauer y col., 1985).

En el lóbulo neural Steinbusch y Nieuwenhuys (1982a) localizaron fibras nerviosas conteniendo serotonina. El origen de dichas fibras sería periférico, ya que la sección del tallo no alteró el contenido de 5-HT del lóbulo posterior (Friedman y col., 1983).

En el lóbulo intermedio, la serotonina se encuentra en fibras nerviosas, mastocitos y en elementos sanguíneos (Westlund y Chield, 1982; Leranth y col., 1983; Saland y col., 1986; Palkovits y col., 1986). La sección del tallo hipofisario produjo la desaparición del 44% de la serotonina y la totalidad de las fibras 5-HT inmunorreactivas (Friedman y col., 1983). Estos resultados indicarían que el origen de las fibras serotoninérgicas del lóbulo intermedio sería central; los cuerpos neuronales estarían en los núcleos del rafe y el n. dorsomediano del hipotálamo (Mezey y col., 1984).

En el lóbulo anterior también se encontró 5-HT, aún cuando es poco probable que se sintetice localmente. Si bien Saavedra y su grupo de investigación (1975) midieron actividad de triptofano hidroxilasa, no se detectó la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (Johnston y col, 1984 a).

Aún no está claro donde se localiza la serotonina en el lóbulo anterior. Algunos autores describieron fibras 5-HT inmunorreactivas (Westlund y Chield, 1982; Friedman y col., 1983) cuyos terminales estarían íntimamente asociados con las células glandulares. También se observó una captación específica de serotonina a un grupo de células anterohipofisarias (Johns y col., 1982), las que en algunas especies fueron identificadas como gonadotropas (Nunez y col., 1981; Payette y col., 1985, 1986).

1.2.4. Control serotoninérgico de la liberación de Prolactina.

Una gran variedad de estudios farmacológicos apoyan la hipótesis de que la serotonina juega un rol estimulatorio en la liberación de PRL. La activación de las vías serotoninérgicas conduce a un aumento de los niveles séricos de PRL mientras que su inhibición produce una disminución de los mismos.

1.2.4.1. Manipulaciones farmacológicas que estimulan la liberación de PRL.

a. Administración de 5-HT y precursores.

Desde que Kamberi y colaboradores (1971 a) encontraron que

la inyección de 5-HT en el tercer ventrículo producía un aumento de la concentración de PRL plasmática, se usaron varios modelos experimentales para confirmar estos resultados.

Utilizando la misma vía de administración, la 5-HT estimuló la liberación de PRL en ratas machos (Pilotte y Porter, 1981), machos castrados (Krulich, 1979) y hembras ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Caligaris y Taleisnik, 1974).

También la inyección sistémica de 5-HT incrementó los niveles plasmáticos de PRL en ratas machos y machos castrados (Pilotte y Porter, 1979), en hembras ovariectomizadas (Stevens y Lawson, 1977), y en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Lawson y Gala, 1975 y 1978) a los 10 minutos luego de la inyección. Este efecto no se encontró en hembras en proestro con un tiempo más largo post-inyección (Lu y col., 1970; Lu y Meites, 1973).

El aumento producido en hembras y machos tratados con estrógenos fue mayor que en hembras ovariectomizadas (Stevens y Lawson, 1977) y machos normales (Stobie y Shin, 1983), respectivamente. Por otro lado, los machos parecen ser más sensibles a la estimulación de PRL por 5-HT que las hembras (Becú de Villalobos y col., 1984).

También se ha recurrido a la utilización de los precursores de serotonina, triptofano y 5-hidroxitriptofano, los cuales atraviesan la barrera cerebral y aumentan los niveles cerebrales de 5-HT (Fernstrom y Wurtman, 1971). La administración sistémica de 5-HTP a hembras y machos de 10 días de

edad (Cocchi y col, 1977 b), machos adultos (Krutlich, 1975; Ruzsas y col., 1982; Lambert y MacLeod, 1978 a), hembras en proestro y ratas hipofisectomizadas con una anterohipófisis transplantada bajo la cápsula renal (Lu y Meites, 1975), hembras ovariectomizadas (Ruzsas y col., 1982) y ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Chen y Meites, 1975; Lawson y Gala, 1978), produjo un aumento en la secreción de PRL.

Cuando se utilizó triptofano, que es un precursor de 5-HT menos eficiente (Fuller, 1986), se encontraron tanto resultados positivos (Mueller y col., 1976) como negativos (Lu y Meites, 1975; Gallo y col, 1975).

Las dietas carentes de triptofano hacen que los animales sean más sensibles a éste (Gil-Ad y col., 1976) y al 5-HTP (Clemens y col., 1980) en cuanto a su habilidad para liberar PRL.

b. Drogas que aumentan los niveles de 5-HT en la sinapsis.

Otra forma de activar las vías serotoninérgicas es mediante la inhibición de la recaptación presináptica de 5-HT. La recaptación de 5-HT por terminales serotoninérgicos luego de su liberación, es probablemente uno de los factores que terminan con su acción en la sinapsis. Por lo tanto, la inhibición de este proceso implica aumentar la efectividad de los mecanismos neuronales serotoninérgicos, por prolongar la acción post-sináptica de la 5-HT. La fluoxetina, 3-(p-trifluo-

rometil-fenoxi)-N-metil-3-fenilpropilamina, (Lilly 10140) es un inhibidor específico de la captación de 5-HT por sinaptosomas en cerebro de rata y un potente y específico inhibidor de la captación de aminas por neuronas serotoninérgicas (Fuller, 1980).

La administración sistémica de fluoxetina no modificó la liberación de PRL "per se" en animales adultos (Krulich, 1975; Clemens y col., 1977; Lawson y Gala, 1978), mientras que en animales jóvenes se obtuvieron resultados discordantes (Morgan y Herbert, 1978; Cocchi y col., 1977 b). Sin embargo, cuando fluoxetina se administra previamente a la inyección de 5-HTP, potencia el efecto liberador de PRL de este último (Clemens y col., 1977; Lawson y Gala, 1978) así como la descarga de PRL inducida por el estrés (Krulich, 1975). Estos hechos han sugerido que probablemente el rol de la 5-HT en la liberación de PRL no sea importante en condiciones de reposo.

Mientras que la fluoxetina carece prácticamente de capacidad para liberar serotonina de los gránulos de almacenamiento intraneuronal, otros agentes que son inhibidores competitivos de la recaptación de 5-HT sobre la membrana neuronal también liberan 5-HT de los almacenamientos intraneuronales. Los más usados entre ellos son la fenfluramina (Trulson y Jacobs, 1976; Fuller y col., 1978) y la p-cloroanfetamina (Fuller, 1978.)

Cuando estas drogas se administraron a ratas machos, se produjo un aumento de la liberación de PRL (van de Kar y col.,

1932).

c. Agonistas serotoninérgicos.

Se han utilizado también agonistas serotoninérgicos. El más usado es la quipazina (2-(1-piperazinil)-quinolina) (Hong y col., 1969).

La inyección intraperitoneal o intraventricular de distintas dosis de quipazina incrementa los niveles plasmáticos de PRL en machos (Meltzer y col., 1976), machos castrados (Kruulich y col., 1979), hembras en diestro (Clemens y col., 1977) y hembras ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Lawson y Gala, 1978). El efecto es mayor en animales jóvenes que adultos (Forman, 1981).

Otro agonista serotoninérgico, la m-clorofenilpiperazina, aumentó también la secreción de PRL cuando se administró a ratas machos (Quattrone y col., 1981).

d. Estimulación de los núcleos del rafe.

Otra forma de estudiar el problema es mediante la estimulación de los cuerpos neuronales serotoninérgicos. Cuando se estimularon eléctricamente los núcleos del rafe se produjo un aumento de los niveles sistémicos de PRL en ratas machos (Advis y col., 1979).

1.2.4.2. Manipulaciones farmacológicas que inhiben la secreción de PRL.

a. Inhibición de la síntesis de serotonina.

La síntesis de 5-HT comprende dos pasos enzimáticos; sin embargo, sólo el primero de ellos es útil para estudios de inhibición, ya que la otra enzima no está restringida a neuronas serotoninérgicas. El inhibidor más usado es la p-clorofenilalanina (PCPA) que "in vivo" produce una caída irreversible de la actividad de la triptofano hidroxilasa, la que dura por varios días. No obstante la PCPA interfiere con otros procesos neuronales, es una droga útil para disminuir la concentración cerebral de serotonina (Fuller, 1980).

La administración de PCPA inhibió la secreción de PRL en ratas machos (Gil-Ad y col., 1976; Martin y col., 1978; Advis y col., 1979) pero no en machos castrados (Donoso y col., 1971) ni en hembras ovariectomizadas (Gallo y col., 1975), ambas situaciones en las que la PRL inicial está baja. Otros autores encontraron resultados negativos también en ratas machos (Meltzer y col., 1976; van de Kar y col., 1982).

Por otra parte, PCPA bloqueó el aumento de la liberación de PRL inducido por estrógenos (Caligaris y Taleisnik, 1974) y por la succión; este último efecto fue revertido por tratamiento con 5-HTP (Kordon y col., 1973/74). En otros estudios se encontraron efectos opuestos de la PCPA: por un lado disminuyó (Willoughby y col., 1982) o inhibió (Quattrone y col., 1978 y 1979) el incremento de PRL producido por fenfluramina en ratas machos y bloqueó en este mismo modelo el inducido

por p-cloroanfetamina (Van de Kar y col., 1982). Por otro lado, potenció el efecto de quipazina sobre PRL (Meltzer y col., 1976; Krulich y col., 1979; van de Kar y col., 1982) siendo esto último explicado como un efecto debido a la supersensibilidad de los receptores serotoninérgicos centrales, privados de su agonista natural.

b. Bloqueantes de receptores serotoninérgicos.

Los llamados "agentes bloqueantes de receptores serotoninérgicos" han sido comúnmente usados en el estudio del sistema serotoninérgico sobre la secreción de PRL. Los más empleados son: metergolina, metisergida, ciproheptadina y metiote-pin.

Sin embargo, los resultados encontrados arrojaron dudas sobre su efectividad, ya que se describieron tanto efectos inhibitorios como estimulatorios (Caligaris y Taleisnik, 1974; Gallo y col., 1975; Lawson y Gala, 1975, 1976, 1978; Subramanian y Gala, 1976 a y b; Clemens y col., 1977; Cocchi y col., 1977 b, 1978; Clemens 1978; Lamberts y Mac Leod, 1978 a; Martin y col., 1978; Krulich y col., 1979).

Varios comentarios aclaran esta compleja situación: 1) Ellos poseen propiedades antiserotoninérgicas a nivel periférico, pero no está claro que también las posean a nivel central (Jacoby y col., 1978; Haigler y Aghajanian, 1970). 2) Metergolina y metisergida son además agonistas de receptores dopaminérgicos (Creese y col., 1975; Mac Leod y Login,

1977), que pueden inhibir la secreción de PRL por una acción directa sobre las lactotropas (Krulich y col., 1978, 1981; Lamberts y MacLeod, 1978 a; Cocchi y col., 1978). Ciproheptadina, que es un antagonista serotoninérgico menos potente, tiene además propiedad como antihistamínico, anticolinérgico y antidopaminérgico (Leysen y col., 1981). Inhibe la síntesis y liberación de PRL "in vitro" en células hipofisarias normales y tumorales, por un mecanismo no serotoninérgico desconocido (Lamberts y MacLeod, 1978 b). Por último, metiotepin es un bloqueante de receptores serotoninérgicos con alguna actividad antidopaminérgica (Fuller, 1980).

En suma todas estas evidencias complican la interpretación de los resultados y hacen que sea poco útil la aplicación de estas drogas al estudio de los efectos de la 5-HT sobre la secreción de la PRL.

c. Neurotoxinas serotoninérgicas.

Las ya mencionadas drogas, fenfluramina y p-cloroanfetamina, además de producir una liberación aguda de 5-HT al espacio sináptico, poseen un efecto tóxico sobre las neuronas serotoninérgicas (Clineschmidt y col., 1978; Sanders-Bush y Steranka, 1978).

La administración de p-cloroanfetamina en hembras ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Chen y Meites, 1975) y en ratas lactantes (Rowland y col., 1978) resultó en una caída de la PRL circulante, efecto atribuido a la acción neuro-

tóxica de la droga. Por otro lado, la desnervación con p-cloroanfetamina produjo un aumento de la sensibilidad de la respuesta al 5-HTP (Clemens y col., 1978).

Una neurotoxina que es usada con frecuencia es la 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT). La inyección de 5,7-DHT en ratas pretratadas con desmetilimipramina (DMI) (una droga que impide la captación de 5,7-DHT por neuronas noradrenérgicas), destruye selectivamente las neuronas serotoninérgicas produciendo una gran reducción en la concentración cerebral de 5-HT (Gerson y Baldessarini, 1975).

La administración intraventricular de 5,7-DHT causó una caída de los niveles basales de PRL en ratas machos (Gil-Ad y col., 1976). También bloqueó el aumento de PRL de la tarde del estro pero no el del proestro (Clemens, 1978); y no afectó la descarga de PRL inducida por el estrés (Wuttke y col., 1977) Además disminuyó (Willoughby y col., 1982) o inhibió (Quattro-
ne y col., 1978, 1979) el incremento de PRL inducido por fenfluramina o por p-cloroanfetamina (van de Kar y col., 1982).

Contrariamente, la desnervación producida con esta neurotoxina produjo una hipersensibilidad al estímulo por 5-HTP en machos y a fluoxetina más 5-HTP en hembras en diestro (Clemens, 1978), así como a m-clorofenilpiperazina (Quattro-
ne y col., 1981).

d. Lesiones de los núcleos del rafe.

La 5,7-DHT es utilizada también para provocar lesiones en

los cuerpos neuronales serotoninérgicos. Las lesiones de los núcleos dorsal y mediano del rafe en ratas machos no modificó los niveles basales de PRL; mientras que la inyección de 5,7-DHT en el núcleo dorsal del rafe inhibió el aumento de PRL provocado por p-cloroanfetamina (van de Kar y col., 1982). En ratas lactantes, la lesión del núcleo dorsal del rafe con 5,7-DHT disminuyó la descarga de PRL inducida por la succión (Barofsky y col., 1983 a). En tanto, la lesión del núcleo mediano sólo alteró la conducta materna, no así la liberación de PRL (Barofsky y col., 1983 b).

También se recurrió a las lesiones electrofíticas de los núcleos del rafe. Cuando se lesionó electrofíticamente el núcleo dorsal se encontró una caída simultánea de los niveles de 5-HT y 5-HIA en el cerebro anterior y de PRL en la sangre sistémica (Advis y col., 1979). Además las lesiones electrofíticas en los núcleos dorsal y mediano impidieron el aumento de PRL inducido por tratamiento con inhibidores de la recaptación de 5-HT más 5-HTP y con quipazina, sin alterar sus niveles basales (Fessler y col., 1984).

1.2.5. Posibles mecanismos de acción de serotonina sobre la secreción de PRL.

Todas las evidencias experimentales coinciden en atribuir a la 5-HT un rol estimulatorio sobre la liberación de PRL. Su rol parece ser más importante en situaciones en las que se descarga PRL, tales como durante succión, estrés o picos

inducidos por estrógenos; mientras que su participación no es clara en condiciones basales o de reposo.

Tampoco surge con claridad de la bibliografía, el mecanismo y sitio de acción de la 5-HT. Las posibilidades serían las siguientes: 1) La serotonina podría ser un PRF y actuar directamente sobre las células lactotropas para liberar PRL; 2) Suprimiría la liberación de dopamina de los terminales de la eminencia media a la sangre portal; 3) O bien actuaría estimulando la liberación de un PRF a nivel hipotalámico.

Con respecto a la primera posibilidad, varios autores incubaron hipófisis de rata con distintas dosis de 5-HT, no hallando modificaciones en la síntesis ni liberación de PRL al medio de incubación (Talwalker y col., 1963; Birge y col., 1970; Lamberts y MacLeod, 1978). La liberación de PRL tampoco se afectó cuando se inyectaron 5-HT o melatonina en la hipófisis a través de un vaso porta canulado (Kamberi y col., 1971 a). Sin embargo, Stobie y Shin, (1983) encontraron que la serotonina estimula directamente la secreción de PRL de la hipófisis transplantada debajo de la cápsula renal en ratas machos.

Con respecto a la segunda posibilidad, las evidencias más claras provienen de un trabajo de Pilotte y Porter (1981). En él estudiaron la posible relación entre los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico en la regulación de PRL. Ellos concluyeron que la 5-HT modula la secreción de PRL a través de un mecanismo estimulatorio que es efectivo en la presencia

de altas concentraciones plasmáticas de dopamina.

Estos resultados, junto con observaciones obtenidas de experimentos farmacológicos (Lawson y Gala, 1978; Clemens y col., 1978; Krulich y col., 1980; Takahara y col., 1981; Lynch y col., 1984), apoyan la hipótesis de que la 5-HT estimula la liberación de un PRF.

1.3. PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)

1.3.1. Generalidades.

El VIP fue aislado del duodeno porcino (Said y Mutt, 1970) y posteriormente fue localizado en células nerviosas periféricas y centrales (Larsson y col., 1976). El material extraído del cerebro corresponde al péptido de 28 aminoácidos contenido en el intestino (Marley y Emson, 1982).

Sus acciones biológicas incluyen vasodilatación, hipotensión, hiperglucemia, aumento de la contractibilidad del miocardio, estimulación respiratoria y relajación del músculo liso.

1.3.2. Estructura - Biosíntesis.

La estructura inicialmente propuesta fue confirmada por síntesis química (Bodansky y col., 1973). Es un péptido básico de 28 aminoácidos, cuya secuencia tiene similitud con la de otras hormonas gastrointestinales, principalmente con secretina.

Recientemente, se identificó un precursor de VIP (Pro-VIP) de peso molecular 17500 en células de neuroblastoma humano (Obata y col., 1981). El mismo grupo determinó la secuencia completa de un PrePro-VIP de peso molecular 20000 y que contiene 170 residuos aminoacídicos (Itoh y col., 1983). Este precursor contiene al VIP cerca de su extremo C-terminal.

Estos mismos autores confirmaron que la secuencia del VIP humano es idéntica a la del VIP porcino y bovino (Okamoto y

col., 1953). La actividad biológica de los fragmentos de la molécula de VIP aumenta con la longitud de la cadena (Bodanszky y col., 1973), en tanto que para la actividad inmunológica son esenciales las secuencias C-terminal (23-28) y N-terminal (7-10) (Yanaihara y col., 1977).

1.3.3. Localización en el SNC, hipófisis y sangre portal. Localización subcelular.

Los datos provenientes de estudios inmunológicos e inmunocitoquímicos coinciden en que el VIP está ampliamente distribuido en el SNC.

Las mayores concentraciones se detectaron en la corteza cerebral, la amígdala, hipocampo y algunas áreas de hipotálamo. Bajas concentraciones se midieron en la glándula pineal, ganglios basales del tálamo, cerebelo, médula espinal y tronco cerebral (Lorén y col., 1979; Samson y col., 1979; Besson y col., 1979).

La distribución de cuerpos neuronales y fibras VIP-inmuno- reactivas ha sido descripta por diferentes autores (Lorén y col., 1979; Sims y col., 1980; Hökfelt y col., 1982 a y b; Eiden y col., 1982; Roberts y col., 1982, 1983; Léránth y Froscher, 1983; Léránth y col., 1984; Morrison y col., 1984).

En la corteza cerebral, los cuerpos neuronales VIP-reactivos constituyen el 1% de la población neuronal, localizándose en todas sus regiones (Morrison y col., 1984).

Estudios con lesiones confirmaron que las neuronas corticales de VIP forman un sistema intrínscico (Emson y Lidvall, 1979; Palkovits y col., 1981).

El hipocampo muestra neuronas VIP- reactivas, que también forman un sistema intrínscico. En el fornix y fimbria se encontraron fibras VIP positivas (Roberts y col., 1983).

En la amígdala, los cuerpos neuronales conteniendo VIP se encuentran en la mayoría de los núcleos de la amígdala, especialmente en los núcleos basolateral y lateral. En tanto que no hay somas en el núcleo central a pesar de la densa inervación VIP-érgica que recibe (Roberts y col., 1982).

La amígdala forma parte de un sistema de fibras largas, bidireccionales que, a través de la "stria terminalis", la conectan con el núcleo del lecho de la "stria terminalis", el n. supraquiasmático y otros núcleos hipotalámicos (Roberts y col., 1980; Palkovits y col., 1981).

En el hipotálamo se encontró un gradiente de concentraciones de VIP desde la región anterior hacia la posterior (Besson y col., 1979). Los elevados niveles de VIP en el hipotálamo anterior se deben a una gran concentración de cuerpos neuronales y terminales VIP-inmunorreactivos en el núcleo supraquiasmático (Lorén y col., 1979; Samson y col., 1979; Sims y col., 1980; Card y col., 1981; Palkovits y col., 1981). Los somas están concentrados principalmente en la zona ventral del núcleo y sobre y dentro del quiasma óptico. Los terminales nerviosos se localizan principalmente en la

zona dorsal del n. supraquiasmático (Card y col., 1981; Rostene y col., 1982). Muchos axones dejan el núcleo y pasan a los núcleos hipotálamico anterior y periventricular, para terminar a lo largo del borde ventral del n. paraventricular. Las fibras caudales del n. supraquiasmático terminan en los núcleos ventromediano, dorsomediano y preamilar (Card. y col., 1981).

En el área medial preóptica se describieron escasos cuerpos neuronales y terminales VIP-inmunorreactivos (Loren y col., 1979; Sims y col., 1980).

Hökfelt y col. (1982 a) detectaron neuronas conteniendo VIP en la región hipotalámica supramamilar y el n. arcuato.

En el hipotálamo mediobasal se encontraron niveles bajos de VIP y escasas fibras inmunorreactivas en la lámina interna de la eminencia media (Lorén y col., 1979; Sims y col., 1980; Hökfelt y col., 1982 b).

El origen de la inervación VIPérgica del hipotálamo mediobasal constituye un problema sin resolver. Su desaferentación produce una caída del 40% de la concentración de VIP en la zona caudal y en tanto que no afecta la de la zona rostral. Esto sugiere que parte de la inervación del hipotálamo mediobasal proviene de cuerpos neuronales cuyas fibras entran al hipotálamo mediobasal caudal por el fascículo prosencefálico medial, en tanto que el resto de las fibras provendría de neuronas intrahipotálamicas (Besson y col., 1979).

Más caudalmente las concentraciones de VIP son bajas, con

la excepción de la sustancia gris mesencéflica, n. dorsal del rafe, locus coeruleus, el n. del tracto solitario y los núcleos parabraquiales (Eiden y col., 1982).

Se localizaron neurona VIP-inmunorreactivas en dos áreas de la sustancia gris mesencefálica: una zona adyacente al IV ventrículo, periventricular, y otra área constituida por el n. dorsal rafe. El grupo neuronal periventricular da origen a una proyección ascendente al n. accumbens, al n. del lecho de la "stria terminalis", al hipotálamo y a la amígdala a través del fascículo prosencefálico medial (Marley y col., 1981). El n. supraquiasmático queda fuera de esta proyección. Es probable que esta vía inerve directamente la eminencia media, ya que el fascículo prosencefálico medial entra caudalmente al hipotálamo mediobasal (Besson y col., 1979 a; Marley y col., 1981).

En la sangre de los vasos porta se describió la presencia de VIP unas 20 veces más concentrado que en la sangre periférica (Said y Porter, 1979; Shimatsu y col., 1981; Brar y col., 1985). Se ha sugerido que niveles elevados en los vasos porta con bajas concentraciones en la eminencia media sea el resultado de un recambio (turnover) rápido del péptido (Rostene, 1984). Sin embargo, es probable que las células hipofisarias liberen VIP a la sangre de los vasos porta, ya que fue detectado en el lóbulo anterior de la hipófisis (Samson y col., 1979; Besson y col., 1979; Van Noorden y col., 1979). Más aún, recientemente se demostró que la hipófisis anterior ais-

lada es capaz de sintetizar VIP (Arnaout y col., 1986). Si bien no se conoce cuáles son las células hipofisarias con capacidad de sintetizarlo, Morel y col. (1982) localizaron VIP en las lactotropas. Se observó inmunorreactividad en el citoplasma rodeando a los gránulos secretores y en el núcleo.

En el lóbulo hipofisario posterior se detectó VIP con radioinmunoensayo (Samson y col., 1979; Van Noorden y col., 1979).

Localización subcelular.

EL VIP está presente en terminales nerviosos, se encontró en la fracción sinaptosomal de varias áreas cerebrales (Giachetti y col., 1977; Emson y col., 1978; Besson y col., 1979). Estudios con el microscopio electrónico localizaron el VIP en dendritas y axones; en estos últimos se detecta en el centro de las vesículas grandes, citoplasma y rodeando a las vesículas pequeñas. Se observaron contactos sinápticos entre dendritas y axones VIPérgicos (Pelletier y col., 1981; Card y col., 1981; Léranth y Frotscher, 1983; Léranth y col., 1984).

Se ha demostrado que el VIP es transportado a través del axón (Giachetti y Said, 1979; Marley y Emson, 1982) y liberado desde los terminales nerviosos "in vivo" (Go y Yaksh, 1980) e "in vitro" (Giachetti y col., 1977; Emson y col., 1978) en respuesta a varios estímulos.

Además, hay observaciones que sugieren que el VIP sería inactivado en el cerebro por degradación enzimática (Straus y col., 1982).

Todos estos hechos plantean la posibilidad de que el VIP

cumpla funciones como neurotransmisor (Marley y Emson, 1982).

1.3.4. Efectos de VIP sobre la liberación de PRL.

1.3.4.1. Evidencias experimentales.

La presencia de VIP en el hipotálamo, en la hipófisis y en altas concentraciones en la sangre portal, dio origen a una serie de estudios para investigar su participación en la secreción hipofisaria (ver revisión de Rostene, 1984). Se encontró que VIP estimula la liberación de PRL en concentraciones similares a las encontradas en la sangre portal (Matsushita y col., 1983).

Actualmente, varias líneas de evidencias llevan a postular al VIP como un factor fisiológico involucrado en la liberación de PRL (PRF):

1. La presencia de VIP en el hipotálamo, sangre portal y en las células lactotropas (ver sección 1.3.3.)

2. El VIP se une a receptores específicos en la hipófisis anterior donde estimula la actividad de adenilato ciclasa (Robberecht y col., 1979; Giachetti y col., 1979; Nicosia y col., 1982).

3. Experimentos "in vitro" muestran que el VIP estimula la liberación de PRL actuando a nivel hipofisario. Dosis de VIP entre 10^{-6} y 10^{-9} M son efectivas en diferentes condiciones experimentales: hemipituitarias (Ruberg y col., 1978; Shaar y col., 1979; Enjalbert y col., 1980); cultivo de cé-

lulas hipofisarias dispersas en sistemas de incubación estática (Samson y col., 1983; Collu y col., 1984) y en sistemas de perifusión o incubación dinámica (Matsushita y col., 1983); en poblaciones de células hipofisarias enriquecidas en prolactotropas (Rotsztejn y col., 1980) y en líneas celulares tumorales (Gourdji y col., 1979).

4. La inyección intraventricular o sistémica de VIP aumenta en forma dosis dependiente los niveles plasmáticos de PRL en ratas macho (Kato y col., 1978) y en hembras ovariectomizadas (Vijayan y col., 1979).

5. La inmunoneutralización del VIP endógeno inhibe la respuesta secretoria de PRL a la succión y el estrés (Abe y col., 1985; Kaji y col., 1985) Este hecho pone de manifiesto el posible rol fisiológico del VIP como PRF.

1.3.4.2. Sitio de acción.

La presencia de VIP en el hipotálamo y en los vasos porta sugirió originalmente que el VIP contenido en el hipotálamo, frente a un estímulo específico, era liberado a los vasos porta para actuar sobre las células prolactínicas estimulando su secreción. Sin embargo los bajos niveles de VIP en la eminencia media arrojaban dudas sobre el origen del VIP de la sangre portal. La única explicación posible era que un recambio muy rápido impedía detectar VIP en la eminencia media.

No obstante, el hallazgo de VIP en las lactotropas sugería que éstas podrían constituir el origen de VIP portal. Más

aun, la capacidad de las células hipofisarias para sintetizar el VIP, apoyaba un origen hipofisario.

La localización de VIP en las lactotropas, la acción directa demostrada en los estudios "in vitro" y los efectos de la inmunoneutralización del VIP endógeno sobre la descarga de PRL inducida por el estrés y la succión, confirman un sitio de acción hipofisario.

El hipotálamo también debe ser investigado como un sitio de acción adicional. Estudios realizados en ratas lactantes con inmunocitoquímica, mostraron una gran población de cuerpos neuronales VIP-positivos en el núcleo paraventricular que proyectan a la eminencia media (Mezey y Kiss, 1985).

Además se encontró, también en ratas lactantes, un aumento en el contenido del RNA mensajero hipotalámico que codifica para la síntesis de VIP (Gozes y Shani, 1986).

Estas evidencias sugieren al hipotálamo como sitio de acción de VIP sobre la regulación de PRL, pero hasta el presente ha sido caracterizado en forma insuficiente.

2. OBJETIVOS.

De las observaciones experimentales que brinda la bibliografía del tema, surge con claridad que la serotonina participa en la regulación de la secreción de PRL jugando un papel estimulador. Sin embargo, la mayoría de las evidencias provienen de experimentos farmacológicos y/o manipulaciones quirúrgicas que no permiten asegurar que la 5-HT esté involucrada en la liberación de PRL en condiciones fisiológicas.

Por otra parte, no se conoce con certeza su mecanismo y sitio/s de acción, si bien la mayor parte de las observaciones sugiere que actuaría a nivel hipotalámico estimulando la liberación de un PRF. Entre las sustancias que han sido postuladas como PRF, el VIP es un firme candidato.

En el presente trabajo de Tesis hemos utilizado el modelo de la rata lactante con el propósito de estudiar el control de la descarga de PRL frente a un estímulo natural como es la succión.

Los objetivos que nos hemos propuesto son:

a) Encontrar un tiempo de succión que permita la disociación de la descarga de PRL de las modificaciones en la secreción de otras hormonas anterohipofisarias.

b) Utilizando ese tiempo de succión, estudiaremos la participación de la serotonina en el control de la secreción de PRL de modo de:

i) Investigar si la 5-HT afecta la liberación de PRL actuando directamente en la hipófisis anterior.

ii) Localizar el sitio de terminación de una vía serotoninérgica estimuladora de la descarga de PRL inducida por la succión.

Mediremos a tales efectos las concentraciones de 5-HT y su principal metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético, en áreas hipofisarias y del sistema nervioso central relacionadas con la regulación de la secreción de PRL.

c) Evaluar la relevancia fisiológica de dicho neurotransmisor en el control de la descarga de PRL.

Para ello, lesionaremos el sitio donde se altere la actividad serotoninérgica. Examinaremos el efecto de dicha lesión sobre la liberación de PRL inducida por la succión.

d) Determinar la existencia en ese sitio de neuronas conteniendo VIP.

Este estudio se llevará a cabo mediante el dosaje del VIP presente en esa área en el mismo modelo experimental. Compararemos su concentración con la de otras áreas del sistema nervioso central asociadas al control de la secreción de PRL.

3.1. TECNICAS EMPLEADAS.

3.1.1. Determinaciones radioinmunoológicas.

3.1.1.1. Hormonas anterohipofisarias.

a) Dosaje de PRL, FSH, GH, LH y TSH.

Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente durante 3 hs para su coagulación, se separó luego el suero por centrifugación y se guardó a -20° C hasta el dosaje hormonal.

Todas las determinaciones se realizaron por radioinmunoensayo (RIA) usando el método de doble anticuerpo.

Los niveles de PRL, FSH, GH y TSH se determinaron siguiendo las instrucciones del Rat Pituitary Distribution Program del NIAMDD. En el caso de LH se siguió la técnica desarrollada por Niswender y colaboradores (1968), con las modificaciones introducidas por Fox y Smith (1984) para aumentar la sensibilidad del ensayo.

Marcaciones

Las preparaciones de hormonas purificadas para marcar con 125 I todo fueron provistas por el NIAMDD (elaboradas en rata), excepto la de LH que fue proporcionada por el Dr. L. Reichert Jr. (LH ovina). El método utilizado para las marcaciones fue el de la cloramina-T (Hunter y Greenwood, 1962).

Para la marcación de PRL, se hicieron reaccionar 5 ug y para FSH y LH 2,5 ug de hormona con 1 mCi de 125 I Na (New England Nuclear) durante 1 minuto. La reacción se paró con metabisulfito de sodio y se purificó la hormona marcada pasándola

por una columna (10x1cm) de Sephadex G-75.

La marcación de GH se llevó a cabo dejando reaccionar 10 µg de hormona con 1 mCi de 125 I Na durante 45 seg, parando la reacción con metabisulfito y eluyendo en columna de Sephadex G-50 (20 x 1 cm).

Por último, se marcaron 3 µg de TSH con 1 mCi de 125 I Na durante 40 seg, se paró con metabisulfito, se agregaron 100 µl de suero normal de conejo (NRS) y se purificó a través de una columna de Sephadex G-75.

Protocolo del ensayo de PRL, FSH y TSH.

-Se cargan los tubos con buffer PBS-BSA 1% (fosfato de sodio 0,01 M pH 7,6-0,15 M NaCl- 0,01% mertiolate- 1% albúmina bovina) y con las muestras o estándares. Juntos deben ocupar un volumen de 200 µl.

-Se agregan 100 µl de hormona marcada (20.000 cpm) disuelta en PBS-BSA 0,1%.

-El primer anticuerpo se agrega disuelto en PBS-0,05 M EDTA-3% NRS, en un volumen de 100 µl. Los anticuerpos se obtuvieron del NIAMDD, dirigidos contra las hormonas de rata fabricados en conejo. Las diluciones iniciales fueron 1:3000 para anti-rPRL y anti-rTSH y 1:2000 para anti-rFSH.

-La mezcla se incuba durante 48 hs a temperatura ambiente.

-La separación de la hormona libre de la unida al anticuerpo se realiza mediante el agregado de 100 µl de un segundo anticuerpo dirigido contra las inmunoglobulinas de conejo (Hecho en cabra), en una dilución 1:15 en PBS. Se incuba durante

24 hs más.

-Se precipita el complejo "segundo anticuerpo - primer anticuerpo - hormona" mediante una centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos.

-Se aspira el sobrenadante y se cuenta la radiactividad del precipitado en un contador gamma (Beckman. Gamma-300).

Las preparaciones de referencia que se utilizaron fueron RP-3 para PRL y RP-2 para FSH y TSH, proporcionadas por el NIAMDD. Las curvas fueron lineales en los siguientes rangos: PRL: 2,5-0,078 ng de RP-3; FSH: 6,25-0,195 ng de PR-2; TSH: 1,56-0,20 ng de RP-2. Los estándares se diluyeron en PBS-BSA 1%.

Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron 7,1% para PRL y 3,7% para TSH y FSH.

Protocolo del ensayo de GH.

-Se cargan los tubos con buffer PBS-BSA 1%-0,025M EDTA más las muestras o estándares, ocupando juntos un volumen de 300 u l.

-Se agregan 100 u l de la hormona marcada (20000cpm) disuelta en el mismo buffer.

-Se agregan 100 ul de primer anticuerpo (dilución inicial 1:2000), disuelto en PBS- 0,05 M EDTA-2% suero normal de mono (N MS). El anticuerpo, provisto por el NIAMDD es fabricado en mono contra la hormona de rata.

-Se incuba a 4° C durante 72 hs.

-Se agregan 25 ul (25 USP) de heparina.

-Se separa la hormona libre de la unida al anticuerpo por

el agregado de 100 ul de segundo anticuerpo (1:15) hecho en cabra contra las inmunoglobulinas de mono, disuelto en PBS (Antibodies Incorporated).

-Se incuba durante 24 hs más y se agregan 500 ul de polietilenglicol (P M 6000) 8% en PBS, se deja durante 15 minutos.

-Se centrifuga en frío 30 minutos a 3000 rpm.

-Se cuenta la radiactividad del precipitado en contador gamma.

La preparación de referencia utilizada fue RP-2 (Origen: NI-AMDD) y la curva lineal entre 4 y 0,0156 ng de RP-2. Las diluciones del estándar se realizaron en PBS-BSA 1% - 0,025 M EDTA.

El coeficiente de variación intra-ensayo fue 2,2%.

Protocolo del ensayo de LH.

-Se cargan los tubos con buffer PBS-0,1% gelatina y el estándar o muestra, en un volumen de 150 ul.

-Se agregan 50 ul de primer anticuerpo (1:20000), disuelto en PBS - 3% NRS - 0,05 M EDTA. El anticuerpo anti-LH ovina fabricado en conejo fue provisto por el Dr. Niswender (anti-ovine LH N° 15), presenta reacción cruzada con la LH de rata.

-Se incuba 24 hs a temperatura ambiente.

-Se añaden 50 ul de hormona marcada (10000 cpm) y se incuba durante otras 24 hs.

-Se separa la fracción libre de unida por el agregado de segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulinas de conejo, hecho en ca-

bra; 50 ul de dilución 1:10). Se deja media hora y se agregan 500 ul de polietilenglicol al 5% en PBS.

- Se deja durante 10 minutos y se centrifuga 30 minutos a 3000 rpm.

-Se aspira el sobrenadante y se cuenta la radiactividad del precipitado en contador gamma.

La preparación de referencia usada fue RP-2 (NIAMDD) y la curva fue lineal entre 0,78 y 0,0245 ng RP-2. La dilución del estándar se hizo en PBS- 7%BSA.

El coeficiente de variación intra-ensayo fue 6,4%.

b) Dosaje de ACTH

Las muestras de sangre para la determinación de ACTH se recogieron en tubos, mantenidos en hielo, conteniendo 30 μ l de una solución 10% EDTA/ml de sangre. Se centrifugaron inmediatamente en centrífuga refrigerada a 1000xg durante 20 minutos y se agregaron 1000 unidades de Trasylol (Bayer)/ml de plasma. Se guardaron a -70° C hasta el ensayo.

Los niveles plasmáticos de ACTH fueron medidos en el Centro de Estudios Endócrinos (Universidad de La Plata) por el Dr. F. Estivariz según un radioinmunoensayo específico descrito previamente (Castro y col., 1984)

Básicamente consiste en lo siguiente:

Marcación de ACTH

Se usó el método de la cloramina T, con algunas modificacio-

nes. Para iodinación se utilizó ACTH sintética (1-24) y la hormona marcada se purificó con Vycor. La actividad específica fue 200 uCi/nmol.

Protocolo del ensayo

-El buffer utilizado es fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 0,2% BSA-0,2% 2-mercaptoetanol.

-Se incuban los estándares o las muestras con el anticuerpo durante 24 hs a 4° C. El anticuerpo fue obtenido en conejo contra ACTH (1-24) conjugada a tiroglobulina (dilución final 1:30000). Tiene reacción cruzada completa con ACTH (1-39); 1% con α -MSH y desacetil α -MSH y 0% con lipotropina, ACTH (4-10) ACTH (1-10), CLIP y endorfina.

-Se agrega luego ^{125}I -ACTH y la mezcla se incuba durante 9 hs más. El volumen final de incubación es 0,3 ml.

-La separación de la hormona libre de la unida se realiza por la adición de carbón-dextrán.

La sensibilidad del ensayo fue 4 pg/ml.

3.1.1.2. Péptido intestinal vasoactivo (VIP)

Preparación de las muestras de tejido.

-Se homogenizan las muestras en ácido acético 1N.

-Se toman alícuotas por duplicado para determinar proteínas por el método Lowry y colaboradores (1951).

-Se hierven los homogenatos durante 15 minutos a baño maria.

-Se centrifuga a 3000 rpm durante 20 minutos a 4° C.

-El sobrenadante se transfiere a tubitos de vidrio, se liofi-

lizan y se guardan a -70° C hasta el ensayo.

Protocolo del ensayo.

-Se cargan tubos de plástico de 2 ml con 500 μ l de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,20-0,3% BSA - 10mM EDTA.

-Se añaden 100 μ l del estándar o las muestras (reconstituidas en el buffer del ensayo).

-Se agregan 100 μ l de (3-iodo tirosil- 125 I) VIP (adquirido a Amersham) (24000 cpm/ml).

-Se colocan 100 μ l de anticuerpo anti-VIP, fabricado en conejo (Amersham), dilución inicial 1:25 reconstituido en el buffer del ensayo.

-Se incuban los tubos tapados durante 6 días a 4° C.

-La separación de la hormona libre de la unida al anticuerpo se realiza por el agregado de 500 μ l de una suspensión de carbón-dextrán, previamente agitada durante 20 minutos a 4° C (0,4 g de carbón activado (Sigma) y 0,04 g de dextrán, PM 70.000 (Sigma), en 50 ml de buffer).

-Se centrifuga inmediatamente a 2000 xg durante 20 minutos a 4° C.

-Se traspasa el sobrenadante a otro tubo de plástico.

-Se cuenta la radiactividad del precipitado y del sobrenadante en contador gamma (Alfanuclear).

El estándar que se utilizó fue VIP porcino adquirido a Sigma. La curva fue lineal entre 625 y 19 pg.

3.1.2. Dosaje de serotonina.

3.1.2.1. Método radioenzimático.

Se utilizó el método descrito por Saavedra y colaboradores (1973, 1974) con algunas modificaciones introducidas por Poh1 (1978) para aumentar la sensibilidad del ensayo.

El método consiste en la transformación de la 5-HT en ^3H -melatonina, utilizando la ruta biosintética de la glándula pineal (Fig. 1 A). En un primer paso, la 5-HT es acetilada enzimáticamente por la N-acetiltransferasa (NAT) que usa como cofactor dador de acetilos a la acetil-coenzima A (AcCoA). La N-acetilserotonina (NAS) así formada es ^3H -metilada en su grupo hidroxilo en una reacción catalizada por la enzima hidroxindol-0-metiltransferasa (HIOMT), presente en la glándula pineal. Esta le transfiere el grupo ^3H -metilo de la ^3H -metil-S-adenosil-L-metionina (^3H -SAM). El producto final, la ^3H -melatonina, se extrae selectivamente. La cantidad de radiactividad obtenida es proporcional a la masa inicial de serotonina (Fig. 1 B).

Este ensayo es considerado específico para 5-HT. La interferencia producida por la NAS endógena, que podría ser convertida en este sistema a ^3H -melatonina, se corrige mediante los tubos "blancos" que no contienen AcCoA. La actividad de descarboxilasa presente en la preparación de NAT podría descarboxilar al 5-HTP a 5-HT. Para evitarlo, se agrega carbidopa, un inhibidor de la actividad descarboxilasa. Otros indoles, como 5-hidroxitriptofol, 5-HIA y 5,6-dihidroxitriptamina, prácticamente no reaccionan en este ensayo.

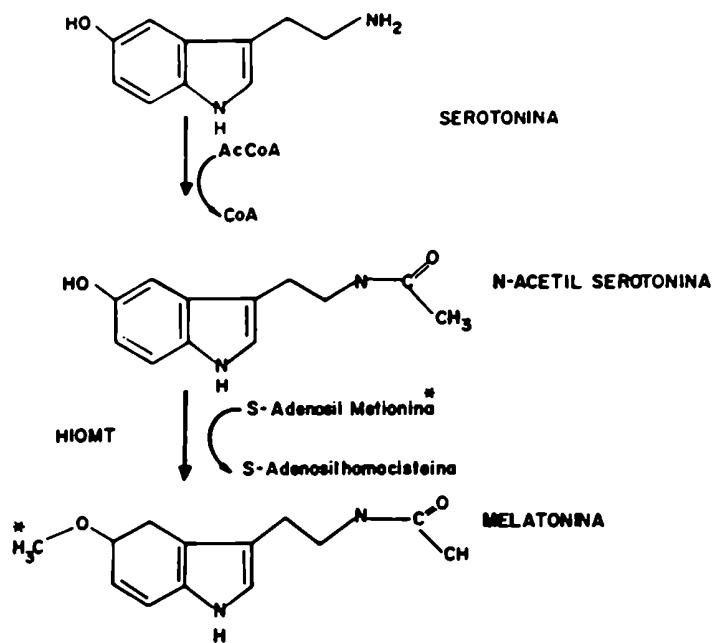


FIG. 1. A) Síntesis de melatonina a partir de serotonina según la ruta biosintética de la glándula pineal.
 B) Curva de calibración: masa de serotonina vs síntesis de melatonina (cpm)

La sensibilidad que logramos (el doble del blanco) fue de 30-50 pg.

Preparaciones enzimáticas.

a) N-acetiltransferasa (NAT).

-Se homogenizan aproximadamente 50 grs. de hígado de ratas ayunadas durante 24 hs. en 2 volúmenes de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,2.

-Se centrifuga a 10000x g por 15 minutos.

-Se filtra a través de gasa.

-Se centrifuga el sobrenadante a 78000 x g durante 90 minutos.

-Se filtra nuevamente.

-Al sobrenadante se agrega lentamente $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ al 40% de saturación y se deja equilibrar durante 1 h.

-Se centrifuga a 16000 x g por 20 minutos.

-Se agrega lentamente al sobrenadante $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ al 65% de saturación y se deja equilibrar durante 1 h.

-El precipitado se disuelve en el mínimo volumen de buffer fosfato 0.02 M pH 7,2.

-Se dializa contra 200 volúmenes del mismo buffer con dos cambios cada 3 hs.

-Se centrifuga a 16000 x g por 20 minutos.

-Al sobrenadante se agregan 100 ul/10 ml de solución enzimática de una solución de etilenglicol al 10% (v/v) en EDTA- Na_2 10m M y 100u l de una solución 100 mM de mercaptoeta-

noi/ 10 ml de solución.

-Se guarda en alícuotas de 200 u l a -70° C. Es estable por 8 meses.

Titulación de la preparación de NAT.

-Se hacen diluciones de la preparación enzimática al 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 en buffer fosfato de sodio 0,02M pH 7,2.

-Se prepara una solución de triptamina (Sigma, PM 196,7): 1,967 mg/ml de buffer fosfato de sodio 0,02 M pH 7,2.

- Se cargan los tubos según el siguiente esquema:

| Tubo | Buffer fosfato 0,02 M pH 7,2 | Triptamina | NAT | 14 C-AcCoA |
|------------|---------------------------------|------------|--------|-----------------|
| Blanco | 50 u l | 10 u l | -- | 10 u l |
| Enzima 1/2 | 40 u l | | 10 u l | |
| " 1/4 | | | 10 u l | |
| " 1/8 | | | 10 u l | |
| " 1/16 | | | 10 u l | |
| " concent. | | | 10 u l | |

-Se incuban 10 minutos a 37° C.

-Se para la reacción con 500 u l de buffer borato 0,5M pH10.

-Se agregan 6 ml de tolueno-isoamílico 97:3 (v/v).

-Se agitan los tubos por 1 minuto.

-Se centrifugan 5 minutos para separar las fases.

-Se pasan 5 ml de la fase superior a viales de vidrio.

-Se agregan 10 ml de mezcla centelleante.

-Se cuentan por centelleo líquido.

b) Hidroxi-indol-0-metiltransferasa (HIOMT)

-Se homogenizan unos 9,6 grs de pineales bovinas en 50 ml de solución isotónica (CIK 1,19% p/v).

-Se centrifuga a 78000 x g por 60 minutos.

-Se agrega lentamente al sobrenadante $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$ al 35% de saturación y se equilibra durante 1 hora.

-Se centrifuga a 16000 x g por 20 minutos.

-Al sobrenadante se agrega lentamente $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$ al 65% de saturación y se equilibra durante 1 hora.

-Se centrifuga nuevamente a 16000 x g por 20 minutos.

-El precipitado se disuelve en 5 ml de buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,9.

-Se dializa contra 200 volúmenes del mismo buffer, cambiando éste dos veces cada tres horas.

-Se fracciona en alícuotas de 150 ul y se guarda a -70°C . Es estable por 12 meses.

Titulación de la preparación de HIOMT.

-Se hacen diluciones de la preparación enzimática al 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80 en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,9.

-Se prepara una solución de N-acetilserotonina (Sigma, P M 218,3): 4,8 mg/5ml de buffer fosfato 0,1 M pH 7,9.

-Se cargan los tubos según el siguiente esquema:

| Tubo | Buffer fosfato 0,1M pH 7,9 | N-acetil- serotonina | H10 MT | ¹⁴ C-SAM |
|-------------|-------------------------------|-------------------------|--------|---------------------|
| Blanco | 60 u l | 10 u l | -- | 10 u l |
| Enzima 1/10 | 50 u l | | 10 u l | |
| Enzima 1/20 | | | | |
| Enzima 1/40 | | | | |
| Enzima 1/80 | | | | |

-Se incuban 30 minutos a 37° C.

-Se para la reacción con 0,5 ml de buffer borato 0,5 M pH 10.

-Se agregan 6 ml de tolueno.

-Se agitan los tubos por un minuto.

-Se centrifugan 5 minutos para separar las fases.

-Se pasan 4 ml de la fase superior a viales de vidrio.

-Se agregan 10 ml de mezcla centelleante.

-Se cuentan por centelleo líquido.

Soluciones stock;

Preparación de NAT

Preparación de H10MT

Acetil Coenzima A (AcCoA stock)

AcCoA, sal de litio (Sigma) 4 mg/ml de HCl 0,1M M.

Se guarda en congelador, dura 15 días.

Carbidopa (CRD stock) MK-486

60 M en HCl 0,1mM (PM 244,3) (Pfister).

³H-SAM

AE 71,8 Ci/nmol (New England Nuclear).

Se guarda en la heladera.

Solución A

10 ml de buffer fosfato de sodio 0,2 M pH 7,90 + 1,1 ml
NaHO 1 N.

Se guarda en la heladera.

HCl 0.1 N

HCl 0,1 mM

Buffer fosfato de sodio 0,02 M; pH 7,20

Buffer fosfato de sodio 0,2 M; pH 7,90

Borato de sodio 0,25 M; pH 10,0

melatonina (MEL Stock)

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

Se guarda en congelador. Dura 15 días.

Tolueno

Mezcla centellante

4 g de PPO

40 g de DMPOPOP

750 ml de tolueno

250 ml de Triton X-100

Soluciones a preparar el día de la valoración (cada 10 muestras):

"NAT (+)" (con AcCoA)

| | |
|---------------------------------|------|
| CRD Stock | 25ul |
| AcCoA stock | 25ul |
| Fosfato de sodio 0,02M; pH 7,20 | 40ul |
| Preparación de NAT | 10ul |

"NAT (-)" (sin AcCoA)

CRD stock 25 ul

HCl 0,1 mM 25 ul

"H10MT"

³H-SA m 20 ul

Fosfato de sodio 0,2 m pH; 7,90 5 ul

Preparación de H10MT. 25 ui

mEL-BOR

mEL stock 0,1 ml

Borato de sodio 0,25 M; pH 10 3 ml

Procedimiento

-Preparación de los estándares de 5-HT:

solución madre: 4,37 mg de serotonina creatinin sulfato (Sigma)/2 ml de HCl 0,1 N.

dilución intermedia: Se toman 25 ul de solución madre y se llevan a 10 ml con HCl 0,1N.

diluciones finales:

| | | | |
|-----------|--------|------------------------|--------------|
| 50 pg : | 20 ul | de dilución intermedia | en 10 ml HCl |
| 100 pg : | 40 ul | " " | " " " " |
| 200 pg : | 80 ul | " " | " " " " |
| 400 pg : | 160 ul | " | " " |
| 500 pg : | 200 ul | " | " " " " |
| 1000 pg : | 400 ul | " | " |

-Preparación de las muestras de tejido:

a) Se homogeniza el tejido en un determinado volumen de HCl 0,1 N.

b) Se toman alícuotas por duplicado para determinar proteínas por el método de Lowry.

c) Se centrifuga el homogenato remanente a 6000 x g por 40 minutos.

d) Del sobrenadante se toman alícuotas de 10 ul por duplicado para el dosaje de 5-HT (muestras a incubar con "NAT +").

e) Se hacen "pools" de los sobrenadantes del tejido de varios animales que corresponden al mismo grupo experimental y se toman 10 ul por duplicado para blanco de tejido (muestras a incubar con "NAT -").

-El día antes de la valoración se cargan tubos de plástico (Eppendorf) de 1,5 ml con los 10 ul de estándares o muestras más 10 ul de solución A. Se guardan en heladera (4° C) hasta el día siguiente.

-El día de la valoración se agregan 10 ul de "NAT +" a los estándares y muestras de tejido y "NAT -" a los blancos de tejido y de curva. Se mantienen en hielo.

-Se agitan los tubos 4 segundos y se ubican en baño de agua-hielo.

-Se incuban 30 minutos a 37° C (Baño de incubación tipo Dubnoff).

-Se para la reacción transfiriéndolos a un baño de agua-hielo.

-Se agregan a todos los tubos 5 ul de "HIOMT" y se ubican inmediatamente sobre hielo.

-Se agitan 4 segundos y se transfieren a un baño de agua-hielo.

-Se incuban 10 minutos a 37° C.

-Se para la reacción transfiriendo los tubos a un baño de agua-hielo.

-Se agregan 100 u l de "MEL-BOR", se agitan inmediatamente 4 segundos y se dejan los tubos destapados a temperatura ambiente.

-Se agrega 1 ml de tolueno y se agitan mecánicamente durante 15 minutos.

-Se transfiere una alícuota de 0,5 ml de la fase orgánica a viales de vidrio.

-Se evapora el solvente de los viales a temperatura ambiente durante toda la noche.

-Se colocan los viales en estufa a 80°C durante 48 hs.

-Se retiran los viales de la estufa, se dejan enfriar y se agregan 8 ml de la mezcla centellante.

-Se cuenta la radiactividad por centelleo líquido (Contador Beckman).

Contenido de cada tubo

| <u>Componente</u> | <u>Estándar</u> | <u>Blanco de reactivo</u> | <u>Muestra de tejido</u> | <u>Blanco de tejido</u> |
|------------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 5-HT | 10 u l | 10 u l | - | - |
| Sobrenadante de tejido | - | - | 10 u l | 10 u l |
| Solución A | 10 u l | 10 u l | 10 u l | 10 u l |
| " NAT + " | 10 u l | - | 10 u l | - |
| "NAT - " | - | 10 u l | - | 10 u l |
| "H10MT" | 5 u l | 5 u l | 5 u l | 5 u l |

3.1.2.2. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección electroquímica.

Este método permite que sean dosados simultáneamente en una misma muestra la 5-HT, su precursor el 5-HTP y su principal metabolito el 5-HIA. Se siguió el método de Koch y Kissinger (1973) al que se le hicieron modificaciones para aumentar la sensibilidad y la resolución.

Descripción del aparato.

El aparato que utilizamos consta de una precolumna C_{18} (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, EE.UU.); una columna de fase reversa Bondapak C_{18} de 30 cm x 3,9 mm (id), tamaño de partícula 10 μ m (Water Associates, Milford, MA., EE.UU.); un detector amperométrico (LC-4 Bioanalytical Systems) con un electrodo de pasta de carbón mantenido a un potencial de 0,50 voltios versus un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

La fase móvil es un buffer $AcOH/AcONH_4$ 0,5 M pH5,10 que contiene 4,8% de metanol (calidad HPLC), preparada con agua tri-distilada (bidestilada con $KMnO_4$) y previamente filtrada y degaseada (1 hora). Es bombeada mediante una bomba de un solo pistón (Altex modelo 110 A) a una velocidad de flujo de 1 ml/min manteniendo la presión de la columna en aproximadamente 1300 psi, y es reciclada.

Todo el equipo es mantenido a temperatura ambiente en una caja eléctricamente aislada.

Las muestras y los estándares se inyectan en una válvula de 6 puertas (Rheodyne, Berkeley, CA., EE.UU.) equipada con

un "loop" de 50 ul.

Tratamiento de las muestras.

-Las muestras individuales de cada tejido se homogenizan en 100 ul de HCl 0,1 N que contiene 400 pg de N-metilserotonina (NMS). Esta se utiliza como estándar interno en la corrida cromatográfica.

-Se toman alícuotas de 10 ul para determinar proteínas por el método de Lowry.

-Los sobrenadantes se guardan en frío hasta el día siguiente en que se inyectan 50 ul en el equipo de HPLC para su dosaje.

Preparación de las soluciones estándares.

Se preparan el mismo día de la toma de muestra.

Soluciones madres: 5-HT: 2,19 mg (serotonina creatinina sulfato)/ 10 ml de HCl 0,1 N.

5-HTP: 1,00 mg (base libre)/10 ml HCl 0,1N

5-HIA: 1,98 mg (dicitclohexilamonio)/ 10 ml HCl

NMS: 1,47 mg (oxalato)/10 ml HCl 0,1 N

(Todas las drogas se adquirieron a Sigma).

Dilución intermedia: Se toman 20 ul de cada solución madre y se llevan a 10 ml con HCl 0,1N, en un mismo matrás.

Diluciones finales:

50 pg : 50 ul de dilución intermedia en 10 ml HC I
 100 pg : 100 ul de dilución intermedia en 10 ml HC I
 200 pg : 100 ul " " " " " " "
 200 pg : 200 ul " " " " "
 400 pg : 400 ul " " " " "

De estas soluciones se inyectan 50 ul, los que contienen 50, 100, 200 y 400 pg respectivamente.

Las cantidades de 5-HT, 5-HIA y 5-HTP en tejido se determinaron midiendo la altura de los picos individuales (Fig. 2), haciendo la corrección con el estándar interno y refiriendo luego la altura corregida a la curva del estándar correspondiente corrido en las mismas condiciones (Fig. 3).

Los tiempos de retención son constantes para cada sustancia.

La sensibilidad que obtuvimos fue alrededor de 50 pg, dependiendo del electrodo de trabajo por lo que éste fue pulido repetidas veces a lo largo de su uso con el fin de asegurar una buena sensibilidad y reproducibilidad.

3.1.3. Técnica de microdissección de áreas cerebrales.

Se utilizó la técnica descrita por Palkovits (1973, 1975) El procedimiento general fue el siguiente:

-Se decapitan los animales y los cerebros son removidos y congelados inmediatamente sobre hielo seco, haciendo una ranura al hielo en la que se apoya la base del hipotálamo.

-Se los coloca sobre las platinas de un micrótopo de congelación mantenido a una temperatura de -10 a -15° C.

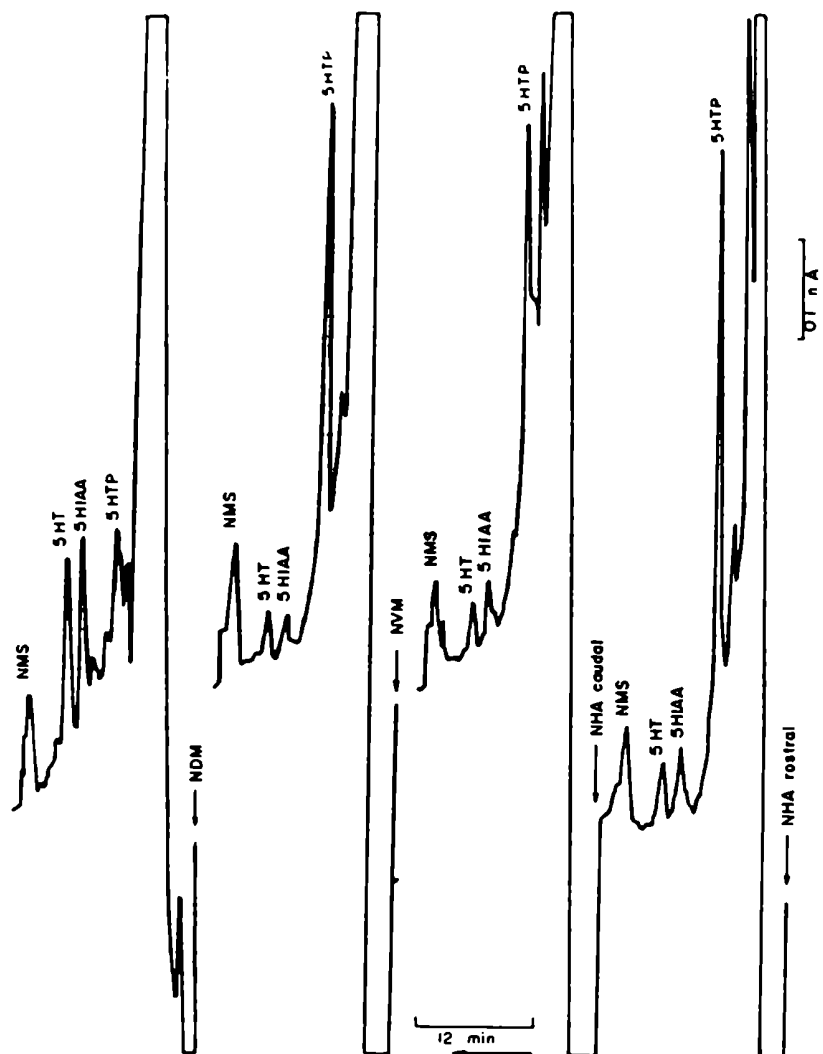


FIG. 2. Cromatogramas de muestras de núcleos hipotalámicos. Núcleo hipotalámico anterior (NHA, sector rostral y caudal), núcleo ventromediano (NVM) y núcleo dorsomediano (NDM)

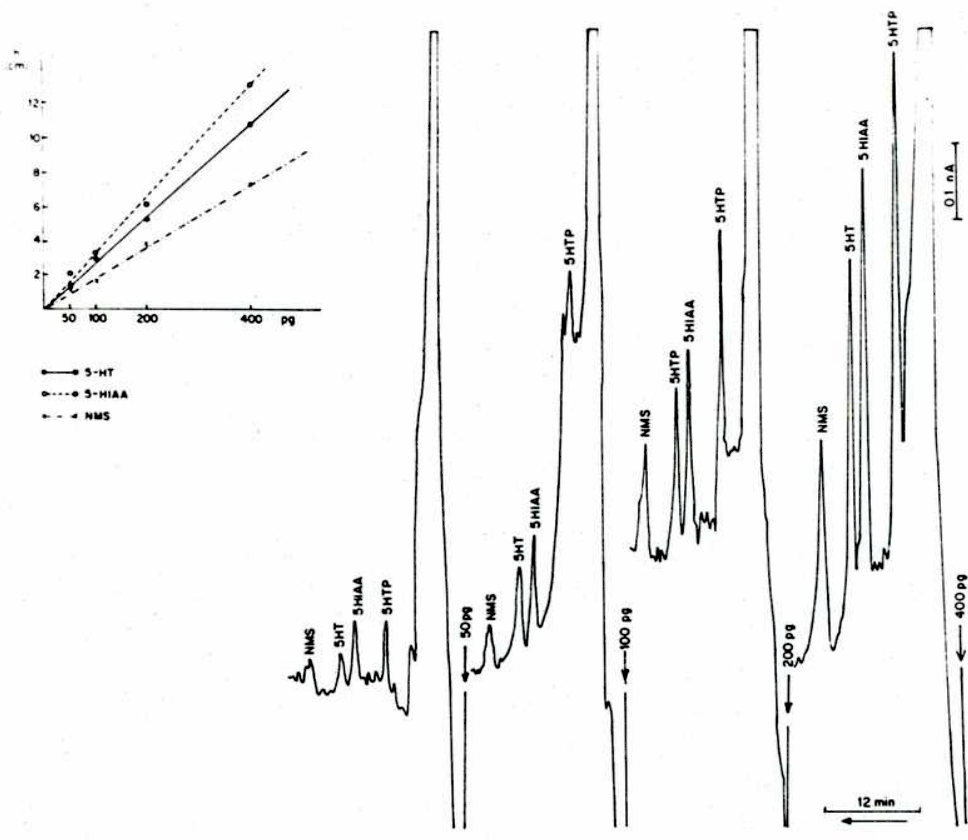


FIG. 3. Cromatogramas de soluciones que contenían serotonina (5-HT) 5-hidroxitriptofano (5-HTP) ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIA) y el estándar interno N-metil serotonina (NMS). Curva de calibración obtenida graficando las alturas (h) de los picos en función de la masa.

-Se realizan cortes frontales de 300um en dirección rostro-caudal.

-Los cortes son montados sobre portaobjetos mantenidos sobre una cápsula de Petri llena de hielo seco.

-Las áreas disecadas son removidas con un sacabocado de 300 o 500 um de diámetro interno bajo una lupa.

-El tejido removido con el sacabocados se coloca sobre el émbolo de un microhomogenizador y se procesa para la valoración correspondiente.

3.1.3.1. El hipotálamo.

Es la parte ventral del diencefalo, se halla localizado debajo del surco hipotalámico formando parte de las paredes laterales y el piso del 3º ventrículo. Sus límites no son muy definidos; en general se considera que la región preóptica forma parte del hipotálamo ya que esta se origina como una diferenciación rostral del hipotálamo.

Constituye una masa difusa de células, que a veces se agregan lo suficiente como para ser consideradas anatómicamente como núcleos. Estos en general no presentan límites definidos y sólo muestran una transición hacia zonas con una densidad pobre de células. En algunos casos, cuando las agregaciones son más difusas se utiliza preferentemente la denominación de área en lugar de núcleo (ver Nauta y Haymaker, 1969).

Para la disección de los núcleos hipotalámicos los cortes frontales de 300 um se comienzan a realizar a nivel de la co-

misura anterior.

El área medial preóptica (POM) constituye un grupo redondo u ovalado de células que no forman una agregación muy marcada y cuyos límites no son muy claros. Se lo remueve de las dos primeras secciones con un sacabocados de 300 um (Fig. 4 A).

El n. paraventricular (NPV) compone junto con el n. supraóptico el principal origen del tracto neurosecretorio hipofisario, destinado al lóbulo posterior de la hipófisis. Ambos están ricamente vascularizados. El NPV constituye un grupo distintivo de células densamente agrupadas que aparece anteriormente en la zona de transición entre las regiones preóptica y supraquiasmática y se extiende caudalmente a lo largo de la pared del 3º ventrículo. Puede ser disecado de las secciones 5 y 6 sobre cada lado del tope del 3º ventrículo usando el sacabocados de 500 um (Fig. 4 B).

El n. supraóptico (NSO) se extiende a lo largo del borde dorso-lateral del quiasma y el tracto óptico. No forma una unidad espacial sino que consiste de dos o tres componentes principales unidos por células dispersas. Es un núcleo alargado en sentido rostro-caudal que tiene su diámetro frontal mayor en las secciones 3, 4 y 5 y se lo remueve con un sacabocados de 500 um (Fig. 4 C).

El n. supraquiasmático (NSC) es una subdivisión prominente de la zona periventricular. Es un núcleo densamente empaquetado de células, ubicado inmediatamente encima del quiasma óptico, pegado a la pared ventral del 3º ventrículo. Tiene una configuración que es particularmente notable en la rata. Se lo

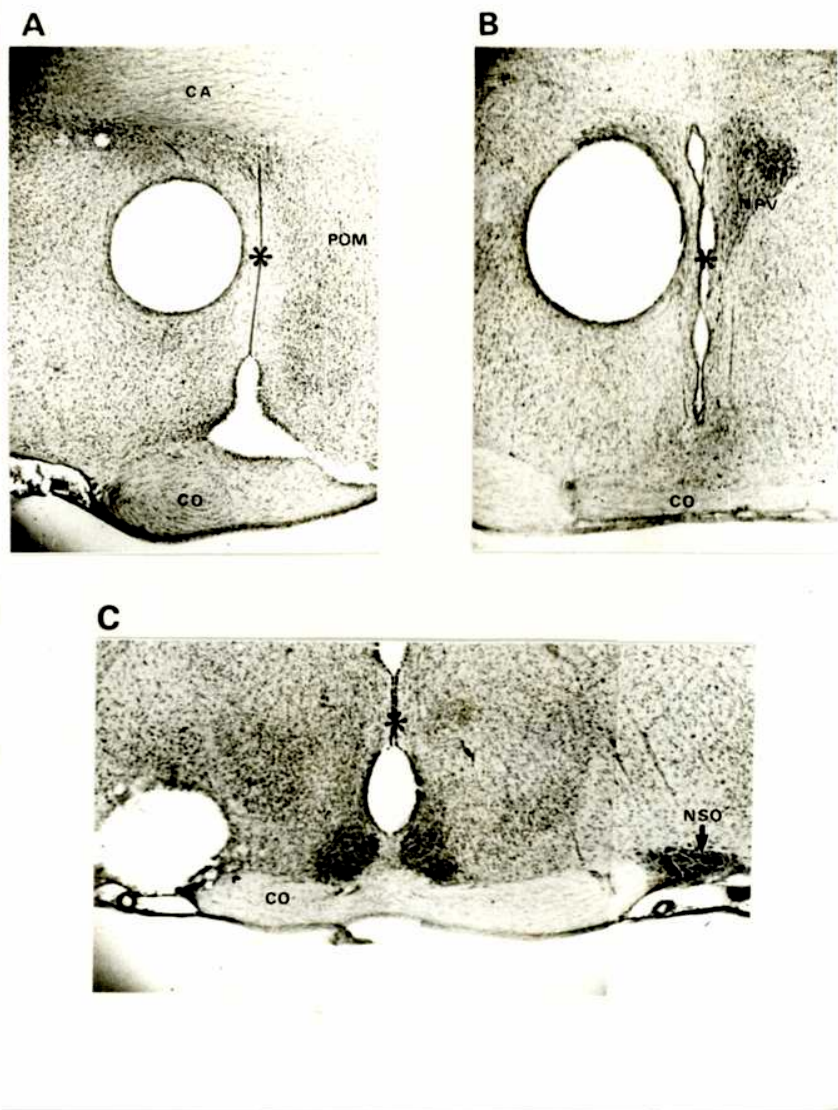


FIG. 4. Secciones coronales de cerebro de rata mostrando la toma de muestra de diferentes áreas hipotalámicas. A: área medial preóptica (POM); B: n. paraventricular (NPV); C: n. supraóptico (NSO). El asterisco señala el tercer ventrículo. A la izquierda del 3° ventrículo se observa el agujero dejado por el sacabocados luego de extraer la muestra del área que se indica a la derecha del mismo. CA: comisura anterior; CO: quiasma óptico.

encuentra en las secciones 3 y 4 y se lo remueve con un sacabocados de 300 μ m (Fig. 5 A).

El n. hipotalámico anterior (NHA) es un agregado de células de densidad media y vagamente delineado pero claramente distinguible en la rata. Ocupa una gran parte del tercio rostral del hipotálamo entre el 3º ventrículo y el fascículo prosencefálico medial. Para la toma de muestra lo hemos subdividido en dos partes: la parte rostral (r NHA), (Fig. 5 B) a cada lado del 3º ventrículo inmediatamente por encima del NSC, se remueve de las secciones 3 y 4 con un sacabocados de 500 μ m; la parte caudal (c NHA) (Fig. 5 C) se encuentra debajo del NPV en las secciones 5 y 6, separado de las paredes del ventrículo y se toma con el mismo sacabocados.

El n. arcuato (NA) se encuentra rodeando la porción más ventral del 3º ventrículo y el comienzo del receso infundibular, extendiéndose ventralmente en la eminencia media. Es un núcleo alargado que junto con las regiones adyacentes constituye el principal origen de las fibras tuberoinfundibulares que terminan en la eminencia media y en el tallo infundibular, en cerrada asociación con los capilares primarios de la circulación porta-hipofisaria. Se lo encuentra en las secciones 7 a 14 y se lo remueve con un sacabocados de 300 μ m (Fig. 5 D).

El n. ventromediano (NVM) es al igual que el NA un núcleo alargado ubicado lateral a éste. En él se distinguen dos condensaciones celulares distintas, una dorsomedial y otra ventrolateral. Se lo remueve con un sacabocados de 300 μ m de las sec-

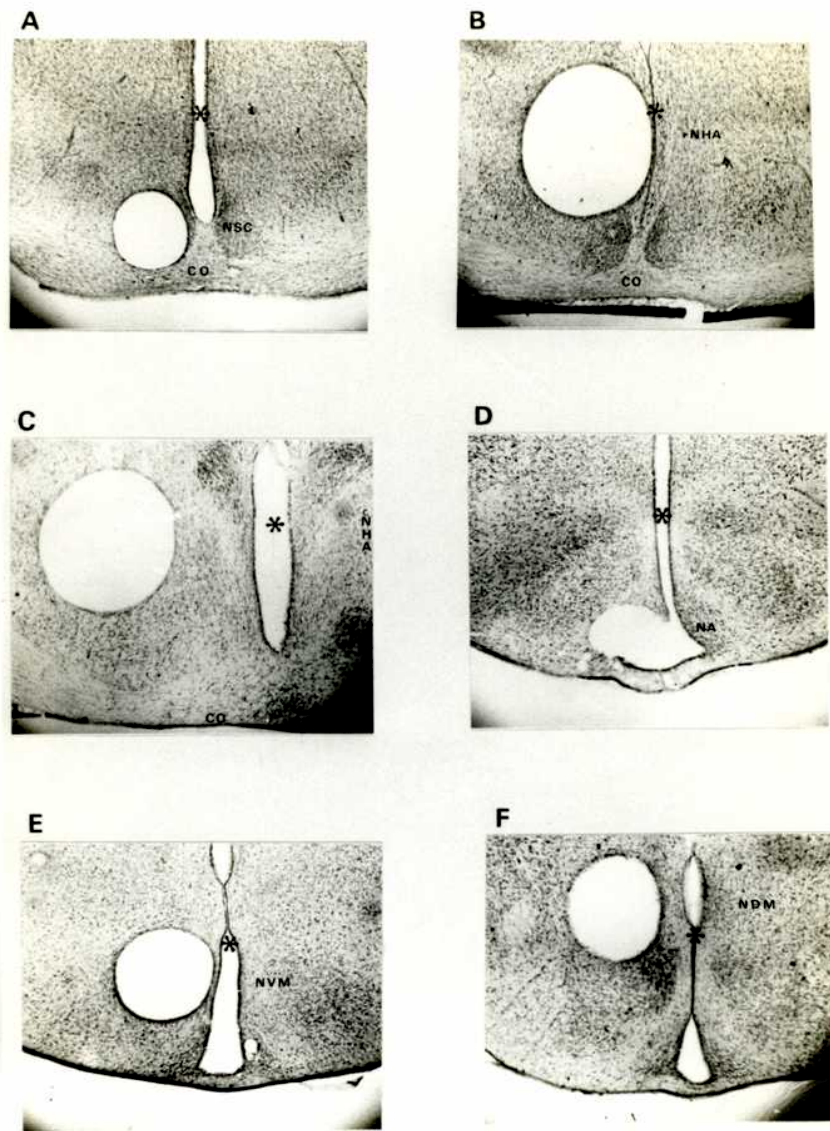


FIG. 5. Secciones frontales de cerebro de rata luego de realizar la toma de muestra de núcleos hipotalámicos. A: n. supraquiasmático (NSC); B: sector rostral del n. hipotalámico anterior (rNHA); C: sector caudal del n. hipotalámico anterior (cNHA); D: n. arcuato (NA); E: n. ventromediano (NVM); F: n. dorsomediano (NDM). Ver figura 4 para más detalles.

ciones 7 a 12 (Fig. 5 E).

El n. dorsomediano (ND M) bordea al 3° ventrículo. Sus bordes dorsal y lateral están pobremente definidos. Se encuentra en las secciones 9-12 en la mitad superior del 3° ventrículo, y se lo remueve con sacabocados de 500 μ m (Fig. 5 F).

La eminencia media (EM) es el sitio anatómico de la interfase entre el cerebro y la hipófisis anterior. Tiene forma ovoide y protrusiona en la cavidad ventricular formando el piso del 3° ventrículo. Está vascularizada por los capilares primarios de los vasos porta-hipofisarios. Se la encuentra en las secciones 9-12 y puede ser observada fácilmente bajo una lupa debajo del piso del 3° ventrículo.

3.1.3.2. Núcleos dorsal y mediano del rafe.

Los grupos nucleares de la línea media del tronco encefálico reciben desde los comienzos de la neuroanatomía el nombre genérico de "núcleos del rafe". Como se mencionó anteriormente, los núcleos dorsal y mediano constituyen el principal origen de las fibras que inervan el hipotálamo.

El n. dorsal del rafe (NDR) es el más grande de los núcleos del rafe y tiene forma alargada; constituye una densa colección de células ubicada en el sector ventral de la sustancia gris periacueductal. La relación rostral del NDR es el núcleo de Edinger-Westphal. A partir de este punto se realizan 7 cortes de 300 μ m de espesor y se toma en los 3 primeros el sector rostral del núcleo y en los restantes el sector caudal, con sa-

cabocados de 500 μm (Fig. 6 A y B).

El n. mediano del rafe (NM R) en la rata es llamado también central superior. Se encuentra en relación ventral con respecto a la sustancia gris periacueductal, por delante de la decusación del pedúnculo cerebeloso superior (desde A 620 μm a 290 μm del atlas de König y Klippel, 1963). Está por delante del sector caudal del NDR; se lo toma en 3 secciones con sacabocados de 500 μm (Fig. 6 C).

(Para una descripción más detallada ver Steinbusch y Nieuwenhuys, 1982 b).

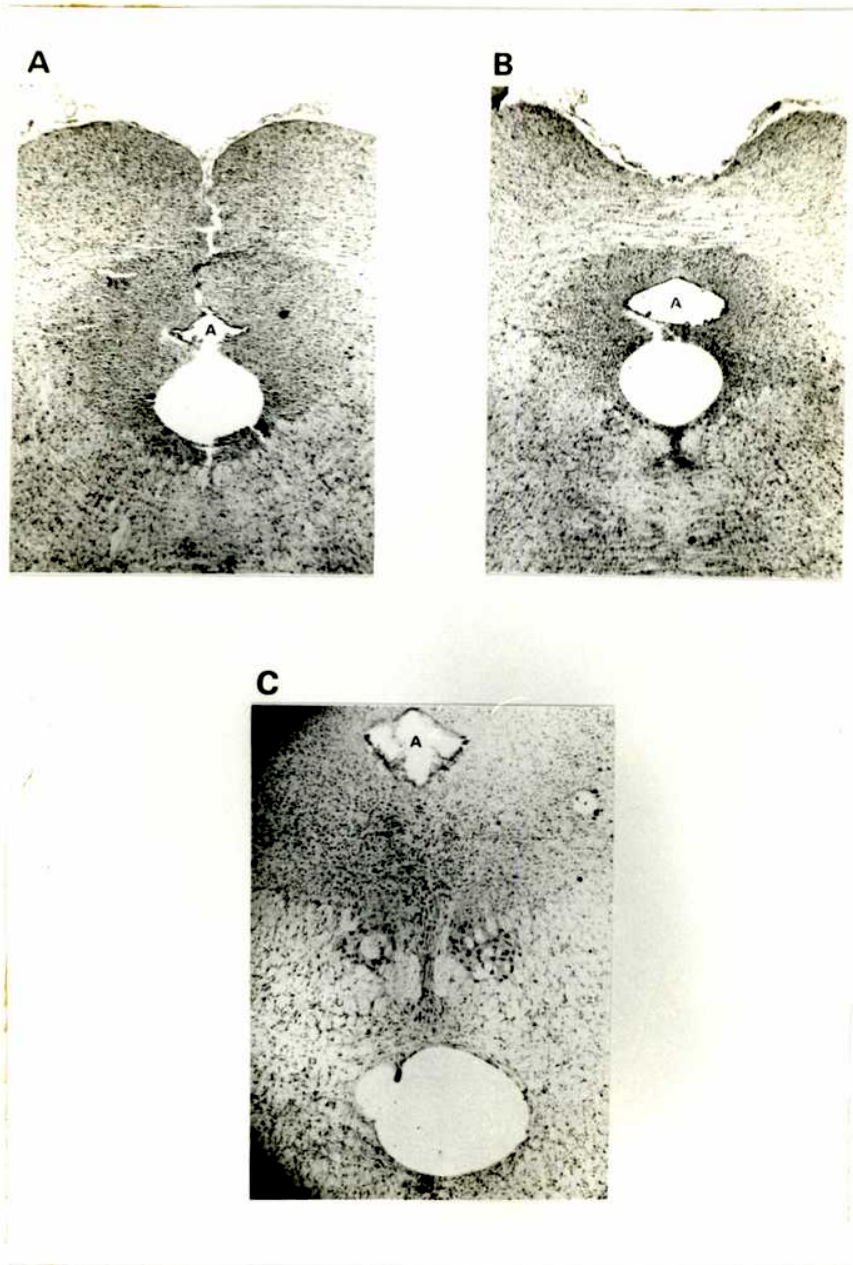


FIG. 6. Microfotografías de secciones coronales de tronco encefálico de rata, donde se observan las tomas de muestras de: A: sector rostral del n. dorsal del rafe (NDR); B: sector caudal del NDR; C: n. mediano del rafe (NMR). En cada una la A indica el acueducto de Silvio.

3.2. MODELO EXPERIMENTAL.

El modelo experimental utilizado es el de la rata lactante con 4 hs de separación de las crías. Cuando se separa la madre de las crías, la PRL plasmática, que se encuentra normalmente elevada, cae a niveles basales y se mantiene baja mientras la rata permanece separada de sus crías. (Amenomori y col., 1970; Chiocchio y col., 1979; Nagy y Halász, 1983). Cuando se vuelve a reunir con sus crías y éstas se prenden a los pezones iniciando un período de succión, la PRL comienza a elevarse a los pocos minutos y alcanza un nivel máximo aproximadamente a los 30 minutos de succión (Subramanian y Reece, 1975; Grosvenor y col., 1979 b).

Se utilizaron ratas lactantes de la cepa Holtzman del bioterio del Instituto de Neurobiología. Cada animal fue mantenido en cajas individuales bajo condiciones constantes de luz-oscuridad (luz encendida de 6 a 20 hs) y con suministro de agua y alimento "ad libitum".

Al día siguiente al nacimiento, cada camada se dejó con 7-8 crías.

Los animales se trasladaron desde la sala del bioterio a una habitación aislada 4-5 días antes de realizar los experimentos.

Se utilizaron básicamente los siguientes grupos experimentales: a) ratas que permanecieron con sus crías hasta el momento de la decapitación; b) animales que fueron separados de sus

crías durante 4 hs y luego decapitados y c) ratas que luego de la separación de 4 hs fueron puestas a succionar por sus crías durante diferentes períodos antes de ser sacrificadas.

En la mañana del experimento, en los grupos con separación, las crías fueron retiradas de las cajas de sus madres entre las 7 y 9 hs. Las camadas individualizadas se conservaron cerca de una estufa para mantener la temperatura corporal hasta que se reunieran con sus madres 4 hs más tarde. El tiempo de succión se consideró desde el momento en que por lo menos 5 crías se prendieron a los pezones.

La caja de cada animal se llevó cuidadosamente a una salita adyacente, donde la madre se sacrificó inmediatamente por decapitación. Todos los animales se mataron entre las 11 y 13 hs. Se tomaron todos los cuidados necesarios para evitar cualquier ruido a lo largo de cada experimento.

4. PERFIL HORMONAL DE LA RATA LACTANTE.

4.1. Objetivos.

El modelo de la rata lactante separada de sus crías y luego puestas a succionar, ha sido utilizado repetidamente para estudiar el control de la liberación de PRL (Kordon y col., 1973/74; Mena y col., 1976; Grosvenor y col., 1980; Grosvenor y Mena, 1980; Johnston y col., 1984 b). Sin embargo, hay datos que indican que la succión induce también la descarga de ACTH, GH, y TSH (Sar y Meites, 1969; Voogt y col., 1969; Zarrow y col., 1972; Blake, 1974; Saunders y col., 1976; Riskind y col., 1984 a y b) e inhibe la secreción de gonadotropinas (Smith y Neill, 1977; Smith, 1978; Isherwood y Cross, 1980), aunque los resultados no son siempre coincidentes.

Por ello, el primer objetivo de este trabajo de Tesis es caracterizar el perfil hormonal de la rata lactante, midiendo en las mismas condiciones experimentales la secreción hormonal anterohipofisaria. Así, estudiamos el efecto de la separación de las crías y de la succión en ratas previamente separadas, sobre los niveles circulantes de las hormonas anterohipofisarias.

4.2. Parte experimental

Se utilizaron los siguientes grupos experimentales durante la segunda semana de lactancia:

a)-Madres que permanecieron con sus crías hasta el momento de la autopsia. Este grupo se denominó "control".

b)-Madres separadas de sus crías durante 4 horas ("0 minuto de succión").

c)-Madres separadas de sus crías durante 4 horas y luego puestas a succionar por períodos de 2, 5, 15 o 30 minutos, respectivamente.

Luego de la decapitación se recogió sangre del tronco para el dosaje de ACTH, FSH, GH, LH, PRL y TSH (sección 3.1.1.1.)

Las comparaciones estadísticas se realizaron por el test "t" de Student (Lewis, 1966) o por análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de Newman-Keuls (Snedecor y Cochran, 1956) según el número de grupos.

4.3. Resultados

En la tabla 1 se muestra el efecto de la remoción de las crías sobre los niveles circulantes de las hormonas anterohipofisarias. Se produce una caída de los valores de PRL ($P < 0,0005$) y TSH ($P < 0,001$), en tanto que se observa un aumento en la concentración de ACTH ($P < 0,02$) y LH ($P < 0,005$). Por otro lado, la separación de las crías no afecta los niveles de FSH y GH.

En la figura 7 se ilustran los efectos de la succión sobre los niveles sanguíneos de las hormonas anterohipofisarias. La concentración de PRL aumenta a los dos minutos de comenzada la succión y el aumento se hace estadísticamente significativo a los 5 minutos ($P < 0,05$). Sus valores continúan e-

TABLA I. Efecto de la separación de las crías sobre los niveles circulan-
tantes de hormonas anterohipofisarias (media \pm error estándar)

| Tratamiento | PRL ng/ml | TSH ng/ml | ACTH pg/ml | LH ng/ml | FSH ng/ml | GH ng/ml |
|---------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------|-------------------|
| Control | 139 \pm 31 (7) | 8 \pm 1,0(9) | 57 \pm 25(9) | 0,4 \pm 0,03(10) | 4,5 \pm 0,95(18) | 4,7 \pm 1,4(9) |
| 0 min succión | 9 \pm 0,7(12) ^d | 3,5 \pm 0,2(10) ^c | 252 \pm 75(7) ^a | 0,6 \pm 0,04(13) ^b | 3,7 \pm 0,45(24) | 5,2 \pm 0,4(13) |

Control: ratas lactantes que permanecieron con sus crías hasta la decapitación.

0 min succión: ratas separadas de sus crías por 4 hs.

El número de animales se muestra entre paréntesis.

Las comparaciones se realizaron por el test "t" de Student:

^ap<0,02

^bp<0,005

^cp<0,001

^dp<0,0005

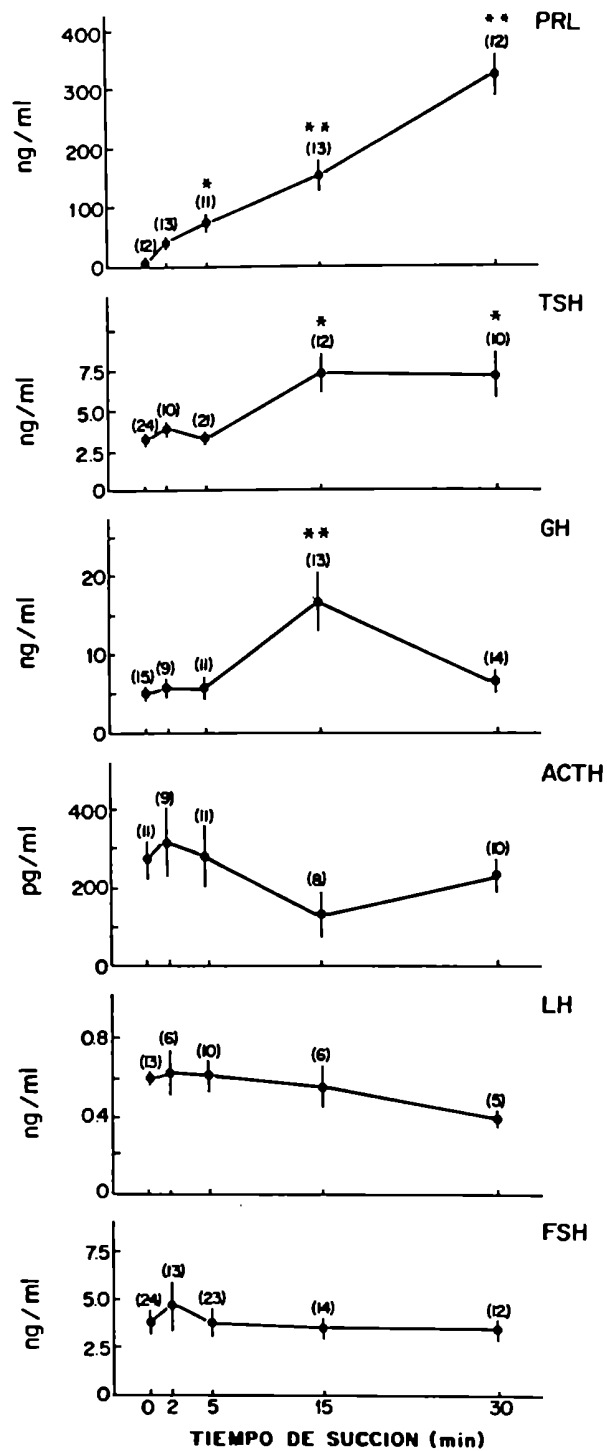


FIG. 7 Efecto de la succión sobre las concentraciones sanguíneas de las hormonas anterohipofisarias en ratas lactantes previamente separadas de sus crías por 4 hs. (media \pm error estándar). El número de animales se indica entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron por ANOVA y test de Newman Keuls: * $p < 0,05$ vs 0 min succión; ** $p < 0,01$ vs 0 min succión.

levándose a los 15 y 30 minutos de succión ($P < 0,01$).

Se observa también un incremento de los niveles de TSH, que se evidencia a los 15 minutos ($P < 0,05$) y se mantiene a los 30 minutos ($P < 0,05$).

El comportamiento de la liberación de GH difiere de los anteriores. Se trata de una descarga aguda que se detecta a los 15 minutos ($P < 0,01$), volviendo a los niveles basales con un tiempo de succión más largo.

Por otra parte, los valores de ACTH y LH, que se habían incrementado por causa de la separación, muestran con la succión una tendencia a descender hacia los valores hallados en las ratas lactantes con sus crías.

Finalmente, la succión no afecta la secreción de FSH en el período estudiado.

4.4. Discusión

Nuestros resultados muestran que la succión ocasiona cambios en la secreción de la mayoría de las hormonas anterohipofisarias.

Cinco minutos de succión inducen solamente un aumento significativo de los niveles séricos de PRL. Los valores séricos de TSH y GH se incrementan con un tiempo más largo de estimulación (15 minutos). Las concentraciones sanguíneas de ACTH y LH presentan una tendencia a disminuir con 15 y 30 minutos de succión. FSH es la única hormona cuya concen-

tracción no sufrió alteraciones durante el período estudiado.

Los datos bibliográficos respecto al perfil de secreción de TSH durante la succión son disímiles: mientras Blake (1974) describió un aumento de TSH, que se produjo por lo menos 5 minutos después del de PRL, Riskind y colaboradores (1984 a y b) no encontraron variaciones de los niveles plasmáticos de TSH.

Por nuestra parte detectamos un incremento significativo en la concentración sérica de TSH luego de 15 minutos de succión, que se mantuvo a los 30 minutos. Es evidente la correspondencia que existe entre los niveles altos encontrados en el grupo control, la inhibición de la secreción de la hormona que se produce cuando se impide aplicar el estímulo de succión y el aumento de sus valores con la succión.

Es interesante destacar que la descarga de PRL precede a la de TSH y que mientras la primera aumenta en sangre unas 30 veces luego de 15 minutos de succión, la TSH lo hace sólo 2 veces. Este hecho arroja dudas sobre la importancia del TRH como factor liberador de PRL durante la succión, como ha sido sugerido anteriormente (Blake, 1984; Riskind, y col., 1984 b).

Tal como se ha descrito (Saunders y col., 1976; Riskind y col., 1984 a y b) la succión induce un incremento de los niveles séricos de GH. Este aumento se produce a los 15 minutos y tiene la forma de una descarga aguda ya que a pesar

de que el estímulo continúa, los valores de GH retornan al nivel basal dentro de 30 minutos. Por otro lado, no se encontró diferencia entre los niveles de GH del grupo control y los animales separados de sus crías.

Según nuestros conocimientos, no existen estudios anteriores acerca de los niveles de ACTH en la sangre circulante de ratas lactantes durante la succión. Sin embargo, hay datos indirectos: se ha descrito un aumento de la concentración de corticosterona en sangre (Voogt y col., 1969; Zarrow y col., 1972) y una caída del contenido hipofisario de ACTH con la succión (Voogt y col., 1969). Nuestros resultados muestran que los niveles plasmáticos de ACTH tienen tendencia a decrecer con 15 minutos de succión, pero el amplio rango de valores no permite que esta caída sea estadísticamente significativa. Es posible que el hecho de haber obtenido las muestras de sangre por decapitación sea la causa de esta gran dispersión.

La separación de las crías incrementa los valores de ACTH, probablemente debido al estrés que ello produce. Se ha observado que algunas formas de estrés inducen la descarga simultánea de PRL y ACTH (Johnston y col., 1985; Kant y col., 1983, 1986). En ratas lactantes la separación de las crías ocasiona, por el contrario, un aumento de ACTH y una caída de PRL, por lo que este modelo permite dissociar las descargas de estas dos hormonas.

Durante la lactancia, tanto la secreción basal (Smith y Neill 1977; Smith 1978, 1981) como la pulsátil (Fox y Smith, 1984) de LH están inhibidas. Esto explicaría los fenómenos de anestro y de impedimento de implantación que ocurren durante este período. Aunque los mecanismos precisos de tal inhibición no se conocen, parece probable que la lactancia decrezca la secreción de LH por alterar los procesos que median la liberación de LH-RH del hipotálamo (Fox y Smith, 1984). Nuestros resultados muestran que la separación de las crías incrementa los valores séricos de LH y que la succión tiende a que estos retornen a los observados en el grupo control.

Contrariamente a los efectos observados sobre los niveles de LH, ni la separación ni la succión alteraron la concentración sérica de FSH. Estos datos coinciden con los de Smith y Neill (1977), quienes encontraron que la lactancia inhibe la descarga basal de LH pero no la de FSH y refuerzan la hipótesis de que existe una regulación diferencial para LH y FSH (Lumpkin y McCann, 1984; McCann y col., 1984).

Tal como ha sido descrito (Terkel y col., 1972; Subramanian y Reece, 1975), la concentración sérica de PRL se incrementa rápidamente con la succión y los valores altos se mantienen durante los 30 minutos. Luego de 5 minutos de aplicado el estímulo, la PRL es la única hormona anterohipofisaria cuyos niveles muestran un aumento significativo.

La PRL y la ocitocina son los componentes más importan-

tes del complejo hormonal hipofisario durante la lactancia. No obstante, también otras hormonas anterohipofisarias son necesarias para el mantenimiento de la síntesis de leche. Esto explicaría en cierto modo las variaciones de los niveles hormonales que ocurren con la separación de las crías y con la succión.

Así, si bien existen diferencias de una especie a otra, en general GH, TSH y ACTH contribuyen a la iniciación y al mantenimiento de la síntesis de leche. El modo de acción de GH no se conoce exactamente, es posible que el efecto se deba a su capacidad para aumentar la glucosa sanguínea, uno de los sustratos esenciales para la formación de leche. TSH probablemente actúe a nivel de su glándula endócrina blanco, ya que se observa un aumento de la actividad tiroidea en respuesta a la succión. Por último, el modo de acción de ACTH parece estar ligado a su habilidad para causar secreción de corticoides, que de una forma aún desconocida afectan la lactancia (Tucker, 1974).

En suma, durante la lactancia se altera la secreción de casi todas las hormonas anterohipofisarias. Este hecho debe tenerse en cuenta cuando se estudian cambios en el contenido y/o "turnover" de neurotransmisores en el SNC. Dichos cambios en general se han atribuido a la participación de los neurotransmisores en el control de la liberación de PRL, sin considerar que los mismos podrían afectar la liberación de

Al respecto, es importante destacar que, en el contexto de la lactancia, la PRL es la única hormona que se libera durante los minutos de succión.

5.1. SEROTONINA E HIPOFISIS.

5.1.1. Objetivos

La presencia de serotonina (Saavedra y col., 1975) y de receptores serotoninérgicos (De Souza, 1986) en la hipófisis, sugiere que la 5-HT podría afectar la función hipofisaria actuando directamente en la anterohipófisis. Esta hipótesis está apoyada por la existencia en el lóbulo anterior de un sistema saturable y específico de captación de 5-HT (Johns y col., 1982) y de monoamino-oxidasa (Saavedra y col., 1975).

Sin embargo, hay resultados contradictorios con respecto al posible efecto directo de la serotonina sobre la descarga de PRL: la 5-HT estimula la secreción de PRL en hipófisis transplantadas debajo de la cápsula renal (Stobie y Shin, 1983), pero no altera su liberación en sistemas "in vitro" (Lamberts y MacLeod, 1978 a; Vitale y col., 1985; 1986).

Existirían dos mecanismos de acción por los cuales la 5-HT podría modificar la liberación de PRL directamente en la hipófisis anterior: a) Actuando sobre receptores serotoninérgicos. Esta 5-HT se originaría en la eminencia media o en el lóbulo hipofisario posterior ("Pars nervosa") y llegaría a la anterohipófisis a través de los vasos porta hipofisarios. b) Que la 5-HT contenida en las células afecte la síntesis, depósito y/o liberación de PRL actuando a nivel intracelular.

Con el objeto de analizar estas posibilidades, hemos estudiado el efecto de la separación de las crías y de la succión

por 5 minutos sobre el contenido de serotonina de la eminencia media y lóbulos hipofisarios.

5.1.2. Parte experimental.

Se utilizaron los siguientes grupos de ratas en su segunda semana de lactancia: a) Madres que permanecieron con sus crías hasta el momento del sacrificio; b) Madres separadas de sus crías durante 4 hs (0 min succión); c) Madres separadas de sus crías por 4 hs y luego puestas a succionar por éstas durante 5 minutos.

Luego de la decapitación se disecaron individualmente la anterohipófisis (AH) y "pars nervosa" (PN) con pinzas finas evitando toda contaminación con lóbulo intermedio. Los cerebros se congelaron sobre hielo seco y se realizó la toma de muestra de eminencia media (EM) según la técnica descrita por Chiochio y colaboradores (1976). Todas las muestras se procesaron para el dosaje de serotonina por el método radioenzimático (sección 3.1. 2.1.). Se recogió sangre del tronco para medir PRL por radioinmunoensayo (sección 3.1.1.1.a).

Los datos se analizaron por ANOVA y test de Newman Keuls.

5.1.3. Resultados

En la tabla II se muestran los valores de serotonina en EM, anterohipófisis y lóbulo posterior, así como la concentración sérica de PRL en las condiciones experimentales es-

TABLA 11.- Concentración de 5-HT en eminencia media, "pars nervosa" y anterohipófisis y niveles séricos de PRL en ratas lactantes (media \pm error estándar).

| Tratamiento | 5-HT (ng/mg profefna) | | | PRL (ng/ml) |
|---------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| | EM | PN | AH | |
| Control | 24,91 \pm 10,97(10) | 1,93 \pm 0,24(8) | 0,90 \pm 0,15(9) | 180 \pm 53*(13) |
| 0 min succión | 13,83 \pm 2,30(9) | 2,58 \pm 0,35(7) | 1,27 \pm 0,15(17) | 41 \pm 4(12) |
| 5 min succión | 22,32 \pm 4,43(12) | 1,95 \pm 0,30(6) | 1,24 \pm 0,25(8) | 196 \pm 17*(11) |

Control: ratas lactantes que permanecieron con sus crías hasta la decapitación.

0 min succión: ratas separadas de sus crías durante 4 hs.

5 min succión: ratas separadas de sus crías por 4 hs y luego puestas a succionar por éstas durante 5 minutos.

El número de animales se indica entre paréntesis

Las comparaciones estadísticas se realizaron por ANOVA y test de Neuman Keuls:

*P<0,01 vs 0 min succión.

tudiadas. El contenido de 5-HT no se modificó en ninguna de las áreas analizadas ni con la separación de las crías ni con la succión, a pesar de los grandes cambios en los niveles circulantes de PRL.

5.1.4. Discusión.

La hipófisis es el sitio de síntesis y secreción de PRL. Por ello, era importante tenerla en cuenta como sitio probable donde operen los mecanismos serotoninérgicos que controlan la liberación de PRL. Al respecto, los datos de la bibliografía son discordantes (Stobie y Shin, 1983; Lamberts y MacLeod, 1978 a; Vitale y col., 1985; 1986). Por nuestra parte, los resultados obtenidos permiten desechar esa hipótesis.

Por un lado, la 5-HT de la eminencia media no se modificó ni con la separación de las crías, ni con el estímulo de 5 minutos de succión. Este resultado coincide con el de Johnston y colaboradores (1984 b), aunque estos autores sólo estudiaron el efecto luego de 30 minutos de succión. Asimismo, durante la secreción de PRL que se produce en la tarde del estro, la concentración de 5-HT de la EM permanece sin variaciones (Parisi y col., 1983). Es decir, que en situaciones fisiológicas en las que hay una descarga masiva de PRL, no hay movimientos simultáneos de la serotonina en la EM.

Por otro lado, tampoco se alteraron los niveles de serotonina de la "pars nervosa". O sea que la 5-HT contenida en la

EM y PN no se libera para actuar "per se" a nivel hipofisario, así como tampoco modularía la acción de un factor liberador de PRL (PRF) en estas estructuras nerviosas.

Quedaba aún la posibilidad de hallar alteraciones intrínsecas en la concentración de 5-HT de la anterohipófisis y asociarlas a los cambios intracelulares que sufre la molécula de PRL antes de ser secretada (Grosvenor y col., 1979 a; 1980; Grosvenor y Mena, 1980). Sin embargo, no detectamos ninguna variación en el lóbulo hipofisario anterior, a pesar de los cambios drásticos en la concentración de PRL como consecuencia de la separación y la succión. Del mismo modo, tampoco se encontraron modificaciones de los valores de serotonina en la hipófisis anterior en los estadios en que se libera PRL durante el ciclo estral (Vitale y col., 1984).

En base a estos resultados experimentales, es posible descartar al lóbulo hipofisario anterior como sitio efector de la serotonina en los procesos que llevan a la secreción de PRL.

5.2. EFFECTOS DE LA SUCCION SOBRE LA CONCENTRACION DE 5-HT Y 5-HIA EN AREAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

5.2.1. Objetivos.

Una serie de datos experimentales sugiere que la serotonina del sistema nervioso central participaría en el control de la secreción de PRL (Clemens y col., 1978; Krulich y col., 1979; Pilotte y Porter, 1981), habiendo sido propuesto el hipotálamo como sitio final efector (Mena y col., 1976; Rowland y col., 1978).

Los resultados descritos en el capítulo anterior permiten descartar a la eminencia media como área involucrada. Sin embargo, otras zonas hipotalámicas intervienen en la regulación de la liberación de PRL en distintas situaciones experimentales: las áreas preóptica supraquiasmática y retroquiasmática (Kawakami y Arita, 1981), el área medial preóptica (Clemens y col., 1976; Kimura y Kawakami, 1978; Freeman y Banks, 1980; Gunnet y Freeman, 1982, 1985; Jakubowski y Terkel, 1986), el n. supraquiasmático (Bethea y Neill, 1980; Kawakami y col., 1980, 1981) y los núcleos dorso y ventromediano (Freeman y Banks, 1980; Gunnet y col., 1981; Gunnet y Freeman, 1982, 1985).

En la rata lactante, Tindal y Knaggs (1977) describieron una zona situada por encima del n. supraquiasmático donde terminarían las vías estimuladoras de la secreción de PRL.

Estudios anatómicos mostraron que la inervación seroto-

ninérgica del hipotálamo se origina principalmente en los núcleos dorsal y mediano del rafe (ver sección 1.2.3.1.). Experimentos farmacológicos sugieren que neuronas serotoninérgicas localizadas en el n. dorsal del rafe median la influencia estimuladora de la 5-HT sobre la secreción de PRL (Advis y col., 1979; van de Kar y Bethea, 1982; Barofsky y col., 1983 a; Vitale y col., 1987).

El objetivo de este estudio es localizar dentro del hipotálamo las vías serotoninérgicas que se activan con la succión. Hemos medido el contenido de 5-HT y 5-HIA en áreas hipotalámicas y mesencefálicas antes y después de aplicar el estímulo de succión a ratas previamente separadas de sus crías.

En estos experimentos utilizamos 5 minutos de succión para poder relacionar alteraciones de la actividad neuronal serotoninérgica con la liberación de PRL.

5.2.2. Parte experimental.

Durante la segunda semana de lactancia, las madres fueron separadas de sus crías por 4 hs y luego decapitadas (0 minuto de succión) o puestas a succionar durante 5 minutos antes de la autopsia (5 minutos de succión). En algunos casos se agregó un grupo de ratas lactantes que permanecieron con sus crías hasta el momento de la autopsia (control).

Luego de la decapitación, los cerebros fueron cuidadosamente removidos, colocados sobre hielo seco y procesados se-

gún la técnica de Palkovits (sección 3.1.1). Se tomaron muestras de area medial preóptica (POM), n. supraquiasmático (NSC), sector rostral (rNHA) y caudal (cNHA) del n. hipotalámico anterior, n. supraóptico (NSO), n. paraventricular (NPV), n. arcuato (NA), n dorsomediano (NDM) y n. ventromediano (NVM) del hipotálamo, así como de los núcleos dorsal (NDR, tercios rostral y caudal) y mediano (NMR) del rafe.

Las muestras de POM y NSC se procesaron para el dosaje de 5-HT por el método radioenzimático (sección 3.1.2.1.). En el resto de los tejidos se midieron las concentraciones de 5-HT y 5-HIA por HPLC (sección 3.1.2.2.). Para comprobar si los resultados obtenidos con el método radioenzimático coinciden con los obtenidos por HPLC, se analizó el contenido de 5-HT en POM y NSC por ambos métodos. Los valores de 5-HT en POM fueron $155,3 \pm 39,3$ y $163,2 \pm 26,5$ pg por HPLC y método radioenzimático respectivamente. En el NSC, los valores encontrados son 179 ± 19 y $174 \pm 26,1$ pg por HPLC y método radioenzimático respectivamente.

Las comparaciones estadísticas se realizaron con el test "t" de Student o con análisis de varianza y test de Newman-Keuls.

5.2.3. Resultados.

En la figura 8 se ilustra el efecto de 5 minutos de succión sobre la concentración de 5-HT en diversas áreas y nú-

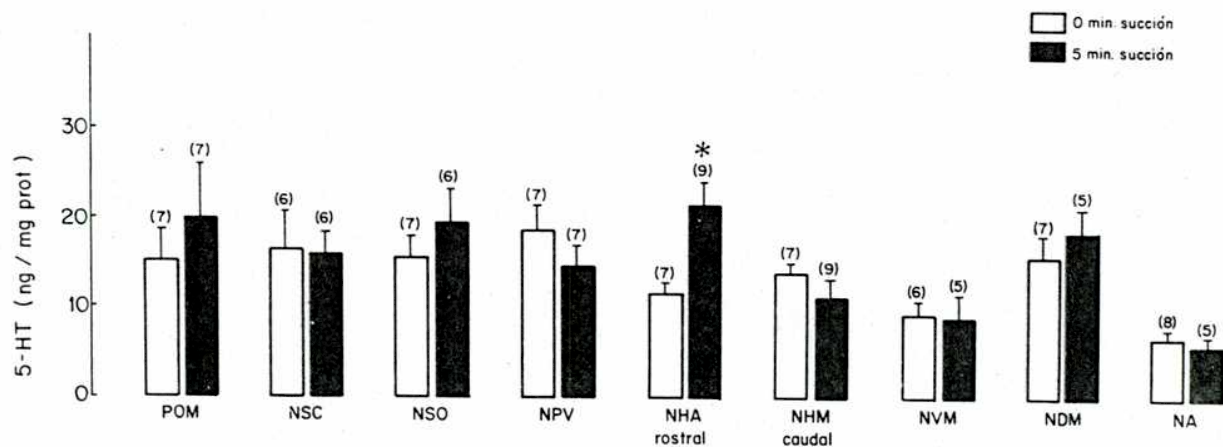


FIG. 8. Efecto de 5 minutos de succión sobre la concentración de serotonina en áreas y núcleos hipotalámicos (media \pm error estándar). Las ratas lactantes fueron separadas de sus crías durante 4 hs. El número de animales se indica entre paréntesis.

* $p < 0,01$ vs 0 min por test "t" de Student.

cleos hipotalámicos. De todas las zonas analizadas, sólo en el sector rostral del n. hipotalámico anterior (rNHA) se observa un aumento significativo del contenido de 5-HT ($P < 0,01$).

Un estudio más detallado muestra que la separación de las crías no afecta los niveles de 5-HT en el rNHA (Fig. 9).

Los valores de serotonina en los tercios rostral y caudal del NDR no alcanzan una diferencia significativa como resultado de la succión (tabla III). Sin embargo, la concentración de 5-HT presenta una tendencia a disminuir con 5 minutos de succión en el tercio rostral del NDR ($P < 0,1$); en tanto que la separación de las crías no altera sus niveles (fig. 10).

No se observa ningún cambio en los valores de serotonina en el NMR (tabla III).

Por otra parte, la succión no altera la concentración de 5-HIA en ninguna de las áreas examinadas (fig. 11 y tabla III).

5.2.4. Discusión.

Mena y su grupo de investigación (1976) proporcionaron las primeras observaciones bioquímicas que sugieren que la 5-HT hipotalámica participa en la secreción de PRL en la ratita lactante. Encontraron que la succión disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo. Más tarde, Barofsky y colaboradores (1983 a) describieron el efecto opuesto bajo las mismas condiciones experimentales. Recientemente, el gru-

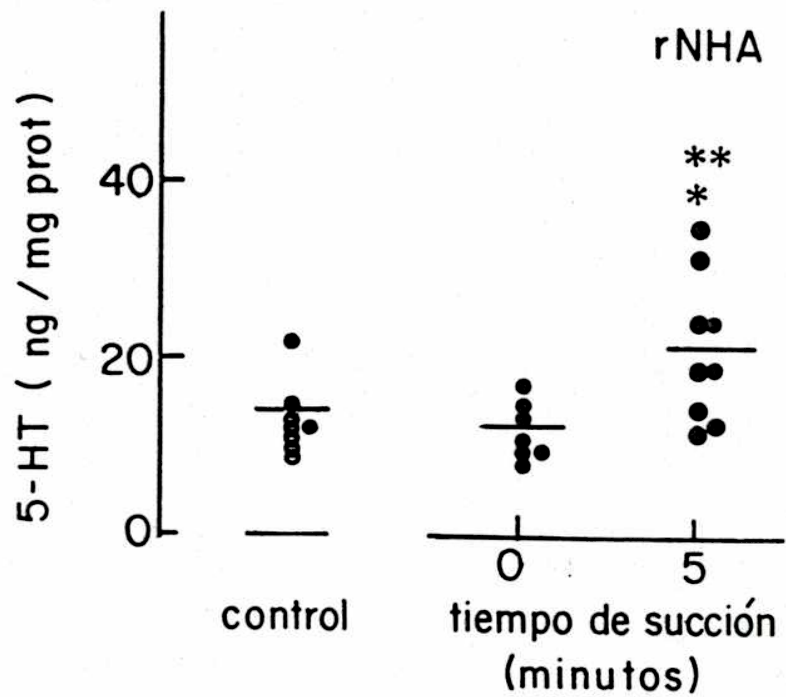


FIG. 9. Concentraciones de serotonina en el rNHA en ratas lactantes con sus crías (control), separadas de sus crías por 4 hs (0 min) y separadas de sus crías por 4 hs y luego puestas a succionar por 5 minutos.

Para el análisis estadístico se usó ANOVA y test de Newman Keuls: ** $p < 0,01$ vs control; * $p < 0,05$ vs 0 min.

TABLA III. Efecto de 5 minutos de succión sobre las concentraciones de 5-HT y 5-HIA en los núcleos dorsal (tercios rostral y caudal) y mediano del rafe. (media \pm error estándar).

| Area | Tratamiento | 5-HT (ng/mg prot) | 5-HIAA (ng/mg prot) |
|-------------|-------------|-----------------------|------------------------|
| NDR rostral | 0 min | 35,6 \pm 9,05 (8) | 30,6 \pm 8,53 (8) |
| | 5 min | 20,0 \pm 2,83 (12) | 28,2 \pm 5,67 (11) |
| NDR caudal | 0 min | 43,2 \pm 13,35 (5) | 40,9 \pm 11,98(5) |
| | 5 min | 39,0 \pm 4,55 (5) | 44,0 \pm 7,82(5) |
| NMR | 0 min | 16,1 \pm 2,70 (5) | 33,6 \pm 6,14(5) |
| | 5 min | 14,1 \pm 3,41 (5) | 25,8 \pm 6,59(5) |

Los animales se separaron de sus crías por 4 hs y luego fueron decapitados (0 min) o puestos a succionar por 5 minutos antes de ser sacrificados.

El número de animales figura entre paréntesis.

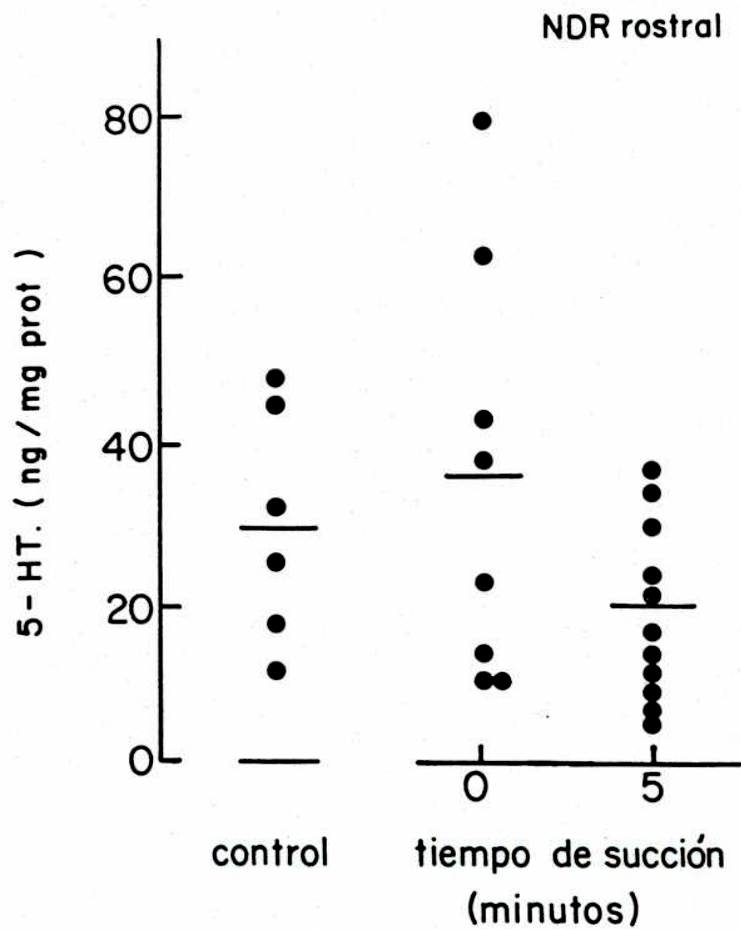


FIG. 10 Concentraciones de serotonina en el tercio rostral del NDR en los grupos control, 0 y 5 minutos de succión. Ver figura 9 para más detalles.

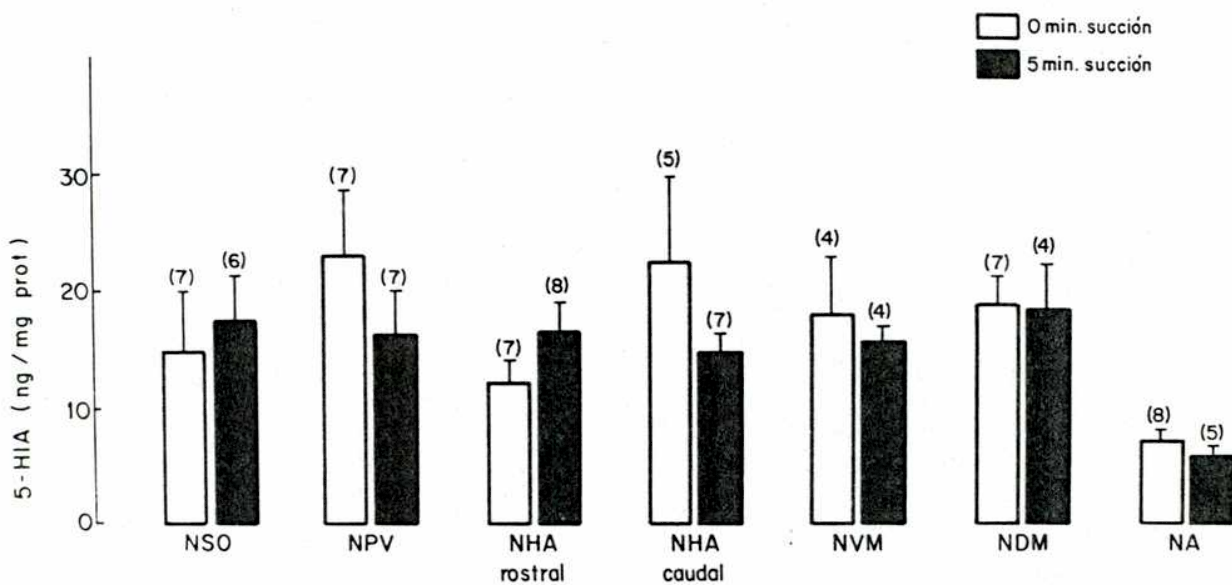


FIG. 11. Efecto de 5 minutos de succión sobre la concentración de 5-HIA de diversos núcleos hipotalámicos (media \pm error estándar). Las ratas lactantes fueron separadas de sus crías durante 4 hs y luego autopsiadas (0 min) o puestas a succionar por 5 minutos. El número de animales se indica entre paréntesis.

po de Johnston (1984 b) observó un aumento de la síntesis y de la concentración de 5-HT en el área medial preóptica (POM) luego de 30 minutos de succión.

En los experimentos que hemos realizado nos restringimos a 5 minutos de succión para poder efectuar una correlación más estrecha entre la liberación de PRL inducida por este estímulo y la actividad del sistema serotoninérgico. Como hemos demostrado en un capítulo precedente, 5 minutos de succión modifica la secreción de PRL sin alterar la descarga de otras hormonas anterohipofisarias.

Nuestros resultados muestran que de todas las áreas hipotalámicas estudiadas la única que responde al estímulo de 5 minutos de succión con una variación del contenido de 5-HT es el sector rostral del n. hipotalámico anterior (Fig. 12). El hecho de que esta variación se circunscriba a una pequeña zona del hipotálamo enfatiza la importancia de la serotonina de este núcleo, respecto de la de otras áreas hipotalámicas, como integrante de los mecanismos nerviosos que desencadenan la descarga de PRL cuando se aplica un estímulo agudo como la succión. Es importante señalar aquí que justamente esta zona fue propuesta por Tindal y Knaggs (1977) como punto terminal de una vía estimuladora de la secreción de PRL en la rata lactante.

La inervación serotoninérgica del rNHA se origina, como la de la mayoría de las áreas hipotalámicas, en los núcleos

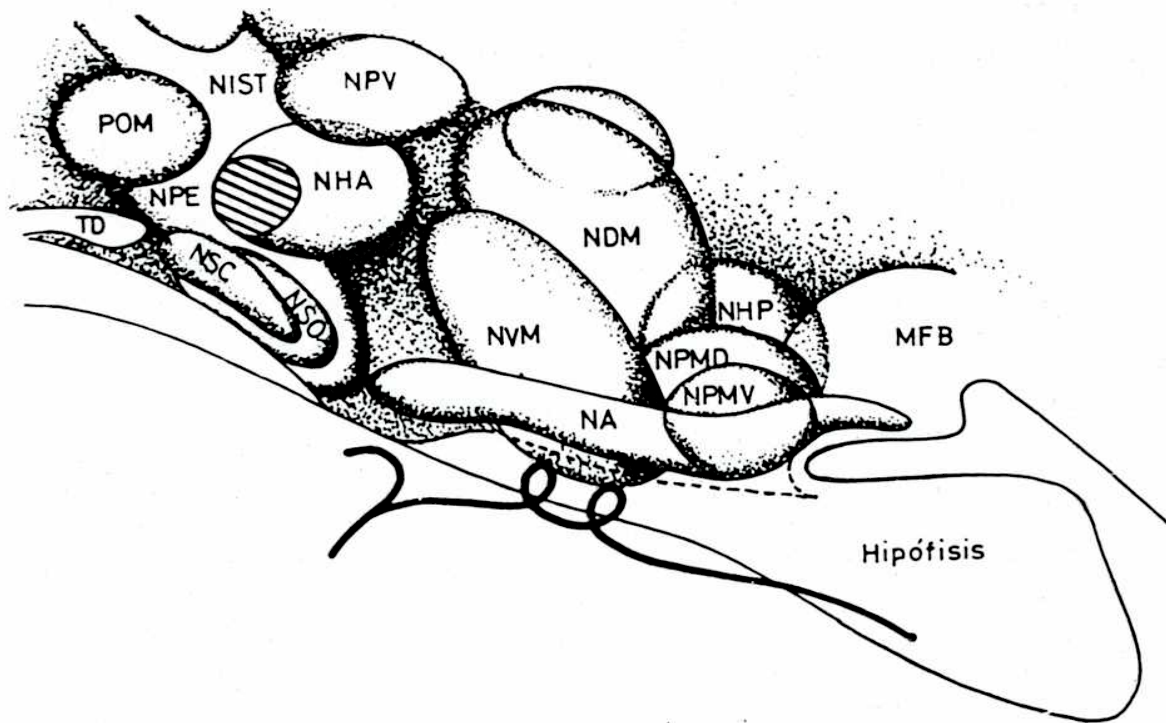



FIG. 12. Diagrama de un corte sagital del hipotálamo donde se muestra el área donde se detectó el cambio en el contenido de 5-HT (Sector rostral del n. hipotálamico anterior, rNHA) . MFB: Fascículo prosencefálico medial; NA: n. arcuato; NDM: n. dorsomediano; NHA: n. hipotálamico anterior; NHP: n. hipotálamico posterior; NIST: n. intersticial de la "stria terminalis"; NPE: n. periventricular; NPMD: n. premamilar dorsal; NPMV: n. premamilar ventral; NPV: n. paraventricular; NSC: n. supraquiasmático; NSO: n. supraóptico; NVM: n. ventromediano; POM: área medial preóptica; TD: n. de la banda diagonal de Broca.

dorsal y mediano del rafe (Dahlström y Fuxe 1964; Azmitia y Segal, 1978). En nuestro estudio, no hemos encontrado modificaciones del contenido de 5-HT en ninguno de los dos núcleos. Sin embargo, la gran dispersión de los valores de 5-HT en el NDR sugiere alteraciones del estado estacionario del neurotransmisor. En este sentido, se ha mencionado que el recambio o la velocidad de síntesis de serotonina en los cuerpos neuronales sería mayor que la velocidad de síntesis de la amina en áreas conteniendo sólo terminales serotoninérgicos (Necker y Meek, 1976; Long y col., 1982).

La concentración del ácido 5-HIA no se modificó en ninguna de las áreas estudiadas. Es posible que 5 minutos no sea un tiempo suficiente para detectar cambios en la concentración de este metabolito. Con un tiempo de succión más largo (30 minutos) Johnston y colaboradores (1984 b) observaron que la concentración del ácido en el área medial preóptica presentaba sólo una tendencia a aumentar.

En síntesis, 5 minutos de succión producen una descarga preferencial de PRL y un aumento de la concentración de 5-HT en un área pequeña localizada en el sector rostral del n. hipotalámico anterior. Estos resultados dan cuenta de una relación temporal entre la descarga de PRL y la actividad de terminales serotoninérgicos en el rNHA, pero no permiten establecer una relación causa-efecto entre ambos fenómenos.

DEL NUCLEO HIPOTALAMI
O DE LESIONES

6. SECTOR ROSTRAL DEL NUCLEO HIPOTALAMICO ANTERIOR: EFECTO DE LESIONES.

6.1. Objetivos.

Hemos encontrado que 5 minutos de succión inducen una liberación preferencial de PRL y un aumento de la concentración de 5-HT únicamente en el sector rostral del núcleo hipotalámico anterior (rNHA). Sin embargo, estos resultados solamente nos permiten establecer una relación temporal entre la descarga de PRL y la actividad neuronal serotoninérgica del rNHA. Para investigar si existe una relación causa-efecto entre ambos fenómenos, examinamos la descarga hormonal de la succión y el crecimiento de las crías tras lesionar bilateralmente el rNHA con una neurotoxina serotoninérgica.

6.2. Parte experimental.

Se aparearon hembras vírgenes, de 220-260 grs y 3 meses de edad, con ratas machos y se controlaron durante la preñez. Antes del parto se las llevó a una sala adyacente y se las colocó en cajas individuales.

El día después del nacimiento (Día 1 de lactancia) se dejó 8 crías a cada madre y se realizaron las lesiones.

Las madres se inyectaron con desmetilimipramina (DMI, 25 mg/kg de peso en solución salina) para evitar la captación del tóxico por las neuronas noradrenérgicas. Treinta minu-

tos más tarde se anestesiaron con Nembutal (40 mg/kg de peso), se colocaron en un aparato estereotáxico y se lesionó el rNHA inyectando 0,1 ul de 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT, adquirida a Sigma, 0,5 mg/20 ul de solución de Ringer conteniendo 0,2% de ácido ascórbico) (Gerson y Baldessarini, 1975). El neurotóxico se administró lentamente con una jeringa Hamilton de 1 ul. Finalizada la inyección, la jeringa se dejó en el lugar durante 10 minutos a fin de evitar el reflujó de líquido en el momento de su extracción.

Un grupo de animales con operación simulada recibió el mismo tratamiento, excepto que fue inyectado con el vehículo solamente (solución de Ringer-0,2% ácido ascórbico). Otro grupo de ratas lactantes, que fue considerado como control, recibió únicamente DMI y anestesia.

El peso de las crías se registró diariamente, luego de vaciar manualmente las vejigas. El número de crías se mantuvo constante en ocho, reemplazando las crías muertas por otras de tamaño similar. También se observó diariamente la conducta materna.

En el día 8 de lactancia, se separaron las crías de sus madres a las 8 hs. Luego de 4 hs de separación, algunas madres fueron decapitadas (0 minuto de succión) y otras se pusieron a succionar por 5 o 15 minutos antes de la decapitación. En estos últimos animales se controló el período transcurrido entre el momento en que las crías se colocaron en

las cajas con sus madres y el instante en que por lo menos 5 crías se prendieron a sus pezones.

Se recogió sangre del tronco para el dosaje de PRL, LH, FSH, GH, TSH y ACTH. Los cerebros se guardaron en formol 10% a los efectos de realizar el control histológico de la extensión de las lesiones. Al cabo de dos semanas se realizaron cortes frontales y se colorearon con la técnica de Nissl.

Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante el test no paramétrico "U" de Mann Whitney (Godstein, 1964). Las pendientes se calcularon por regresión lineal y se compararon por el test "t" de Student.

6.3. Resultados.

6.3.1. Control histológico.

La examinación histológica de las secciones coronales revela que la inyección de 5,7-DHT produjo un daño muy pequeño. Los tractos de la aguja y los sitios de inyección quedaron marcados por proliferación glial y eran de 0,3 mm de diámetro aproximadamente. La administración del mismo volumen del vehículo no ocasionó lesiones visibles en los animales con operación simulada.

En 9 ratas, las inyecciones causaron lesiones restringidas al sector rostral del núcleo hipotalámico anterior (Fig. 13). Estas lesiones se extendían ventralmente casi hasta el borde del n. supraquiasmático y caudalmente no sobrepasaban

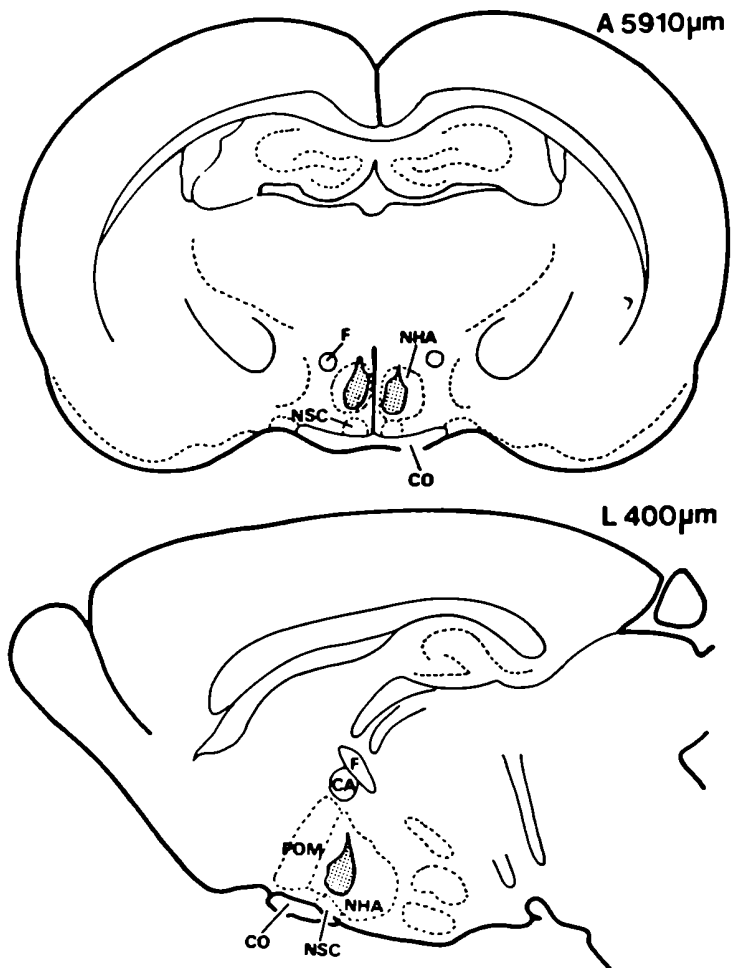


FIG. 13. Diagramas de una sección coronal (A 5910 μm) y una parasagital (L 400 μm) de un cerebro de rata donde se muestra una lesión bilateral del rNHA.

F: fornix, NHA: núcleo hipotalámico anterior; NSC: núcleo supraquiasmático; CO: quiasma óptico; CA: comisura anterior; POM: área medial preóptica. Las coordenadas corresponden al atlas de König y Klippel.

el plano 5780 (König y Klippe, 1963). Estos animales se combinaron para el análisis estadístico con 7 ratas en las que las inyecciones produjeron lesiones en el rNHA que se extendían ventralmente en el n. supraquiasmático. Todos estos animales fueron considerados el grupo con buenas lesiones localizadas en el rNHA. En ninguno de ellos se vió afectada el área preóptica.

En una serie de animales (Fig. 14) las lesiones no tocaron al rNHA sino que dañaron el n. supraquiasmático y a veces el quiasma óptico. En otros, una de las inyecciones lesionó el SNC y del otro lado la zona lateral a éste. También en un caso (R 29, fig. 14) la lesión estaba localizada caudalmente en una zona dorsal al tercer ventrículo y al fornix. Todos estos animales se consideraron mal lesionados.

6.3.2. Efecto de las lesiones del rNHA sobre el crecimiento de las crías.

La fig. 15 muestra el crecimiento de las crías desde el día 1 a 8 de lactancia para los grupos control, con operación simulada, lesionados en el rNHA y mal lesionados. Las crías de los animales con operación simulada crecieron en forma semejante a las del grupo control; en tanto que aquellas cuyas madres tenían las lesiones localizadas en el rNHA crecieron con una velocidad significativamente menos ($P < 0,0001$). Es interesante señalar que las crías de los animales mal le-

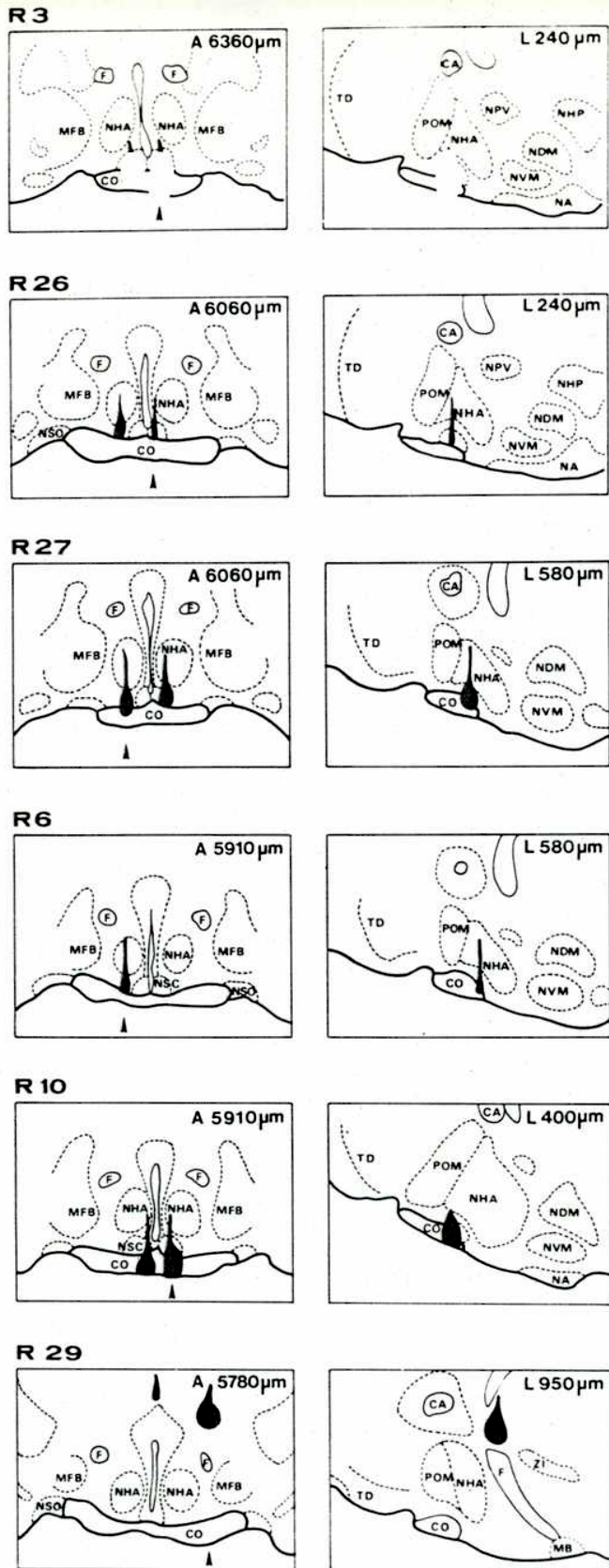


FIG.14. Ilustraciones de secciones coronales y parasagitales mostrando la posición de lesiones mal ubicadas. Los números (R) identifican ratas individuales. Las áreas sombreadas representan la reacción de la microglia producida por las inyecciones. Las flechas en los paneles de la izquierda indican los planos de sección ilustrados en los paneles de la derecha.

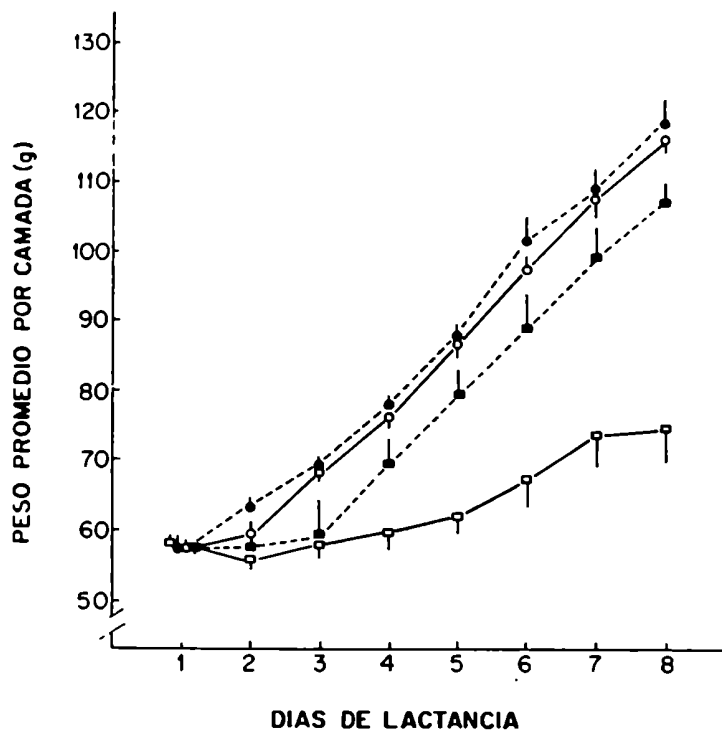


FIG. 15. Curvas de crecimiento de las crías de animales controles ●- - - ● (n=17), con operación simulada ○—○ (n=18), mal lesionados (n=8) y correctamente lesionados en el rNHA □—□ (n=14). Cada punto representa la media - error estándar del peso corporal diario de las 8 crías de cada camada desde el día 1 a 8 de lactancia para cada grupo.

Las pendientes se compararon con el test "t" de Student: $P < 0,0001$ bien lesionados vs control y con operación simulada; $P < 0,0005$, bien lesionados vs mal lesionados.

sionados crecieron en forma similar a las de los grupos control y con operación simulada a partir del día 5 de lactancia ($P < 0,0005$ vs bien lesionados).

La mortalidad de las crías fue baja en todos los grupos y no se observaron diferencias en la conducta materna a lo largo del experimento. En el día 8 de lactancia, cuando las crías retornaron a las cajas de sus madres, el período transcurrido entre el momento del retorno y aquel en que alcanzaron los pezones fue equivalente en los grupos control, con operación simulada y animales bien lesionados (Fig. 16).

6.3.3. Efecto de las lesiones del rNHA sobre la respuesta hormonal de la succión.

La concentración sérica de PRL aumentó con 5 minutos de succión en los animales bien lesionados, pero sus valores fueron claramente más bajos que en los grupos control y con operación simulada ($P < 0,05$; fig. 17). A los 15 minutos de succión, los niveles de PRL continuaron aumentando en los animales controles y con operación simulada. Esto no se observó en los animales bien lesionados ($P < 0,01$; fig. 17). En ellos, los valores de PRL a los 15 minutos fueron similares a los de 5 minutos del mismo grupo.

La fig. 18 muestra que la lesión del rNHA no afectó la respuesta de las restantes hormonas anterohipofisarias al estímulo de la succión. La operación simulada y la lesión

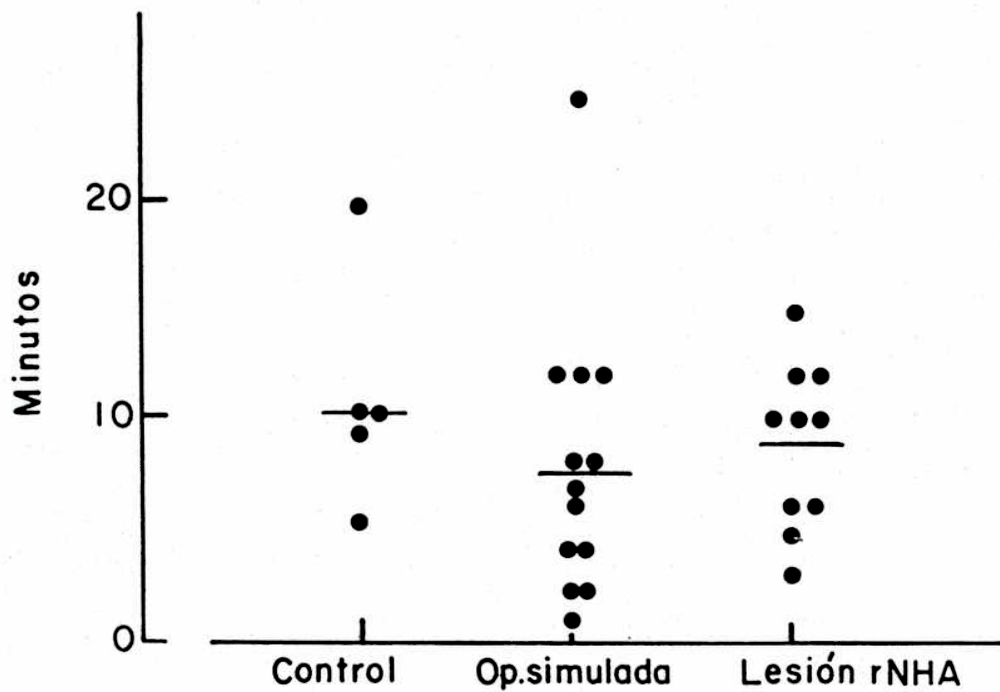


FIG. 16 Tiempo transcurrido entre el momento en que las crías se colocaron en las cajas de sus madres luego de 4 hs de separación y el instante en que por lo menos cinco crías se prendieron a sus pezones, para los grupos control, con operación simulada y lesiones del rNHA.

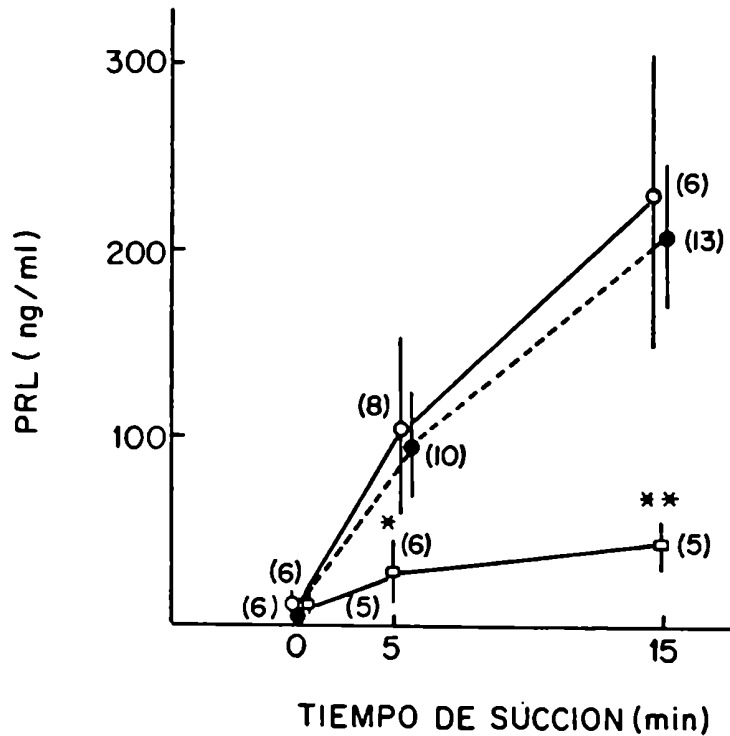


FIG. 17. Efecto de las lesiones en el rNHA sobre la descarga de PRL inducida por la succión (media - error estándar).

En el día 8 de lactancia, las madres se separaron de sus crías por 4 hs y luego fueron decapitadas (0 min) o puestas a succionar por sus crías durante 5 o 15 minutos antes de la decapitación.

●----● control; ○—○ animales con operación simulada; □—□ animales lesionados en el rNHA. El número de animales se indica entre paréntesis.

Las comparaciones se realizaron por el test de Mann Whitney U:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ animales lesionados en el rNHA vs animales con operación simulada y control a los 5 y 15 minutos de succión respectivamente.

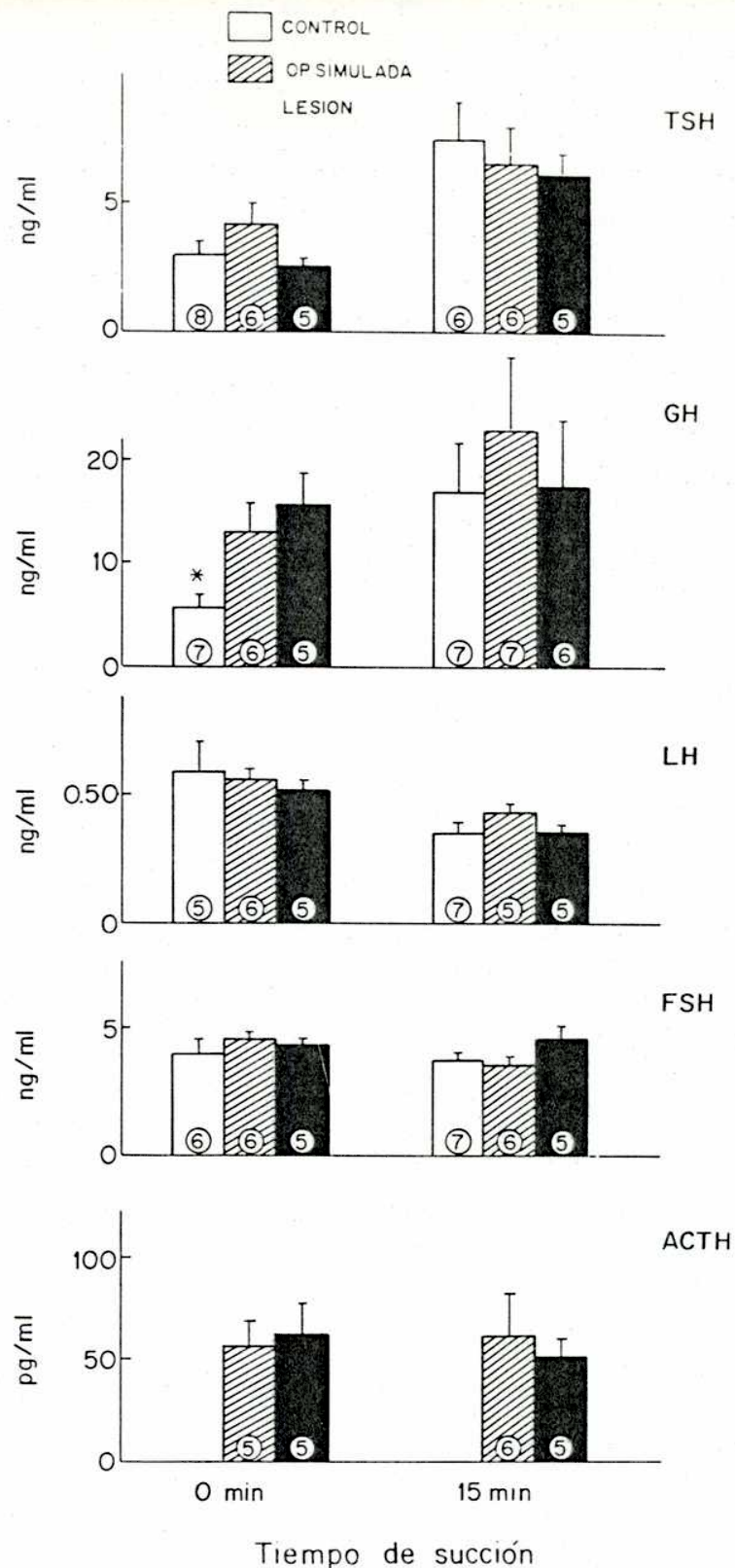


Fig.18. Efecto de la succión sobre los niveles circulantes de TSH, GH, LH, FSH y ACTH en animales correctamente lesionados en el rNHA (media \pm error estándar). Ver figura 17 para detalles. El número de animales se indica en la base de cada barra. Las comparaciones se realizaron por el test de Mann Whitney U: * $P < 0,005$ control vs animales con operación simulada y lesionados en el rNHA.

del rNHA incrementaron los niveles basales (0 minuto de succión) de GH ($P < 0,05$ vs control).

6.4. Discusión

La deservación serotoninérgica del rNHA en ratas lactantes causó una disminución de la velocidad de crecimiento de las crías y una descarga menor de PRL en respuesta al estímulo de succión.

La especificidad de los efectos de las lesiones del rNHA se apoya en los resultados obtenidos en las ratas con lesiones mal ubicadas. En efecto, las lesiones localizadas en áreas cercanas al rNHA no afectaron la velocidad de crecimiento de las crías. Aun más, en cuatro animales con lesiones unilaterales del rNHA, las velocidades de crecimiento de sus crías fueron intermedias entre las de los animales con operación simulada y los bien lesionados.

No obstante, no se puede descartar una contribución parcial del n.supraquiasmático al efecto de las lesiones del rNHA. Hemos clasificado las lesiones según las señales visibles en las secciones histológicas y debe tenerse en cuenta el hecho de que podría producirse una difusión de la neurotoxina hacia áreas próximas, tales como el n.supraquiasmático. De todos modos, en aquellos animales cuyas lesiones afectaron exclusivamente al n.supraquiasmático no hubo impedimento en el crecimiento de las crías ni en la descarga

de PRL inducida por la succión. Más aun, según los resultados del capítulo anterior, la concentración de 5-HT no se alteró en este núcleo con la succión, por lo que el n. supraquiasmático no parece estar involucrado.

Los valores medios de PRL en los animales succionados 5 ó 15 minutos y cuyas lesiones estaban correctamente localizadas en el rNHA, sugieren que esta área sería más crítica para regular la magnitud de la liberación que para controlar el comienzo de la misma.

El hecho de que las lesiones del rNHA no hayan inhibido la descarga de las otras hormonas anterohipofisarias, enfatiza la especificidad del efecto sobre PRL. El incremento en los valores basales de GH tanto en los animales con operación simulada como en los bien lesionados, puede interpretarse como una consecuencia de la interrupción por el tracto de la aguja de fibras, probablemente no serotoninérgicas, involucradas en el control de la secreción de GH en ratas lactantes.

Se ha sugerido la existencia de una vía serotoninérgica que controla la liberación de ocitocina durante la succión (Mizuno y col., 1967; Moos y Richard, 1983). En nuestros experimentos, no podemos descartar una alteración de la descarga de ocitocina por causa de la lesión neurotóxica del rNHA. No obstante, la succión no modificó el contenido de serotonina en los núcleos paraventricular y supraóptico ni

tampoco en el lóbulo hipofisario posterior (ver capítulo 5). Es necesario realizar nuevas investigaciones para dilucidar este problema.

En consecuencia, nuestros datos experimentales sugieren que una vía serotoninérgica que inerva el rNHA influye de una manera estimuladora sobre la secreción de PRL inducida por la succión.

Barofsky y colaboradores (1984 a) encontraron que las lesiones neurotóxicas del n. dorsal del rafe en ratas lactantes, producen un impedimento en el crecimiento de las crías asociado a una disminución de la descarga de PRL inducida por la succión. Ellos propusieron que las neuronas serotoninérgicas que proyectan al hipotálamo estimulan la liberación de PRL.

Tomando en forma conjunta sus datos y nuestros resultados, es probable que el rNHA sea el sitio de terminación de una vía serotoninérgica estimuladora de la secreción de PRL que se origine en el n.dorsal del rafe.

EFFECTOS DE LA SUCCION SOBRE LA CONCENTRA-
CION DE VIP EN AREAS DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL

7. EFECTOS DE LA SUCCION SOBRE LA CONCENTRACION DE VIP EN AREAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

7.1. Objetivos

Nuestras observaciones experimentales permiten postular al sector rostral del n. hipotalámico anterior (rNHA) como el sitio de terminación de una vía serotoninérgica estimuladora de la descarga de PRL.

Datos bibliográficos apoyan la hipótesis de que el principal mecanismo de acción de la 5-HT sobre la secreción de PRL es la estimulación de un factor liberador (PRF) (ver sección 1.2.5.). Nuestros resultados sugieren la localización de neuronas de PRF en el rNHA.

Varias sustancias han sido propuestas como PRF, siendo el VIP un firme candidato (ver sección 1.3.4.). Su posible importancia como PRF fisiológico surge del hecho de que la inmunoneutralización del VIP endógeno inhibe la secreción de PRL inducida por la succión y el estrés (Abe y col., 1985; Kaji y col., 1985).

Por lo tanto, es nuestro objetivo determinar la existencia de neuronas conteniendo VIP en el rNHA, a través de cambios de su concentración. Estudiaremos el efecto de la separación de las crías y de la succión sobre los niveles de VIP en el rNHA. A la vez, compararemos éstos con los de otras áreas del SNC asociadas al control de la liberación de PRL.

7.2. Parte experimental.

Se utilizaron los siguientes grupos de ratas en su segunda semana de lactancia: a) Madres que permanecieron con sus crías hasta el momento del sacrificio; b) Madres separadas de sus crías durante 4 hs (0 min succión); c) Madres separadas de sus crías por 4 hs y luego puestas a succionar por éstas durante 5 minutos; d) Madres separadas de sus crías por 4 hs y luego puestas a succionar por éstas durante 30 minutos.

Luego de la decapitación, se removieron los cerebros y se disecaron las siguientes áreas mediante la técnica de Palkovits (sección 3.1.3): rNHA, NSC, NSO, NPV, NA, EM y tercio rostral del NDR. Las muestras se homogenizaron en 120 ul de ácido acético 1N y se procesaron para el dosaje de VIP por radioinmunoensayo (sección 3.1.1.2).

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante ANOVA y test de Newman Keuls.

7.3. Resultados

En la figura 19 se observa el efecto de la separación de las crías y de la succión en ratas previamente separadas, sobre la concentración de VIP en el rNHA. Los niveles de VIP presentan una tendencia a disminuir con la separación, pero esta caída no es estadísticamente significativa. Por otra parte, 5 minutos de succión producen un aumento de los valores de VIP ($P < 0,05$), los que vuelven a descender con 30 mi-

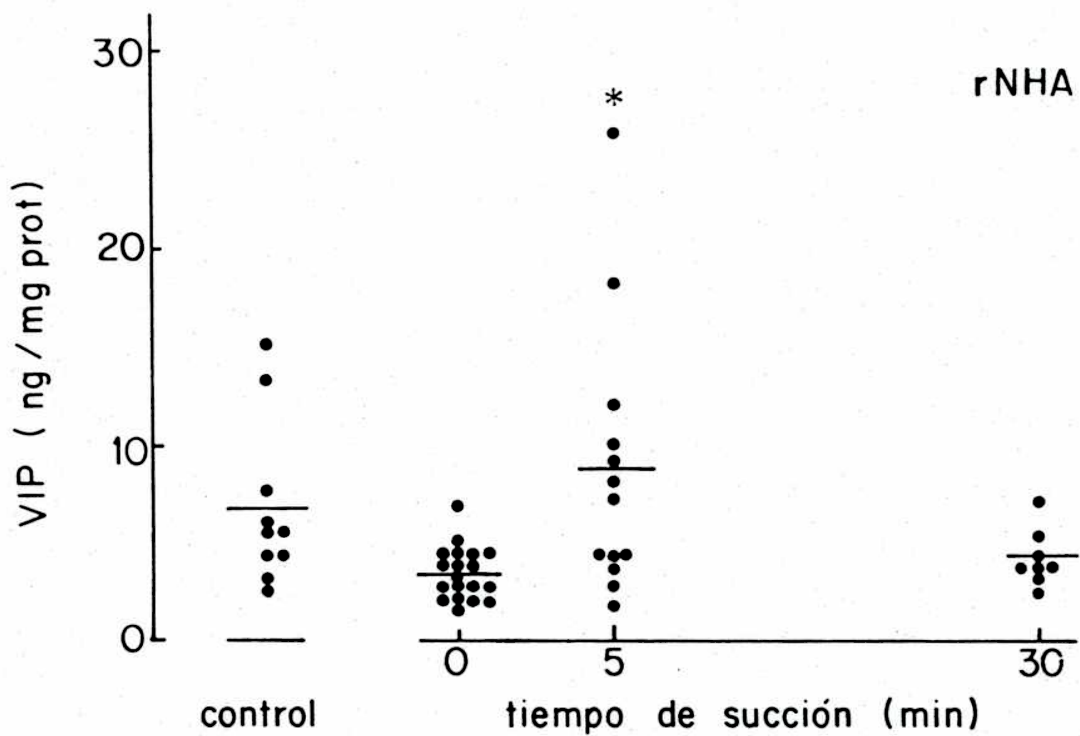


FIG. 19. Efecto de la separación de las crías y de la succión en ratas previamente separadas sobre la concentración de VIP en el rNHA.

* $p < 0,05$ vs 0 y 30 min succión por test de Newman Keuls.

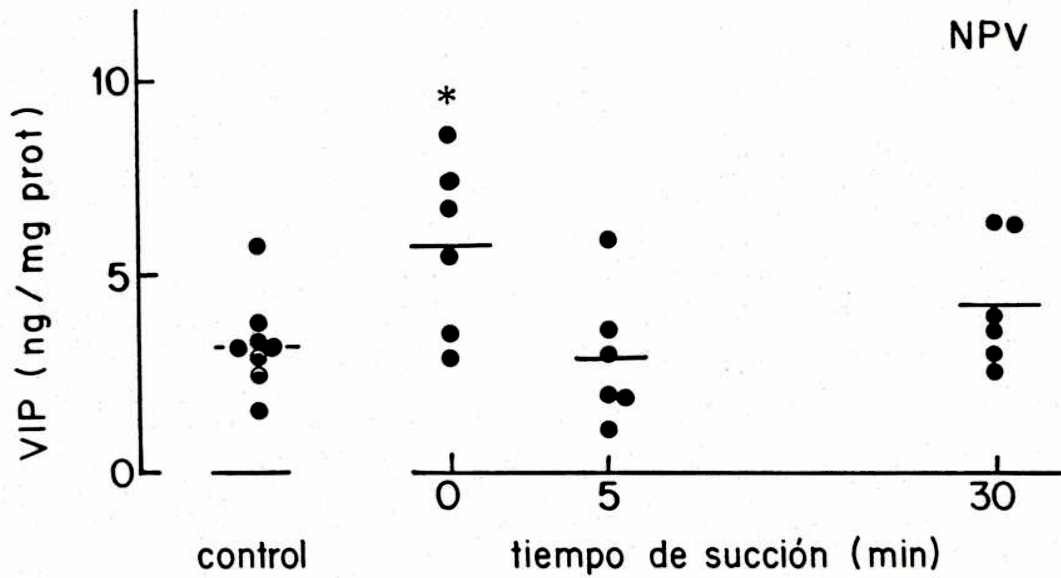


FIG. 20 Efecto de la separación de las crías y de la succión en ratas previamente separadas sobre los niveles de VIP en el NPV.

* $P < 0,05$ vs 5 min succión por test de Newman Keuls.

TABLA IV. Concentración de VIP en áreas del sistema nervioso central (media \pm error estándar).

| Tratamiento | VIP (ng/mg protefna) | | | | NDR rostral |
|----------------|----------------------|--------------------|---------------------|--|--------------------|
| | NSC | NSO | EM | | |
| Control | 7,57 \pm 1,14(8) | 0,99 \pm 0,26(8) | 2,06 \pm 0,51(5) | | 2,10 \pm 0,41(5) |
| 0 min succión | 4,49 \pm 0,74(7) | 0,73 \pm 0,16(7) | 1,88 \pm 0,35(11) | | 1,70 \pm 0,21(8) |
| 5 min succión | 6,57 \pm 1,90(6) | 0,77 \pm 0,13(8) | 2,38 \pm 0,44(12) | | 1,97 \pm 0,44(7) |
| 30 min succión | 6,09 \pm 1,70(7) | 0,53 \pm 0,03(8) | 2,90 \pm 0,92(5) | | --- |

Control: ratas lactantes que permanecieron con sus crías hasta la decapitación.

0 min succión: ratas separadas de sus crías durante 4 hs.

5 min succión: ratas separadas de sus crías por 4 hs y luego puestas a succionar por éstas durante 5 minutos.

30 min succión: ratas separadas de sus crías por 4 hs y luego puestas a succionar por éstas durante 30 minutos.

El número de animales se indica entre paréntesis.

nutos de succión.

En el NPV (Fig. 20), la separación de las crías tiende a aumentar la concentración de VIP, pero este ascenso no es significativo. La succión por 5 minutos decrece significativamente ($P < 0,05$) el contenido de VIP de ese núcleo.

Los valores de VIP no se modificaron en el NSC, NSO, EM y tercio rostral del NDR (Tabla IV) en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas. En el NA, los niveles de VIP permanecieron por debajo del límite de sensibilidad del ensayo.

7.4. Discusión.

Nuestros resultados muestran que la succión por 5 minutos modifica la concentración de VIP en el rNHA. En esta misma área localizamos terminales serotoninérgicos que forman parte de una vía estimuladora de la descarga de PRL inducida por la succión. Existen evidencias de que el VIP hipotalámico está involucrado en el mecanismo de liberación de PRL producida por la 5-HT (Shimatsu y col., 1982; 1983 b; 1984). Más aún, se han descrito contactos entre terminales de 5-HT y somas y dendritas conteniendo VIP en el NSC (Kiss y col., 1984; Bosler y Beaudet, 1985). Según nuestros conocimientos, la posibilidad de que tales contactos se produzcan en el rNHA no ha sido aún investigada. En apoyo de esta hipótesis, es interesante destacar que en la rata lactante medimos las mayores concentracio-

nes de VIP en el rNHA y NSC, entre todas las áreas hipotalámicas estudiadas. Esto no ocurre en la rata macho, en la que sólo los niveles de VIP del NSC superan a los de los restantes núcleos del hipotálamo (Rostene y col., 1982). Es posible entonces que en la rata lactante se hagan visibles cuerpos neuronales de VIP en el rNHA, tal como ocurre en el NPV (Mezey y Kiss, 1985).

Hemos detectado también cambios en la concentración de VIP en el NPV. Se ha postulado la participación de un PRF contenido en este núcleo en la regulación de la secreción de PRL en la rata lactante (Kiss y col., 1986).

Dado que en el NPV se han descrito tanto terminales (Card y col., 1981) como cuerpos neuronales de VIP (Mezey y Kiss, 1985) dichos cambios pueden interpretarse de varias maneras:

- a) Que representen modificaciones del VIP localizado en los terminales. Estos terminales podrían estar en contacto con neuronas de un PRF. Cabe mencionar al respecto que la ocitocina ha sido propuesta como PRF (McCann y col., 1984).
- b) Que representen alteraciones del VIP presente en los somas. Hay evidencias indirectas de que estas neuronas proyectarían a la eminencia media (Mezey y Kiss, 1985). En este caso, el VIP se constituiría en PRF a este nivel.

Nuestros resultados no apoyan esta última hipótesis dado que no se modificó la concentración de VIP de la EM en ninguna de las situaciones examinadas. No obstante, se ha pensado

que un recambio muy rápido del péptido impediría detectar cambios de su contenido en la EM (Rostene, 1984).

Por otra parte, hay datos que sugieren que la inervación del hipotálamo mediobasal se originaría en el mesencéfalo (Besson y col., 1979; Marley y col., 1981). La falta de alteraciones de los valores de VIP en la EM y en el tercio rostral del NDR indicarían que esta vía no estaría involucrada en la liberación de PRL en la rata lactante.

Resumiendo, hemos observado que con 5 minutos de succión se producen variaciones en los niveles de VIP en el rNHA, la misma zona donde detectamos terminales serotoninérgicos que participan en la descarga de PRL inducida por la succión. Este hecho permite suponer que una vía VIPérgica interviene a ese nivel en el control de la secreción de PRL en la rata lactante.

8.- CONCLUSIONES.-

El presente trabajo de Tesis confirma el rol estimulador de la 5-HT sobre la liberación de PRL; describe el perfil hormonal de un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la fisiología de la lactancia: la rata separada 4 horas de sus crías y luego colocadas a succionar por diferentes períodos de tiempo; localiza el sitio de acción de la serotonina y determina la importancia fisiológica de la inervación serotoninérgica de dicha área en la descarga de PRL inducida por la succión. El hallazgo del sitio de terminación de una vía serotoninérgica estimuladora de la liberación de PRL permite la localización de neuronas conteniendo un probable factor liberador de PRL (PRF) fisiológico, el VIP, ya que se ha postulado que la serotonina participa en el control de PRL actuando a través de la liberación de un PRF.

Los experimentos iniciales, diseñados para caracterizar el perfil hormonal de la rata lactante, mostraron que la succión induce modificaciones en los niveles circulantes de la mayoría de las hormonas anterohipofisarias. La succión aguda (5 minutos) produce solamente una descarga significativa de PRL. GH y TSH aumentan con una estimulación más prolongada (15 minutos); mientras que los valores plasmáticos de ACTH y los niveles séricos de LH presentan una tendencia a descender a los 15 y 30 minutos de comenzada la succión. FSH es la única hormona que no se alteró durante los tiempos examinados.

Los datos experimentales obtenidos muestran que 5 minutos

de succión permiten disociar la secreción de PRL de la liberación de otras hormonas anterohipofisarias. Utilizando ese tiempo de succión se determinó el contenido de 5-HT y 5-HIA en diferentes áreas cerebrales e hipofisarias con el objetivo de detectar cambios en la actividad del sistema serotoninérgico asociados a la descarga de PRL inducida por la succión.

La falta de alteraciones de la concentración de 5-HT en el lóbulo hipofisario anterior descarta un sitio de acción intracelular a ese nivel de la serotonina sobre la secreción de PRL. Del mismo modo, la ausencia de variaciones en la eminencia media y "pars nervosa" permite desechar la posibilidad de que terminales serotoninérgicos modulen la liberación de un PRF en esas estructuras nerviosas.

De todas las áreas analizadas, solamente se encontró un cambio significativo del contenido de 5-HT en el sector rostral del núcleo hipotalámico anterior (rNHA).

Con 5 minutos de succión se produce una reagrupación de los valores de 5-HT en el sector rostral del núcleo dorsal del rafe, aunque la diferencia no alcanza significación estadística. Esto sugiere movimientos del estado de equilibrio del neurotransmisor.

La modificación de la concentración de 5-HT en el rNHA a los 5 minutos de succión, asociada temporalmente a la descarga de PRL, nos llevó a investigar una probable relación causa-efecto entre ambos fenómenos.

La desnervación serotoninérgica del rNHA con una neurotoxina específica para terminales serotoninérgicos (5,7-DHT) indujo un decremento de la secreción de PRL y una alteración de la ganancia de peso de las crías. Esta disminución del crecimiento de las crías de madres correctamente lesionadas, se acompañó de un comportamiento maternal similar al de las madres con operación simulada y controles.

La especificidad de la lesión está dada por la normalidad de la secreción de PRL y del crecimiento de las crías de ratas lactantes en las cuales la lesión se localizó fuera del rNHA. Más aun, la lesión del rNHA afectó la liberación de PRL sin alterar la secreción del resto de las hormonas anterohipofisarias.

Observando los resultados, el rNHA surge como un área crítica en la regulación de la magnitud de la descarga de PRL.

La información obtenida permite postular al rNHA como el sitio de terminación de una vía serotoninérgica, que se activa con la succión, estimuladora de la liberación de PRL. A la vez, sugiere la localización en este núcleo de neuronas de un PRF fisiológico.

La existencia de contactos sinápticos entre fibras serotoninérgicas y cuerpos neuronales conteniendo VIP en un área muy próxima al rNHA, apoyaba la hipótesis de que el VIP localizado a ese nivel participara en la descarga de PRL inducida por la succión.

Los experimentos posteriores se realizaron para investigar variaciones de la concentración de VIP en el rNHA y otras áreas cerebrales en el mismo modelo donde se estudiaron alteraciones de la actividad del sistema serotoninérgico.

De todas las áreas examinadas, solamente se produjeron modificaciones de los niveles de VIP en dos núcleos hipotalámicos: el rNHA y el NPV.

Es difícil interpretar cambios de contenido de neurotransmisores, sobre todo si se trata de neurotransmisores peptidérgicos cuyos aspectos metabólicos son aún desconocidos. Solamente podemos decir que cambios de contenido representan salidas del estado estacionario del sistema.

Aunque un grupo de neuronas VIP-inmunorreactivas ha sido descrito en el área medial preóptica, el NSC es el único núcleo del hipotálamo donde se han encontrado repetidamente cuerpos neuronales conteniendo VIP en la rata macho (Lorén y col., 1979; Samson y col., 1979; Sims y col., 1980; Card y col., 1981; Palkovits y col., 1981). Recientemente se describieron neuronas VIPérgicas en el NPV de la rata lactante (Mezey y Kiss, 1985).

En el presente estudio, detectamos una modificación de la concentración de VIP en el NPV con 5 minutos de succión. Ese cambio podría estar asociado a la liberación de PRL que se produce en esta situación. Apoya esta hipótesis el hecho de que el NPV ha sido propuesto como sitio donde se localizan neuronas de un PRF: la destrucción electrofónica del núcleo disminuye la descarga de PRL inducida por la succión (Kiss y col., 1986).

Con respecto al rNHA, hemos encontrado también cambios significativos de los valores de VIP con el mismo tiempo de succión. La concentración de VIP en el rNHA es similar a la del NSC en la rata lactante. Sin embargo, en la rata macho los niveles de VIP del NSC son el doble de los encontrados en los restantes núcleos hipotalámicos (Rostene y col., 1982). Estos resultados sugieren investigar con técnicas inmunohistoquímicas la presencia de cuerpos neuronales conteniendo VIP en el rNHA de la rata lactante.

En síntesis, los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis permiten postular que terminales serotoninérgicos del sector rostral del núcleo hipotalámico anterior forman parte de una vía estimuladora de la descarga de PRL inducida por la succión. Los cambios de contenido de VIP producidos por la succión en dicha área, apoyan la hipótesis de que neuronas VIPérgicas localizadas en el sector rostral del núcleo hipotalámico anterior estarían involucradas en el control de la secreción de PRL.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

ABE H, ENGLER D, MOLITCH ME, BOLLINGER-GRUBER J, REICHLIN S (1955) Vasoactive intestinal peptide is a physiological mediator of prolactin release in the rat. *Endocrinology* 110:1353.

ADVIS JP, HALL TR, HODSON CA, MUELLER GP, MEITES J (1977) Temporal relationship and role of dopamine in "short loop" feedback of prolactin. *Proc Soc Exp Biol Med* 155:567.

ADVIS JP, SIMPKINS JW, BENNET J, MEITES J (1979) Serotonergic control of prolactin release in male rats. *Life Sci* 24:559

ALVAREZ EO (1984) Effects of histamine antagonists injected in the preoptic-anterior hypothalamic area on the prolactin surge induced by estrogen in ovariectomized rats. *Brain Res Bull* 12:11.

AMENOMORI Y, CHEN CL, MEITES J (1970) Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. *Endocrinology* 86:506.

APUD JA, RACAGNI G, IULIANO E, COCCHI D, CASANUEVA F, MUELLER EE (1981) Role of central nervous system-derived or circulating gamma-aminobutyric acid on prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 108:1505.

ARNAOUT MA, GARTHWAITE TL, MARTINSON DR, HAGEN TC (1986) Vasoactive intestinal polypeptide is synthesized in anterior pituitary tissue. *Endocrinology* 119: 2052.

AZMITIA EC, SEGAL M (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 179:641.

BANZAN AM, DONOSO AO (1983) Enhanced prolactin release by injection of glycine in the medial preoptic area (mPOA) of the rat. *Brain Res Bull* 10:9.

BAROFSKY A-L, TAYLOR J, MASSARI VJ (1983 a) Dorsal raphe-hypothalamic projections provide the stimulatory serotonergic input to suckling-induced prolactin release. *Endocrinology* 113:1894.

BAROFSKY AL, TAYLOR J, TIZABI Y, KUMAR R, JONES-QUARTEY K (1983 b) Specific neurotoxin lesions of median raphe serotonergic neurons disrupt maternal behavior in the lactating rat. *Endocrinology* 113:1884.

BAUMANN P (1985) Transport systems and enzymes involved in the metamorphosis of tryptophan into serotonin. *Pharmacopsychiat* 18:188.

BEAUDET A, DESCARRIES L (1979) Radioautographic characterization of a serotonin accumulating nerve cell group in adult rat hypothalamus. Brain Res 160:231.

BECU DE VILLALOBOS D, LUX V, LACAU DE MENGIDO I, LIBERTUN C (1984) Sexual differences in the serotonergic hormone secretion in the rat. Endocrinology 115:84.

BEN-JONATHAN N, OLIVER C, WEINER HJ, MICAL RS, PORTER JC (1977) Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. Endocrinology 100:452.

BEN-JONATHAN N (1985) Dopamine: A prolactin-inhibiting hormone. Endocrine Rev 6: 564.

BESSON J, ROTSZTEJN W, LABURTHE M, EPELBAUM J, BEAUDET A, KORDON C, ROSSELIN G (1979) Vasoactive intestinal peptide (VIP): brain distribution, subcellular localization and effect of deafferentation of the hypothalamus in male rats. Brain Res.165:79.

BETHEA CL, NEILL JD (1980) Lesions of the suprachiasmatic nuclei abolish the cervically stimulated prolactin surges in the rat. Endocrinology 107:1.

BIRGE CA, JACOBS LS, HAMMER CT, DAUGHADAY WH (1970) Catecholamine inhibition of prolactin secretion by isolated rat adenohypophysis. Endocrinology 86: 120.

BISHOP W, FAWCETT CP, KRULICH L, MCCANN SM (1972) The effects of hypothalamic lesions on the release of gonadotrophins and prolactin in response to estrogen and progesterone treatment in female rats. *Endocrinology* 91:643.

BLAKE CH A (1974) Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrous rats. *Endocrinology* 94:503.

BODANSZKY M, KLAUSNER YS, SAID SI (1973) Biological activities of synthetic peptides corresponding to fragments of and to the entire sequence of the vasoactive intestinal peptide. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 70:382.

BOGDANSKY DF, PLETCHER A, BRODIE BB, UDENFRIEND S (1956) Identification and assay of serotonin in brain. *J Pharmacol Exp Ther* 117:82.

BOSLER O, BEAUDET A (1985) Relations ultrastructurales entre systèmes monoaminergiques et peptidergiques dans l'hypothalamus. Approche radioautographique et immunocytochimique couplée dans le noyau arqué et le noyau suprachiasmatique du rat. *Annales d'Endocrinologie* 46:19.

BOYD AE III, SPENCER E, JACKSON IMD, REICHLIN S (1976) Prolactin releasing factor (PRF) in porcine hypothalamic extract distinct from TRH. *Endocrinology* 99:861.

BRAR AK, FINK G, MALETTI M, ROSTENE W (1985) Vasoactive intestinal peptide in rat hypophysial portal blood: effects of electrical stimulation of various brain areas, the oestrous cycle and anaesthetics. *J Endocrinol* 106:275.

BROWN GM, SEEMAN P, LEE T (1976) Dopamine/neuroleptic receptors in basal hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 99:1407.

BROWNSTEIN MJ, PALKOVITS M, TAPPAZ ML, SAAVEDRA JM, KIZER JS (1976) Effect of surgical isolation of the hypothalamus on its neurotransmitter content. *Brain Res* 117:287.

BURNET FR, WAKERLEY JB (1976) Plasma concentrations of prolactin and thyrotropin during suckling in urethane-anaesthetized rats. *J Endocrinol* 70:429.

CALIGARIS L, ASTRADA JJ, TALEISNIK S (1974) Oestrogen and progesterone influence on the release of prolactin in ovariectomized rats. *J Endocrinol* 60:205.

CALIGARIS L, TALEISNIK S (1974) Involvement of neurones containing 5-hydroxytryptamine in the mechanism of prolactin release induced by oestrogen. *J Endocrinol* 62:25.

CALIGARIS L, TALEISNIK S (1983) Prolactin release induced by stress and the influence of oestrogen and progesterone treatment, sex and daily rhythm. *Acta Endocrinologica* 102:505.

CARD JP, BRECHA N, KARTEN HJ, MOORE RY (1981) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: Light and electron microscopic analysis. J Neurosci 11:1289

CARLSSON A, FALCK B, FUXE K, HILLARP N-A (1964) Cellular localization of monoamines in spinal cord. Acta Physiol Scand 60:112.

CASTRO MG, ESTIVARIZ FE, ITURRIZA FC (1984) The regulation of the corticomelanotropic cell activity in aves-1. Evaluation and selection of in vitro systems for testing ACTH-releasing substances in the duck pituitary. Comp Biochem Physiol 79A: 169.

CLEMENS JA, SMALSTIG EB, SAWYER BD (1976) Studies on the role of the preoptic area in the control of reproductive function in the rat. Endocrinology 99:728

CLEMENS JA, SAWYER BD, CERIMELE B(1977) Further evidence that serotonin is a neurotransmitter involved in the control of prolactin secretion. Endocrinology 100:692.

CLEMENS JA (1978) Effects of serotonin neurotoxins on pituitary hormone release. Ann NY Acad Sci 305:399.

CLEMENS JA, ROUSH ME, FULLER RW (1978) Evidence that serotonin neurons stimulate secretion of prolactin releasing factor. Life Sci 22:2209.

CLEMENS JA, BENNETT DR, FULLER RW (1980) The effect of a tryptophan-free diet on prolactin and corticosterone release by serotonergic stimuli. Horm Metab Res 12:35.

CLINESCHMIDT BV, ZACCHEI AG, TOTARO JA, PFLUEGER AB, MCGUFFIN JC, WISHOUSKY TI (1978) Fenfluramine and brain serotonin. Ann NY Acad Sci 305:222.

COCCHI D, SANTAGOSTINO A, GIL-AD I, FERRI S, MULLER EE (1977 a) Leu-enkephalin-stimulated growth hormone and prolactin release in the rat: comparison with the effect of morphine. Life Sci 20:2041.

COCCHI D, GIL-AD I, PANERAI AE, LOCATELLI V, MULLER EE (1977 b) Effect of 5-hydroxytryptophan on prolactin and growth hormone release in the infant rat: evidence for different neurotransmitter mediation. Neuroendocrinology 24:1.

COCCHI D, LOCATELLI V, CARMINATI R, MULLER EE (1978) Mechanism underlying the prolactin-lowering effect of metergoline in the rat. Life Sci 23:927.

COLLU R, LAFOND J, MARCHISIO AM, ELJARMAK D, DUCHARME JR (1984) Sodium ions: their role and mechanism of action in the control of prolactin release. *Endocrinology* 114:1302.

CONRAD LCA, LEONARD CM, PFAFF DW (1974) Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *J Comp Neurol* 156:179.

COOKE NE, COIT D, SHINE J, BAXTER JD, MARTIAL JA (1981) Human prolactin. cDNA Structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem* 256:4007.

CREESE I, BURT DR, SYNDER SH (1975) The dopamine receptor: differential binding of d-LSD and related agents to agonist and antagonist states. *Life Sci* 17:1715.

CROWLEY WR (1982) Effects of ovarian hormones on norepinephrine and dopamine turnover in individual hypothalamic and extrahypothalamic nuclei. *Neuroendocrinology* 34:381.

CHEN CL, MINAGIICHI H, MEITES J (1967) Effects of transplanted pituitary tumors on host pituitary prolactin secretion. *Proc Soc Exp Biol Med* 126:317.

CHEN CL, AMENOMORI Y, LU KH, VOOGT JL, MEITES J (1970) Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions. *Neuroendocrinology* 6:220.

CHEN HJ, MEITES J (1975) Effect of biogenic amines and TRH on release of prolactin and TSH in the rat. *Endocrinology* 96:10.

CHING M C-H, UTIGER RD (1983) Hypothalamic portal blood immunoreactive TRH in the rat: lack of effect of hypothyroidism and thyroid hormone treatment. *J Endocr Invest* 6:347.

CHIOCCHIO SR, CANNATA MA, TRAMEZZANI JH (1976) The size, weight and catecholamine content of the median eminence of the rat. *Brain Res* 110:612.

CHIOCCHIO SR, CANNATA MA, CORDERO FUNES JR, TRAMEZZANI JH (1979) Involvement of adeno-hypophysial dopamine in the regulation of prolactin release during suckling. *Endocrinology* 105:544.

CHIOCCHIO SR, CHAFUEN S, TRAMEZZANI JH (1980) Changes in adeno-hypophysial dopamine related to prolactin release. *Endocrinology* 106:1682.

DAHLSTRÖM A, FUXE K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol Scand* 62, suppl 232:1.

DEMAREST KT, RIEGLE GD, MOORE KE (1984) Prolactin -induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons: evidence for both a rapid "tonic" and delayed "induction" component. Neuroendocrinology 38:467.

DECLIN L (1949) A propos de l'action combinée de la prolactine et des oestrogènes sur la structure de l'ovarie chez le rat. CR Soc Biol 143:1154.

DECLIN L (1950) A propos du mécanisme d'action des oestrogènes sur le lobe antérieur de l'hypophyse chez le rat. Ann Endocrinol 11:656.

DE SOUZA EB (1986) Serotonin and dopamine receptors in the rat pituitary gland: autoradiographic identification, characterization, and localization. Endocrinology 119:1534.

DONEEN BA, BEWLEY TA, LI CH (1979) Studies on prolactin selective reduction of the disulfide bonds of the ovine hormone. Biochem 18:4851.

DONOSO AO, BISHOP W, FAWCETT CP, KRULICH L, MCCANN SM (1971) Effects of drugs that modify brain monoamine concentrations on plasma gonadotropin and prolactin levels in the rat. Endocrinology 89:774.

DONOSO AJ, ZARATE MB, SELTZER A (1983) Histamine-induced prolactin release: pharmacological characterization of receptors in male rats. *Neuroendocrinology* 30:436.

EIDEN LE, NILAVER G, PALKOVITS M (1982) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the rat brain stem nuclei. *Brain Res* 231:472.

EMSON PC, FAHRENKRUG J, SCHAFFALITSKY DE MUCKADELL OB, JESSELL TM, IVERSEN LL (1978) Vasoactive intestinal peptide (VIP): vesicular localization and potassium evoked release from rat hypothalamus. *Brain Res* 143:174.

EMSON PC, LINDVALL O (1979) Distribution of putative neurotransmitters in the neocortex. *Neuroscience* 4:1.

ENJALBERT A, ARANCIBIA S, RUBERG M, PRIAM M, BLUET-PAJOT MT, ROTSZTEJN WH, KORDON C (1980) Stimulation of in vitro prolactin release by vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology* 31:200.

EVERETT JW (1954) Luteotrophic function of autografts of the rat hypophysis. *Endocrinology* 54:685.

EVERETT JW (1956) Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rat hypophysis. *Endocrinology* 58:786.

FALCK B (1962) Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method. Acta Physiol Scand 56, Suppl 197:1.

FARKOUH NH, PALKER MG, FRANTZ AG (1979) Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: high proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone. J Clin Endocrinol Metab 48:1026.

FERNSTROM JD, WURTMAN RJ (1971) Brain serotonin content. Physiological dependence on plasma tryptophan levels. Science 173:149.

FESSLER RG, DEYO SN, MELTZER HY, MILLER RJ (1984) Evidence that the median and dorsal raphe nuclei mediate serotonergically-induced increases in prolactin release from the pituitary. Brain Res 299:231.

FORMAN IJ (1981) Comparison of the effects of central acting drugs on PRL release in young and old male rats. Proc Soc Exp Biol Med 167:354.

FOX SR, SMITH MS (1984) The suppression of pulsatile luteinizing secretion during lactation in the rat. Endocrinology 115:2045.

FRANKFURT M, LAUDER JM, AZMITIA EC (1981) The immunocytochemical localization of serotonergic neurons in the rat hypothalamus. Neurosci Lett 24:227.

FRANKFURT M, AZMITIA EC (1983) The effect of intracerebral injections of 5,7-dihydroxytryptamine and 6-hydroxydopamine on the serotonin immunoreactive cell bodies and fibers in the adult rat hypothalamus. Brain Res 261:91.

FREEMAN ME, BANKS JA (1980) Hypothalamic sites which control the surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. Endocrinology 106:668.

FRIEDMAN E, KRIEGER DT, MEZEY E, LERANTH CS, BROWNSTEIN MJ, PALKOVITS M (1983) Serotonergic innervation of the rat pituitary intermediate lobe: decrease after stalk section. Endocrinology 112:1943.

FULLER RW (1978) Structure-activity relationships among the halogenated amphetamines. Ann NY Acad Sci 305:147.

FULLER RW, SNODDY HD, MASON NR, MOLLOY BB (1978) Effect of 1-(m-trifluoromethylphenyl) piperazine on ³H-serotonin binding to membranes from rat brain in vitro and on serotonin turnover in rat brain in vivo. Eur J Pharmacol 52:11.

FULLER RW (1980) Pharmacology of central serotonin neurons. Ann Rev Pharmacol Toxicol 20:111.

FULLER RW (1936) Biochemical pharmacology of the serotonin system. En: *Advances in Neurology*, vol 43. Fahn S ed. Raven Press, New York. p 469.

FUXE K (1965) Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine terminals in the central nervous system. *Acta Physiol Scand* 64, suppl 247:39.

FUXE K, JONSSON G (1974) Further mapping of central 5-hydroxytryptamine neurons: studies with the neurotoxic dihydroxytryptamines. *Adv Biochem Psychopharmacol* 10:1.

GALLARDO MGP, BILINSKI M, CHIOCCHIO SR, TRAMEZZANI JH (1984) Dopamine enters lactotrophs and reaches their secretory granules. *J Endocrinol* 104:23.

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.

GERSON S, BALDESSARINI RJ (1975) Selective destruction of serotonin terminals in rat forebrain by high doses of 5,7 dihydroxytryptamine. *Brain Res* 85:140.

GIACHETTI A, SAID SI, REYNOLDS RC, KONIGES FC (1977) Vasoactive intestinal polypeptide in brain: localization in and release from isolated nerve terminals. Proc Natl Acad Sci (USA) 74:3424.

GIACHETTI A, SAID SI (1979) Axonal transport of vasoactive intestinal peptide in sciatic nerve. Nature 281:574.

GIACHETTI A, BORGHI C, NICOSIA S, SAID SI (1979) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) activates rat pituitary adenylate cyclase. Fed Proc 38:1129.

GIBBS DM, PLOTSKY PM, GREEF WJ DE, NEILL JD (1979) Effect of histamine and acetylcholine on hypophysial stalk plasma dopamine and peripheral plasma prolactin levels. Life Sci 24:2063.

GIGUERE V, MEUNIER H, VEILLEUX R, LABRIE F (1982) Direct effects of sex steroids on prolactin release at the anterior pituitary level: interactions with dopamine, thyrotropin-releasing hormone, and isobutylmethylxanthine. Endocrinology 111:857.

GIL-AD I, ZAMBOTTI F, CARRUBA MO, VICENTINI L, MULLER EE (1976) Stimulatory role of brain serotonergic system on prolactin secretion in the male rat. Proc Soc Exp Biol Med 151:512.

GO VLW, YAKSH TL (1980) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and cholecystokinin CCK-8 in cat spinal cord and dorsal root ganglion: release from cord by peripheral nerve stimulation. Regul Peptides (Suppl. 1): S 43.

GODSTEIN A (1964) Biostatistics, ed I. Mac Millan, New York.
p. 55.

GOURDJI D, BATAILLE D, VAUCLIN N, GROUSELLE D, ROSSELIN G,
TIXIER-VIDAL A (1979) Vasoactive intestinal peptide (VIP)
stimulates prolactin (PRL) release and cAMP production in a
rat pituitary cell line (GH3/B6): Additive effects of VIP
and TRH on PRL release. FEBS Lett 104:165.

GOZES I, SHANI Y (1986) Hypothalamic vasoactive intestinal
peptide messenger ribonucleic acid is increased in lactating
rats. Endocrinology 119:2497.

GREEF WJ DE, ZEILMAKER GH (1978) Regulation of prolactin secre-
tion during the luteal phase in the rat. Endocrinology 102:1190.

GREEF WJ DE, VISSER TJ (1981) Evidence for the involvement of
hypothalamic dopamine and thyrotrophin-releasing hormone in
suckling-induced release of prolactin. J Endocrinol 91:213.

GREEF WJ DE, SCHOOT P VAN DER (1985) Some recent developments
in the study of prolactin in mammals. In: Frontiers of the
Hormone Research vol 14. Wimersma Greidanus TJB van ed. p.70.

GROSSMAN A, DELITALA G, YEO T, BESSER GM (1981) GABA and mus-
cimol inhibit the release of prolactin from dispersed rat
anterior pituitary cells. Neuroendocrinology 32:145.

GROSVENOR CE, MENA F, SCHAEFGEN DA (1967) Effect of nonsuckling interval and duration of suckling on the suckling-induced fall in pituitary prolactin concentration in the rat. *Endocrinology* 81:449.

GROSVENOR CE, MENA F, WHITWORTH NS (1979 a) The secretion rate of prolactin in the rat during suckling and its metabolic clearance rate after increasing intervals of nonsuckling. *Endocrinology* 104:372.

GROSVENOR CE, WHITWORTH NS (1979 b) Secretion rate and metabolic clearance rate of prolactin in the rat during mid-and late lactation. *J Endocrinol* 82:409.

GROSVENOR CE, MENA F, WHITWORTH NS (1980) Evidence that the dopaminergic-PIF mechanism regulates only the depletion-transformation phase and not the release phase of prolactin secretion during suckling in the rat. *Endocrinology* 106:481.

GROSVENOR CE, MENA F (1980) Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 107:863.

GUDELSKY GA, NANSEL DD, PORTER JC (1980) Uptake and processing of dopamine by cells of the anterior pituitary gland. *Endocrinology* 107:30.

GUDELSKY GA, NANSEL DD, PORTER JC (1981) Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. *Endocrinology* 108:440.

GUNNET JW, MICK C, FREEMAN ME (1981) The role of the dorsomedial-ventromedial area of the hypothalamus in the control of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology* 109:1846.

GUNNET JW, FREEMAN ME (1982) Sexual differences in regulation of prolactin secretion by two hypothalamic areas. *Endocrinology* 110:697.

GUNNET JW, FREEMAN ME (1983) The mating-induced release of prolactin: a unique neuroendocrine response. *Endocrine Rev* 4:44.

GUNNET JW, FREEMAN ME (1985) The interaction of the medial preoptic area and the dorsomedial-ventromedial nuclei of the hypothalamus in the regulation of the mating-induced release of prolactin. *Neuroendocrinology* 40:232.

HAIGLER HJ, AGHAJANIAN GK (1979) Peripheral serotonin antagonists: failure to antagonize serotonin in brain areas receiving a prominent serotonergic input. *J Neural Transm* 35:257.

HAMON M, BOURGOIN S, ARTAUD F, EL MESTIKAWY S (1981) The respective roles of tryptophan uptake and tryptophan hydroxylase in the regulation of serotonin synthesis in the central nervous system. *J Physiol* 77:269.

HARO LS, TALAMANTES FJ (1985) Secreted mouse prolactin (PRL) and stored ovine PRL.I. Biochemical characterization, isolation and purification of their electrophoretic isoforms. *Endocrinology* 116:346.

HARO LS, TALAMANTES FJ (1985) Secreted mouse prolactin (PRL) and stored ovine PRL.II. Role of amides in receptor binding and immunoreactivity. *Endocrinology* 116:353.

HARRIS ARC, CHRISTIANSON D, SMITH MS, FANG S-L, BRAVERMAN LE, VAGENAKIS AG (1978) The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. *J Clin Invest* 61:441.

HASKINS JT, GUDELSKY GA, MOSS RL, PORTER JC (1981) Iontophoresis of morphine into the arcuate nucleus: effects on dopamine concentrations in hypophysial portal plasma and serum prolactin concentrations. *Endocrinology* 108:767.

HASKINS JT, MOSS RL (1983) Differential effects of morphine, dopamine and prolactin administered iontophoretically on arcuate-ventromedial hypothalamic neurons. *Brain Res* 268:185.

HEIMAN ML, BEN-JONATHAN N (1982) Rat anterior pituitary dopaminergic receptors are regulated by estradiol and during lactation. *Endocrinology* 111:1057.

HÖKFELT T, FAHRENKRUG J, TATEMOTO K, MUTT V, WERNER S (1982 a) PHI, a VIP-like peptide, is present in the rat median eminence. *Acta Physiol Scand* 116:469.

HÖKFELT T, SCHULTZBERG M, LUNDBERG JM, FUXE K, MUTT V, FAHRENKRUG J, SAID S I (1982 b). Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the central and peripheral nervous systems as revealed by immunocytochemistry. En: *Vasoactive Intestinal Peptide*. Said, SI ed. Raven Press, New York, p. 65.

HÖKFELT T, FAHRENKRUG J, TATEMOTO K, MUTT V, WERNER S, HULTING A-L, TERENIUS L, CHANG KJ (1983) The PHI (PHI-27)/corticotropin-releasing factor/enkephalin immunoreactive hypothalamic neuron: possible morphological basis for integrated control of prolactin, corticotropin, and growth hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 80:895.

HOLZBAUER M, SHARMAN DF, COHEN G, COOPER TR (1985) Pituitary 5-hydroxytryptamine nerves-A possible link with pituitary hormone secretion. *J Neural Transmission* 63:53.

HONG E, SANCILIO LF, VARGAS R, PARDO EG (1969) Similarities between the pharmacological actions of quipazine and serotonin. Eur J Pharmacol 6:274.

HOUEBINE LM (1983) Données récentes sur le mécanisme d'action de la prolactine. Annales d'Endocrinologie 44:85.

HUNTER WM, GREENWOOD FC (1962) Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature 194:495.

ISHERWOOD KM, CROSS BA (1980) Effect of suckling stimulus on secretion of prolactin and luteinizing hormone in conscious and anaesthetized rats. J Endocrinol 87:457.

ITOH N, OBATA KI, YANAIHARA N, OKAMOTO H (1983) Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304:547.

ITURRIZA FC, RUBIO MC, GOMEZ DUMM CLA, ZIEHER LM (1983) Catecholamine metabolizing enzymes and synthesis of dopamine in normal and grafted pituitary partes distales. Neuroendocrinology 37:371.

JAIM-ETCHEVERRY G, ZIEHER LM (1974) Localizing serotonin in central and peripheral nerves. En: The Neurosciences. Third study program. Schmitt FO, Worden FG eds. The MIT Press, Cambridge, Mass. p 917.

JAKUBOWSKI M, TERKEL J (1986) Female reproductive function and sexually dimorphic prolactin secretion in rats with lesions in the medial preoptic-anterior hypothalamic continuum.

JACOBSON D (1954) Regeneration of hypophysial portal vessels and grafts of anterior pituitary glands in rabbits. *Acta Endocrinologica* 17:187.

JACOBY JH, POULAKOS JJ, BRYCE GF (1978) On the central antiserotonergic actions of cyproheptadine and methysergide. *Neuropharmacology* 17:299.

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.

JOHNSON MD, CROWLEY WR (1985) Acute effects of estradiol on circulating luteinizing hormone and prolactin concentrations and on serotonin turnover in individual brain nuclei. *Endocrinology* 113:1935.

JOHNSTON CA, GIBBS DM, NEGRO-VILAR A (1985) High concentrations of epinephrine derived from a central source and of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in hypophysial portal plasma. *Endocrinology* 113:819.

JOHNSTON CA, SPINEDI E, NEGRO-VILAR A (1984 a) Aromatic L-amino acid decarboxylase activity in the rat median eminence, neurointermediate lobe and anterior lobe of the pituitary. Physiological and pharmacological implications for pituitary regulation. *Neuroendocrinology* 39:54.

JOHNSTON CA, DEMAREST KT, MOORE KE (1984 b) 5-Hydroxytryptamine synthesis and metabolism in discrete nuclei of the rat brain during surges of prolactin associated with restraint stress or suckling. *Neuroendocrinology* 38:117.

JOHNSTON CA, SPINEDI EJ, NEGRO-VILAR A (1985) Effect of acute ether stress on monoamine metabolism in median eminence and discrete hypothalamic nuclei of the rat brain and on anterior pituitary hormone secretion. *Neuroendocrinology* 41:83.

KADOWAKI J, KU N, OETTING WS, WALKER AM (1984) Mammothroph autoregulation: uptake of secreted prolactin and inhibition of secretion. *Endocrinology* 114:2060.

KAJI H, CHIHARA K, ABE H, MINAMITAMI N, KODAMA H, KITA T, FUJITA T, TATEMOTO K (1984) Stimulatory effect of peptide histidine isoleucine amide 1-27 on prolactin release in the rat. *Life Sci* 35:641.

KAJI H, KAZUO CH, KITA T, KASHIO Y, OKIMURA Y, FUJITA T (1985) Administration of antisera to vasoactive intestinal polypeptide and peptide histidine isoleucine attenuates ether-induced prolactin secretion in rats. Neuroendocrinology 41:529.

KAMBERI IA, MICAL RS, PORTER JC (1971 a) Effects of melatonin and serotonin on the release of FSH and prolactin. Endocrinology 88:1288.

KAMBERI IA, MICAL RS, PORTER JC (1971 b) Effects of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines on prolactin release. Endocrinology 88:1012.

KANT GJ, MOUGEY EH, PENNINGTON LL, MEYERHOFF JL (1985) Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma B-endorphin, B-LPH, corticosterone and prolactin. Life Sci 33:2657.

KANT GJ, MOUGEY EH, MEYERHOFF JL (1986) Diurnal variation in neuroendocrine response to stress in rats: plasma ACTH, B-endorphin, B-LPH, corticosterone, prolactin and pituitary cyclic AMP responses. Neuroendocrinology 43:383.

KATO Y, IWASAKI Y, IWASAKI J, ABE H, YANAIHARA N, IMURA H (1978) Prolactin release by vasoactive intestinal polypeptide in rats. Endocrinology 103:554.

KAWAKAMI M, ARITA J, YOSHIOKA E (1980) Loss of estrogen-induced daily surges of prolactin and gonadotropins by supra-chiasmatic nucleus lesions in ovariectomized rats. *Endocrinology* 106:1087.

KAWAKAMI M, ARITA J (1981) Effects of lesions in the medial basal part of the suprachiasmatic area on prolactin and gonadotropin surges induced by estrogen and progesterone treatment in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 32:242.

KEEFER DA, STUMPF WE, PETRUSZ P (1976) Quantitative autoradiographic assessment of (³H)-estradiol uptake in immunocytochemically characterized pituitary cells. *Cell Tissue Res* 166:25.

KENT DL, SLADEK JR (1978) Histochemical, pharmacological and microspectrofluorometric analysis of new sites of serotonin localization in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 180:221.

KIMURA F, KAWAKAMI M (1978) Reanalysis of the preoptic afferents and efferents involved in the surge of LH, FSH and prolactin release in the proestrus rat. *Neuroendocrinology* 27:74.

KISS J, LERANTH CS, HALASZ B (1984) Serotonergic endings on VIP-neurons in the suprachiasmatic nucleus and on ACTH-neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. A combination of high resolution autoradiography and electron microscopic immunocytochemistry. *Neurosci Lett* 44:119.

KISS JZ, KANYICSKA B, NAGY GY (1986) The hypothalamic paraventricular nucleus has a pivotal role in regulation of prolactin release in lactating rats. *Endocrinology* 119:870.

KOCH Y, LU KH, MEITES J (1970) Biphasic effects of catecholamines on pituitary prolactin release in vitro. *Endocrinology* 87:673.

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.

KOCH Y, GOLDHABER G, FIREMAN I, ZOR U, SHANI J, TAL E (1977) Suppression of prolactin and thyrotropin secretion in the rat by antiserum to thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 100:1476.

KÖNIG JFR, KLIPPEL RA (1967) The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower part of the brain stem. Krieger, Huntington.

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

KRULICH L (1975) The effect of a serotonin uptake inhibitor (Lilly 110140) on the secretion of prolactin in the rat. *Life Sci* 17:1141.

KRULICH L, COPPINGS RJ, MCCANN SM, MAYFIELD MA (1978) Inhibition of prolactin secretion by a direct effect of methysergide on the pituitary lactotrophs in the rat. *Life Sci* 23:1665.

KRULICH L, VIJAYAN E, COPPINGS RJ, GIACHETTI A, MCCANN SM, MAYFIELD A (1979) On the role of the central serotonergic system in the regulation of the secretion of thyrotropin and prolactin: thyrotropin-inhibiting and prolactin-releasing effect of 5-hydroxytryptamine and quipazine in the male rat. *Endocrinology* 105:276.

KRULICH L, COPPINGS RJ, GIACHETTI A, MCCANN SM, MAYFIELD MA (1980) Lack of evidence that the central serotonergic system plays a role in the activation of prolactin secretion following inhibition of dopamine synthesis or blockade of dopamine receptors in the male rat. *Neuroendocrinology* 30:133.

KRULICH L, MCCANN SM, MAYFIELD MA (1981) On the mode of the prolactin release-inhibiting action of the serotonin receptor blockers metergoline, methysergide and cyproheptadine. *Endocrinology* 108:1115.

LAMBERTS SWJ, MACLEOD RM (1978 a) The interaction of the serotonergic and dopaminergic systems on prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 103:287.

LAMBERTS SWJ, MACLEOD RM (1978 b) Effects of cyproheptadine on prolactin synthesis and release by normal and suppressed pituitary glands and by dispersed pituitary tumor cells. *Endocrinology* 103:1710.

LARSSON LI, FAHRENKRUG J, SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL O, SUNDLER F, HAKANSON R, REHFELD JF (1976) Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 73:3197.

LAWSON DM, GALA RR (1975) The influence of adrenergic, dopaminergic, cholinergic and serotonergic drugs on plasma prolactin levels in ovariectomized, estrogen-treated rats. *Endocrinology* 96:313.

LAWSON DM, GALA RR (1976) The interaction of dopaminergic and serotonergic drugs on plasma prolactin in ovariectomized, estrogen-treated rats. *Endocrinology* 98:42.

LAWSON DM, GALA RR (1978) The influence of pharmacological manipulation of serotonergic and dopaminergic mechanisms on plasma prolactin in ovariectomized, estrogen-treated rats. *Endocrinology* 102:973.

LAWSON DM, STEVENS RW (1980) Size heterogeneity of pituitary and plasma prolactin: effect of chronic estrogen treatment. *Life Sci* 27:1489.

LERANTH CS, PALKOVITS M, KRIEGER DT (1983) Serotonin immunoreactive nerve fibers and terminals in the rat pituitary - Light and electron microscopic studies. *Neuroscience* 9:289.

LERANTH CS, FROTSCHER M (1983) Commissural afferents to the rat hippocampus terminate on vasoactive intestinal polypeptide - like immunoreactive non-pyramidal neurons. An EM immunocytochemical degeneration study. *Brain Res* 276:557.

LERANTH CS, FROTSCHER M, TÖMBÖL T, PALKOVITS M (1984) Ultrastructure and synaptic connections of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive non-pyramidal neurons and axon terminals in the rat hippocampus. *Neuroscience* 12:531.

LEWIS AE (1966) Biostatistics. Reinhold Publishing Corp, New York.

LEWIS UJ (1984) Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. Ann Rev Physiol 46:33.

LEWIS UJ, SINGH RNP, LEWIS LJ, SEAVEY BK, SINHA YN (1984) Glycosylated ovine prolactin. Proc Natl Acad Sci (USA) 81:385.

LEWIS UJ, SINGH RNP, SINHA YN, VANDERLAAN WP (1985) Glycosylated human prolactin. Endocrinology 116:559.

LEYSEN JE, AWOUTERS F, KENNIS L, LADURON PM, VANDENBERK J, JANSSEN PAJ (1981) Receptor binding profile of R 41468, a novel antagonist at 5-HT₂ receptors. Life Sci 28:1015.

LINCOLN DW, HILL A, WAKERLEY JB (1973) The milk-ejection reflex of the rat: an intermittent function not abolished by surgical levels of anaesthesia. J Endocrinol 57:459.

LONG JB, YOUNGBLOOD WW, KIZER JS (1982) A microassay for simultaneous measurement of in vivo rates of tryptophan hydroxylation and levels of serotonin in discrete brain nuclei. J Neurosci Methods 6:45.

LOREN I, EMSON FC, FAHRENKRUG J, BJÖRKLUND A, ALUMETS J, HAKANSON R, SUNDLER F (1979) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 4: 1953.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265.

LU KH, AMENOMORI Y, CHEN CL, MEITES J (1970) Effect of central acting drugs on serum and pituitary prolactin levels in rats. *Endocrinology* 87:667.

LU KH, MEITES J (1973) Effects of serotonin precursors and melatonin on serum prolactin release in rats. *Endocrinology* 93:152.

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

LYNCH CO JR, JOHNSON MD, CROWLEY WR (1984) Effects of the serotonin agonist, quipazine, on luteinizing hormone and prolactin release: evidence for serotonin-catecholamine interactions. *Life Sci* 35:1481

MAANEN JH VAN, SMELIK PG (1968) Induction of pseudopregnancy in rats following local depletion of monoamines in the median eminence of the hypothalamus. Neuroendocrinology 3: 177.

MACLEOD RM, SMITH MC, DEWITT JW (1966) Hormonal properties of transplanted pituitary tumors and their relation to the pituitary gland. Endocrinology 79:1149.

MACLEOD RM (1969) Influence of norepinephrine and catecholamine-depleting agents on the synthesis and release of prolactin and growth hormone. Endocrinology 85:916.

MACLEOD RM, LEHMEYER JE (1974) Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. Endocrinology 94:1077.

MACLEOD RM, LOGIN IS (1977) Regulation of prolactin secretion through dopamine, serotonin and the cerebrospinal fluid. In: Advances in biochem psychopharmacol, vol 16. Costa E, Gessa GL eds. Raven Press, New York, p 147.

MCCANN SM, LUMPKIN MD, MIZUNUMA H, KHORRAM O, SAMSON WK (1984) Recent studies on the role of brain peptides in the control of anterior pituitary hormone secretion. Peptides 5, suppl 1:3.

MARLEY PD, EMSON PC, HUNT SP, FAHRENKRUG J (1981) A long ascending projection in the rat brain containing vasoactive intestinal polypeptide. *Neurosci Lett.* 27:261.

MARLEY PL, EMSON P (1982) VIP as a neurotransmitter in the central nervous system. En: *Vasoactive Intestinal Peptide*. Said SI ed. Raven Press, New York, p 341.

MARTIN JB, DURAND D, GURD W, FAILLE G, AUDET J, BRAZEAU P (1978) Neuropharmacological regulation of episodic growth hormone and prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 102:106.

MATSUSHITA N, KATO Y, SHIMATSU A, KATAKAMI H, YANAIHARA N, IMURA H (1983) Effects of VIP, TRH, GABA and dopamine on prolactin release from superfused rat anterior pituitary cells. *Life Sci* 32:1263.

MATTHEIJ JAM, PIJKEREN TA VAN (1977) Plasma prolactin in undisturbed cannulated male rats: effects of perphenazine, frequent sampling, stress and castration plus oestrone treatment. *Acta Endocrinologica* 84:51.

MATTHEIJ JAM, GRUISEN EFM, SWARTS JJM (1979) The suckling-induced rise of plasma prolactin in lactating rats: its dependence on stage of lactation and litter size. *Hormone Res* 11:325.

MEITES J, NICOLL CS (1966) Adenohypophysis: prolactin. *Annu Rev Physiol* 28:57.

MELMED S, CARLSON HE, BRIGGS J, HERSHMAN JM (1980) Autofeed-back of prolactin in cultured prolactin-secreting pituitary cells. *Hormone Res* 12:340.

MELTZER HY, FANG VS, PAUL SM, KALUSKAR R (1976) Effect of quipazine on rat plasma prolactin levels. *Life Sci* 19:1073.

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.

MEZEY E, LERANTH C, BROWNSTEIN MJ, FRIEDMAN E, KRIEGER DT, PALKOVITS M (1984) On the origin of the serotonergic input to the intermediate lobe of the rat pituitary. *Brain Res* 294:231.

MEZEY E, KISS JZ (1985) Vasoactive intestinal peptide-containing neurons in the paraventricular nucleus may participate in regulating prolactin secretion. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 82:245.

MILMORE JE, REECE RP (1975) Effects of porcine hypothalamic extract on prolactin release in the rat. *Endocrinology* 96:732.

MITTRA I (1980) A novel cleaved prolactin in the rat pituitary. Part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. Biochem biophys Res Commun 95:1750.

MITTRA I (1980) A novel cleaved prolactin in the rat pituitary. Part II. In vivo mammary mitogenic activity of its N terminal 16 K moiety. Biochem biophys Res Commun 95:1760.

MIZUNO H, TALWALKER PK, MEITES J (1967) Central inhibition by serotonin of reflex release of oxytocin in response to suckling stimulus in the rat. Neuroendocrinology 2:222.

MIZUNUMA H, KHORRAM O, MCCANN SM (1985) Purification of a non-dopaminergic and non-GABAergic prolactin release-inhibiting factor (PIF) in sheep stalk-median eminence. Proc Soc Exp Biol Med 178:114.

MOORE KE, DEMAREST KT, JOHNSTON CA (1980) Influence of prolactin on dopaminergic neuronal systems in the hypothalamus. Fed Proc 39:2912.

MOORE KE, DEMAREST KT (1982) Tuberoinfundibular and tuberohypophyseal dopaminergic neurons. En: Frontiers in Neuroendocrinology vol 7. Ganong WF, Martini L eds. Raven Press, New York, p. 161.

MOOS F, RICHARD P (1983) Serotonergic control of oxytocin release during suckling in the rat: opposite effects in conscious and anesthetized rats. *Neuroendocrinology* 36:300.

MOREL G, BESSON J, ROSSELIN G, DUBOIS PM (1982) Ultrastructural evidence for endogenous vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the pituitary gland. *Neuroendocrinology* 34:85.

MORGAN WW, HERBERT DC (1978) Elevation of serum prolactin levels after the inhibition of serotonin uptake. *Endocrinology* 103:1016.

MORRISON JH, MAGISTRETTI PJ, BENOIT R, BLOOM FE (1984) The distribution and morphological characteristics of the intracortical VIP-positive cell: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* 292:269.

MUELLER GP, TWOHY CP, CHEN HT, ADVIS JP, MEITES J (1976) Effect of L-tryptophan and restraint stress on hypothalamic and brain serotonin turnover, and pituitary TSH and prolactin release in rats. *Life Sci* 18:715.

MUIR JL, PFISTER HP (1986) Corticosterone and prolactin responses to predictable and unpredictable novelty stress in rats. *Physiol Behav* 37:285.

MURPHY BD, RAJKUMAR K (1985) Prolactin as a luteotrophin. Can J Physiol Pharmacol 63:257.

NAGY G, HALASZ B (1983) Time course of the litter removal-induced depletion in plasma prolactin levels of lactating rats. Neuroendocrinology 37:459.

NAUTA WJH, HAYMAKER W (1969) Hypothalamic nuclei and fiber connections. En: The Hypothalamus. Haymaker W, Anderson E, Nauta WJH eds. Springfield, Ill. Ch. C. Thomas p. 136.

NECKERS LM, MEEK JL (1976) Measurement of 5-HT turnover rate in discrete nuclei of rat brain. Life Sci 19:1579.

NEILL JD, FREEMAN ME, TILLSON SA (1971) Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. Endocrinology 89:1448.

NEILL JD (1974) Prolactin: its secretion and control. En: Handbook of Physiology, section 7: Endocrinology, vol IV: The pituitary gland and its neuroendocrine control, part. 2. Greep, Astwood eds. American Physiological Society, Washington. p 469.

NEILL JD (1980) Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. En: *Frontiers in Neuroendocrinology* vol 6. Martini L, Ganong WF eds. Raven Press, New York. p 129.

NICOLL CS, MEITES J (1962) Estrogen stimulation of prolactin production by rat adenohiphysis in vitro. *Endocrinology* 70:272.

NICOLL CS, FIORINDO RP, MCKENNEE CJ, PARSONS JA (1970) Assay of hypothalamic factors which regulate prolactin secretion. En: *Hypophysiotrophic hormones in the hypothalamus: Assay and chemistry*. Meites J ed. Williams and Wilkins, Baltimore p 115.

NICOLL CS (1971) Aspects of the neural control of prolactin secretion. En: *Frontiers in Neuroendocrinology*. Martini L, Ganong WF eds. Oxford Univ Press, Cambridge p 291.

NICOLL CS (1974) Physiological actions of prolactin. En: *Handbook of Physiology, section 7: Endocrinology, vol IV: The pituitary gland and its neuroendocrine control, part 2*. Greep, Astwood eds. American Physiological Society, Washington. p 253.

NICOLL CS (1980) Ontogeny and evolution of prolactin's functions. Fed Proc 59:2565.

NICOLL CS (1982) Prolactin and growth hormone: specialists on one hand and mutual mimics on the other. Persp Biol Med 25:369.

NICOSIA S, SPADA A, GIANNATTASIO G (1982) Effects of vasoactive intestinal polypeptide on the pituitary gland. En: Vasoactive Intestinal Peptide. Said SI ed. Raven Press, New York p. 263.

NIKITOVICH-WINER M, EVERETT JW (1958) Functional restitution of pituitary grafts re-transplanted from kidney to median eminence. Endocrinology 63:916.

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.

NISWENDER GD, MIDGLEY AR, MONROE SE, REICHERT LE (1968) Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with anti-ovine LH serum and ovine LH- 131 I. Proc Soc Exp Biol Med 128:807.

NOGAMI H, YOSHIMURA F (1982) Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anatomical Record* 202:261.

NUNEZ EA, GERSHON MD, SILVERMAN AJ (1981) Uptake of 5-hydroxytryptamine by gonadotrophs of the rat's pituitary: a combined immunocytochemical radioautographic analysis. *J Histochem Cytochem* 29:1336.

OBATA KI, ITOH N, OKAMOTO H, YANAIHARA C, YANAIHARA N, SUZUKI T (1981) Identification and processing of biosynthetic precursors to vasoactive intestinal polypeptide in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 136:123.

OKAMOTO H, ITOH N, OBATA KI (1983) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for human vasoactive intestinal polypeptide (VIP)/PHI-27 precursor. *Regul Peptides* 6:320.

PALKOVITS M (1975) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* 59:449.

PALKOVITS M (1975) Isolated removal of hypothalamic nuclei for neuroendocrinological and neurochemical studies. *Anatomical Neuroendocrinology*. Stumpf WE, Grant LD eds. p 72.

PALKOVITS M, SAAVEDRA JM , JACOBOWITS DM, KIZER JS, ZABORSKY L, BROWNSTEIN MJ (1977) Serotonergic innervation of the forebrain: effect of lesions on serotonin and tryptophan hydroxylase levels. Brain Res 150:121.

PALKOVITS M, BESSON J, ROTSZTEJN W (1981) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in intact, stria terminalis transected and cerebral cortex isolated rats. Brain Res 213:455.

PALKOVITS M, MEZEY E, CHIUEH CG, KRIEGER DT, GALLATZ K, BROWNSTEIN MJ (1986) Serotonin-containing elements of the rat pituitary intermediate lobe. Neuroendocrinology 42:522.

PARISI MN, VITALE ML, CHIOCCHIO SR, TRAMEZZANI JH (1983) Serotonin levels in rat median eminence change during the estrous cycle. Acta Physiol Lationamer 33:89.

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 Bull 2:523.

PASQUIER DA, VILLAR MJ (1983) A revision of the afferents to the dorsal nucleus. Revista Boliviana de Investigación 1:124.

PAYETTE RF, GERSHON MD, NUNEZ EA (1985) Serotonergic elements of the mammalian pituitary. *Endocrinology* 116:1933.

PAYETTE RF, GERSHON MD, NUNEZ EA (1986) Colocalization of luteinizing hormone and serotonin in secretory granules of mammalian gonadotrophs. *Anatomical Record* 215:51.

PELLEGRINO DE IRALDI A, ZIEHER LM, JAIM-ETCHEVERRY G (1968) Neuronal compartmentation of 5-hydroxytryptamine stores. *Adv Pharmacol* 6 A: 257.

PELLETIER G, LECLERC R, PUVIANI R, POLAK JM (1981) Electron immunocytochemistry in vasoactive intestinal peptide (VIP) in the rat brain. *Brain Res* 210:356.

PHILLIPS HS, NIKOLICS K, BRANTON D, SEEBURG PH (1985) Immunocytochemical localization in rat brain of a prolactin releasing-inhibiting sequence of gonadotropin-releasing hormone prohormone. *Nature* 316:542.

PILOTTE NS, PORTER JC (1979) Circulating luteinizing hormone and prolactin concentrations in intact or castrated male rats treated with 5-hydroxytryptamine. *Endocrinology* 105:875.

PILOTTE NS, PORTER JC (1981) Dopamine in hypophysial portal plasma and prolactin in systemic plasma of rats treated with 5-hydroxytryptamine. *Endocrinology* 108:2137.

PILOTTE NS, BURT DR, BARRACLOUGH CA (1984) Ovarian steroids modulate the release of dopamine into hypophysial portal blood and the density of anterior pituitary (³H)siperone-binding sites in ovariectomized rats. *Endocrinology* 114: 2306.

POHL CR (1978) The radioenzymatic assay of serotonin. Tesis. Universidad de Rochester.

POULAIN DA, WAKERLEY JB (1986) Afferent projections from the mammary glands to the spinal cord in the lactating rat. I. A neuroanatomical study using the transganglionic transport of horseradish peroxidase-wheatgerm agglutinin. *Neuroscience* 19:495.

QUATTRONE A, DI RENZO G, SCETTINI G, TEDESCHI G, SCOPACASA F (1978) Increased plasma prolactin levels induced in rats by D-fenfluramine: relation to central serotonergic stimulation. *Eur J Pharmacol* 49:163.

QUATTRONE A, SCETTINI G, DI RENZO G, TEDESCHI G, PREZIOSI P (1979) Effect of mid-brain raphe lesion or 5,7-dihydroxytryptamine treatment on the prolactin-releasing action of quipazine and D-fenfluramine in rats. *Brain Res* 174:71.

QUATTRONE A, SCETTINI G, ANNUNZIATO L, DI RENZO G (1981) Pharmacological evidence of supersensitivity of central serotonergic receptors involved in the control of prolactin secretion. Eur J Pharmacol 76:9.

RIEGLE GD, MEITES J (1976) The effect of stress on serum prolactin in the female rat. Proc Soc Exp Biol Med 152:441.

RISKIND PN, MILLARD WJ, MARTIN JB (1984 a) Opiate modulation of the anterior pituitary hormone response during suckling in the rat. Endocrinology 114:1232.

RISKIND PN, MILLARD WJ, MARTIN JB (1984 b) Evidence that thyrotropin-releasing hormone is not a major prolactin-releasing factor during suckling in the rat. Endocrinology 115:312.

RIVIER C, BROWN M, VALE W (1977) Effect of neurotensin, substance P and morphine sulfate on the secretion of prolactin and growth hormone in the rat. Endocrinology 100:751

ROBBERECHT P, DESCHODT-LANCKMAN M, CAMUS JC, DE NEEF P, LAMBERT M, CHRISTOPHE J (1979) VIP activation of rat anterior pituitary adenylate cyclase. FEBS Lett 103:229.

ROBERTS GW, WOODHAMS PL, CROW TJ, POLAK JM (1980) Loss of immunoreactive VIP in the bed nucleus following lesions of the stria terminalis. Brain Res 195:471.

ROBERTS GW, WOODHAMS PL, POLAK JM, CROW TJ (1982) Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. Neuroscience 7:99.

ROBERTS GW, ALLEN Y, CROW TJ, POLAK JM (1983) Immunocytochemical localization of neuropeptides in the fornix of rat, monkey and man. Brain Res 263:151.

ROGOL AD, ROSEN SW (1974) Prolactin of apparent large molecular size, the mayor immunoactive prolactin component in plasma of a patient with a pituitary tumor. J Clin Endocrinol Metab 38:714.

ROSTENE WH, LERANTH CS, MALETTI M, MEZEY E, BESSON J, EIDENLE, ROSSELIN G, PALKOVITS M (1982) Distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) following various brain transections in the rat by radioimmunoassay and electron-microscopic immunocytochemistry. Neuropeptides 2:337.

ROSTENE WH (1984) Neurobiological and neuroendocrine functions of the vasoactive intestinal peptide (VIP). Progress in Neurobiology 22:103.

ROTCHILD I (1981) The regulation of the mammalian corpus luteum. Recent Prog Hormon Res 37:185.

ROTSZTEJN WH, BENOIST L, BESSON J, BERAUD G, BLUET-PAJOT MT, KORDON C, ROSSELIN G, DUVAL J (1980) Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the release of adenohipophyseal hormones from purified cells obtained by unit gravity sedimentation: inhibition by dexamethasone of VIP-induced prolactin release. Neuroendocrinology 31:282.

ROWLAND D, STEELE M, MOLTZ H (1978) Serotonergic mediation of the suckling-induced release of prolactin in the lactating rat. Neuroendocrinology 26:8.

RUBERG M, ROTSZTEJN WH, ARANCIBIA S, BESSON J, ENJALBERT A (1978) Stimulation of prolactin release by vasoactive intestinal peptide (VIP). Eur J Pharmacol 51:319.

RUZSAS C, LIMONTA P AND MARTINI L (1982) Role of serotonergic neurones in the control of gonadotrophin and prolactin secretion in the rat. J Endocrinol 94:83.

SAAVEDRA JM, BROWNSTEIN M, AXELROD J (1973) A specific and sensitive enzymatic isotopic microassay for serotonin in tissues. J Pharmacol exp Ther 186:508.

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

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

SAID SI, MUTT V (1970) Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. Science 169:1217.

SAID SI, PORTER JC (1979) Vasoactive intestinal polypeptide: release into hypophyseal portal blood. Life Sci 24:227.

SALAND LC, WALLACE JA, COMUNAS F (1986) Serotonin-immunoreactive nerve fibers of the rat pituitary: effects of anticholinergic and antiserotonin drugs on staining patterns. Brain Res 368:310.

SAMSON WK, SAID SI, MCCANN SM (1979) Radioimmunologic localization of vasoactive intestinal peptide in hypothalamic and extrahypothalamic sites in the rat brain. *Neurosci Lett* 12:265.

SAMSON WK, LUMPKIN MD, MCDONALD JK, MCCANN SM (1983) Prolactin-releasing activity of porcine intestinal peptide (PHI-27). *Peptides* 4:817.

SANDERS-BUSH E, STERANKA LR (1978) Immediate and long-term effects of p-chloroamphetamine on brain amines. *Ann NY Acad Sci* 305:208.

SANTOME JA, DELLACHA JM (1985) Relación entre estructura química y función de las hormonas hipotálamo-hipofisarias. En: *Endocrinología Molecular*, 2º edición, p. 39.

SAR M, MEITES J (1969) Effects of suckling on pituitary release of prolactin, GH and TSH in post partum lactating rats. *Neuroendocrinology* 4:25.

SATO S (1980) Postnatal development, sexual difference and variation during the sexual cycle of prolactin cells in rats: the special reference to the topographic affinity to a gonadotroph. *Endocrinol Jpn* 27:573.

SAUNDERS A, TERRY LC, AUDET J, BRAZEAU P, MARTIN JB (1976) Dynamic studies of growth hormone and prolactin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology* 21:193.

SELMANOFF M, GREGERSON KA (1984) Autofeedback effects of prolactin on basal suckling-induced and proestrous secretion of prolactin. *Proc Soc Exp Biol Med* 175:398.

SHAAR CJ, CLEMENS JA (1974) The role of catecholamines in the release of anterior pituitary prolactin in vitro. *Endocrinology* 95:1202.

SHAAR CJ, CLEMENS JA, DININGER NB (1979) Effect of vasoactive intestinal polypeptide on prolactin release in vitro. *Life Sci* 25:2071.

SHEWARD WJ, HARMAR AJ, FRASER HM, FINK G (1983) Thyrotropin-releasing hormone in rat pituitary stalk blood and hypothalamus: studies with high performance liquid chromatography. *Endocrinology* 113:1865.

SHIMATSU A, KATO Y, MATSUSHITA N, KATAKAMI H, YANAIHARA N, IMURA H (1981) Immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in rat hypophysial portal blood. *Endocrinology* 108:395.

SHIMATSU A, KATO Y, MATSUSHITA N, KATAKAMI H, YANAIHARA N, IMURA H (1982) Stimulation by serotonin of vasoactive intestinal polypeptide release into rat hypophysial portal blood. *Endocrinology* 111:338.

SHIMATSU A, KATO Y, INOVE T, CHRISTOFIDES ND, BLOOM SR, IMURA H (1983 a) Peptide histidine isoleucine-and vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity coexist in rat hypophysial portal blood. *Neurosci Lett* 43:259.

SHIMATSU A, KATO Y, MATSUSHITA N, KATAKAMI H, OHTA H, YANAIHARA N, IMURA H (1983 b) Serotonin stimulates vasoactive intestinal polypeptide release from rat hypothalamus in vitro. *Brain Res* 264:148.

SHIMATSU A, KATO Y, OHTA H, TOJO K, KABAYAMA Y, INOUE T, YANAIHARA N, IMURA H (1984) Involvement of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in prolactin secretion induced by serotonin in rats. *Proc Soc Exp Biol and Med* 175:414.

SIMS KB, DAVISY GA, BLOOM FE (1973) Activities of 3,4-dihydroxy-1-phenylalanine and 5-hydroxy-1-tryptophan decarboxylases in rat brain: assay, characteristics and distribution. *J Neurochem* 20:449.

SIMS KB, HOFFMAN DL, SAID SI, ZIMMERMAN EA (1980) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. Brain Res 186:165.

SINHA YN (1980) Molecular size variants of prolactin and growth hormone in mouse serum: strain differences and alterations of concentrations by physiological and pharmacological stimuli. Endocrinology 107:1959.

SINHA YN, GILLIGAN TA (1981) Identification of a less immunoreactive form of prolactin in the rat pituitary. Endocrinology 108:1091.

SINHA YN, GILLIGAN TA (1984) A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. Endocrinology 114:2046.

SLADEK JR, SLADEK CO (1978) Localization of 5-HT within tanycytes of the rat median eminence. Cell and Tissue Res 186:465.

SMITH MS, NEILL JD (1977) Inhibition of gonadotropin during lactation in the rat: relative contribution of suckling and ovarian steroids. Biol Reprod 17:255.

SMITH MS (1978) The relative contribution of suckling and prolactin to the inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat. Biol Reprod 19:77

SMITH MS (1980) Role of prolactin in regulating gonadotropin secretion and gonad function in female rats. Fed Proc 39:2571.

SMITH MS (1981) Site of action of prolactin in the suppression of gonadotropin secretion during lactation in the rat: effect on pituitary responsiveness to LHRH. Biol Reprod 24:967.

SNEDECOR GW, COCHRAN WG (1956) Statistical Methods. Iowa State University Press, Iowa.

SPINEDI E, NEGRO-VILAR A (1983) Serotonin and adrenocorticotropin (ACTH) release: direct effects at the anterior pituitary level and potentiation of arginine vasopressin-induced ACTH release. Endocrinology 112:1217.

STEINBUSCH HWM, NIEUWENHUYS R (1982 a) Localization of serotonin like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special references to the innervation of the hypothalamus. Adv Exp Med Biol 133:7.

STEINBUSCH HWM, NIEUWENHUYS R (1982 b) The raphe nuclei of the rat brainstem: a cytoarchitectonic and immunohistochemical study. Chemical Neuroanatomy. Emerson P ed. Raven Press, New York.

STEINBUSCH HWM, VERHOFSTAD AAJ, JOOSTEN HWJ, GOLDSTEIN M (1982) Serotonin-immunoreactive cell bodies in the nucleus dorsomedialis hypothalami, in the substantia nigra, and in the area tegmentalis ventralis of Tsai: observations after pharmacological manipulations in the rat. En: Neurology and Neurobiology. VI. Cytochemical methods in neuroanatomy. Chan-Palay V, Palay SL eds. Boston. p 407.

STEVENS RW, LAWSON DM (1977) The influence of estrogen on plasma prolactin levels induced by thyrotrophin releasing hormone (TRH), clonidine and serotonin in ovariectomized rats. Life Sci 20:261.

STOBIE KM, SHIN SH (1983) Serotonin stimulates prolactin secretion in the hypophysectomized adeno-hypophyseal grafted rat. Acta Endocrinologica 102:511.

STRAUS E, KELTZ TN, YALOW RS (1982) Enzymatic degradation of VIP. En: Vasoactive Intestinal Peptide. Said SI ed. Raven Press, New York, p 333.

STRICKER P, GREUTER F (1928) Action du lobe anterieur de l'hypophyse sur la montee laiteuse. C R Soc Biol 99:1978.

SUBRAMANIAN MG, REECE RP (1975) Anterior pituitary and plasma prolactin in rats after 2 to 90 minutes of suckling. Proc Soc Exp Biol Med 149:754.

SUBRAMANIAN MG, GALA RR (1976 a) Further studies on the effects of adrenergic, serotonergic and cholinergic drugs on the afternoon surge of plasma prolactin in ovariectomized, estrogen-treated rats. Neuroendocrinology 22:240.

SUBRAMANIAN MG, GALA RR (1976 b) The influence of cholinergic, adrenergic, and serotonergic drugs on the afternoon surge of plasma prolactin in ovariectomized, estrogen-treated rats. Endocrinology 98:842.

SUH HK, FRANTZ AG (1974) Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. J Clin Endocrinol Metab 39:928.

TAKAHARA J, ARIMURA A, SCHALLY AV (1974) Suppression of prolactin release by a purified porcine PIF preparations and catecholamines infused into a rat hypophysial portal vessel. Endocrinology 95:462.

TAKAHARA J, YAMAUCHI J, NIIMI M, KAGEYAMA J, AOKI Y, FUJINO K, HASHIMOTO K, OFIJI T (1981) Mechanism of prolactin release by 5-hydroxytryptophan. *Life Sci* 29:1463.

TALWALKER PK, RATNER A, MEITES J (1963) In vitro inhibition of pituitary prolactin synthesis and release by hypothalamic extract. *Am J Physiol* 205:213.

TATEMOTO K, MUTT V (1980) Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 285:417.

TATEMOTO K, MUTT V (1981) Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon-secretin family. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 78:6603.

TERKEL J, BLAKE CA, SAWYER CH (1972) Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology* 91:49.

TINDAL JS, KNAGGS GS (1977) Pathways in the forebrain of the rat concerned with the release of prolactin. *Brain Res* 119:211.

TRULSON ME, JACOBS BL (1976) Behavioral evidence for the rapid release of CNS serotonin by PCA and fenfluramine. Eur J Pharmacol 36:149.

TUCKER HA (1974) General endocrinological control of lactation. En: Lactation. A Comprehensive treatise, vol 1: The mammary gland. Development and maintenance. Larson, BL, Smith VR eds. Academic Press, New York and London. p. 277.

TWAROG BM, PAGE IH (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. J Physiol 175:157.

UNGERSTEDT U (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. Acta Physiol Scand. Supp 367:1.

VALVERDE-RC, CHIEFFO V, REICHLIN S (1972) Prolactin-releasing factor in porcine and rat hypothalamic tissue. Endocrinology 91:982.

VAN DE KAR LD, LOREN SA (1979) Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and median raphe nuclei. Brain Res 162:45.

VAN DE KAR LD, BETHEA CL (1982) Pharmacological evidence that serotonergic stimulation of prolactin secretion is mediated via the dorsal raphe nucleus. *Neuroendocrinology* 35:225.

VAN NOORDEN S, POLAK JM, BLOOM SR, BRYANT MG (1979) Vasoactive intestinal polypeptide in the neurohypophysis. *J Endocrinol* 81:140P

VIJAYAN E, SAMSON WK, SAID SI, MCCANN SM (1979) Vasoactive intestinal peptide: evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone, luteinizing hormone and prolactin in conscious ovariectomized rats. *Endocrinology* 104:53.

VILLAR MJ, CHIOCCHIO SR, TRAMEZZANI JH (1984) Origin and termination of dorsal raphe-median eminence projection. *Brain Res* 324:165.

VITALE ML, PARISI MN, CHIOCCHIO SR, TRAMEZZANI JH (1984) Median eminence serotonin involved in the proestrus gonadotropin release. *Neuroendocrinology* 39:136.

VITALE ML, PARISI MN, CHIOCCHIO SR, TRAMEZZANI JH (1985) Serotonin stimulates gonadotrophin release by acting directly on the median eminence. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 35:473.

VITALE ML, PARISI MN, CHIOCCHIO SR, TRAMEZZANI JH (1986) Serotonin induces gonadotrophin release through stimulation of LH-RH release from the median eminence. J Endocrinol in press. 111:309.

VITALE ML, VILLAR MJ, CHIOCCHIO SR, TRAMEZZANI JH (1987) Dorsal raphe lesion alters the estrous cycle and the pre-ovulatory gonadotropin release. Neuroendocrinology 46:252.

VOOGT JL, SAR M, MEITES J (1969) Influence of cycling, pregnancy, labor and suckling on corticosterone-ACTH levels. Am J Physiol 216:655.

VOOGT JL, MEITES J (1973) Suppression of proestrous and suckling-induced increase in serum prolactin by hypothalamic implant of prolactin. Proc Soc Exp Biol Med 142:1056.

WEINER RI, GANONG WF (1978) Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. Physiol Rev 58:905.

WELSCH CW, NEGRO-VILAR A, MEITES J (1968) Effect of pituitary homografts on host pituitary prolactin and hypothalamic PIF levels. Neuroendocrinology 3:238.

WERNER S, HULTING A-L, HÖKFELT T, ENEROTH P, TATEMOTO K, MUTT V, MARODER L, WÜNSCH E (1983) Effect of the peptide PHI-27 on prolactin release in vitro. Neuroendocrinology 37:476.

WESTLUND KN, CHIELDS GV (1982) Localization of serotonin fibers in the rat adenohypophysis. Endocrinology 111:1761.

WHITWORTH NS, GROSVENOR CE, MENA F (1981) Autofeedback regulation of prolactin (PRL) secretion: effect of prolactin before suckling on the subsequent nursing-induced release of PRL in the lactating rat. Endocrinology 108:1279.

WILLOUGHBY JO, MENADUE M, JERVOIS P (1982) Function of serotonin in physiologic secretion of growth hormone and prolactin: action of 5,7-dihydroxytryptamine, fenfluramine and p-chlorophenylalanine. Brain Res 249:291.

WISE PM (1986) Effects of hyperprolactinemia on estrous cyclicity, serum luteinizing hormone, prolactin, estradiol and progesterone concentrations, and catecholamine activity in microdissected brain areas. Endocrinology 118:1237.

WUTTKE W, BJÖRKLUNG 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 prolactin levels in male rats. Brain Res 134:317.

YANAIHARA N, SAKAGAMI M, SATO H, YAMAMOTU K, HASHIMOTU T,
YANAIHARA C, ITO Z, YAMAGUCHI K, ABE K (1977) Immunological
aspects of secretin, substance P, and VIP. Gastroenterology
72:803.

ZARROW MX, SCHLEIN PA, DENENBERG VH, COHEN HA (1972) Sus-
tained corticosterone release in lactating rats following
olfactory stimulation from the pups. Endocrinology 91:191.

ZIEHER LM, DE ROBERTIS E (1963) Subcellular localization
of 5-hydroxytryptamine in rat brain. Biochem Pharmacol
12:596.