

## Tesis de Posgrado

# Estudios sobre el mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides sexuales sobre la secreción de gonadotrofinas en la rata : Influencia de la glándula pineal, sistema serotoninérgico, péptidos opioides endógenos y estados de hiperprolactinemia

Faigón, María Rosa

1988

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Faigón, María Rosa. (1988). Estudios sobre el mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides sexuales sobre la secreción de gonadotrofinas en la rata : Influencia de la glándula pineal, sistema serotoninérgico, péptidos opioides endógenos y estados de hiperprolactinemia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2102\\_Faigon.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2102_Faigon.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Faigón, María Rosa. "Estudios sobre el mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides sexuales sobre la secreción de gonadotrofinas en la rata : Influencia de la glándula pineal, sistema serotoninérgico, péptidos opioides endógenos y estados de hiperprolactinemia". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2102\\_Faigon.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2102_Faigon.pdf)

*República Argentina*

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE RETROALIMENTACION POSITIVO  
EJERCIDO POR LOS ESTEROIDES SEXUALES SOBRE LA SECRECION  
DE GONADOTROFINAS EN LA RATA.

INFLUENCIA DE LA GLANDULA PINEAL, SISTEMA SEROTONINERGICO,  
PEPTIDOS OPIOIDES ENDOGENOS Y ESTADOS DE HIPERPROLACTINEMIA.

Autor: María Rosa FAIGON

Director: Prof. Dr. Jaime A. MOGUILVSKY

Lugar de Trabajo: Departamento de Fisiología, Facultad de  
Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Tesis presentada para optar al Título de: Doctora en Ciencias  
Biológicas.

*2.102  
Ej. 2.*

1 9 8 8

**Mi Fami**

## AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Jaime A. MOGUILEVSKY, quien me ha guiado en la investigación científica a lo largo de todos estos años, por toda la colaboración brindada para la realización de esta Tesis.

A los Profs. Dres. Daniel P. CARDINALI y Modesto C. RUBIO, por su participación en los experimentos sobre glándula pineal y serotonina, respectivamente.

A mis compañeros de laboratorio, por las horas de trabajo compartidas.

A mis amigos, que siempre me han alentado en esta tarea.

A mi familia, por su apoyo incondicional.

A la Srta. Julia N. MORALES, por la labor dactilográfica de la Tesis y al Sr. Norberto MALARINI, por la confección de los dibujos científicos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la ayuda otorgada para llevar a cabo los experimentos aquí presentados.

# I N D I C E

	Página
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.A. Eje Hipotálamo-Hipófiso-Ovárico. Mecanismos de Regulación. Ciclo Sexual.	2
1.B. Diferenciación Sexual del Hipotálamo.	33
1.C. Control Neuroendócrino de la Pubertad en la Rata Hembra.	42
<b>2. ESTUDIOS EXPERIMENTALES</b>	<b>55</b>
2.A. Estudios sobre el Desarrollo del Mecanismo de Retroalimentación Positivo Ejercido por los Esteroides Sexuales sobre la Secreción de Gonadotrofinas en la Rata Prepúber.	56
2.A.1. Desarrollo del Mecanismo de Retroalimentación Positivo Normal.	56
2.A.2. Acción de la Glándula Pineal.	67
2.A.3. Acción del Sistema Serotoninérgico.	83
2.A.4. Acción de los Péptidos Opioides Endógenos.	112
2.A.5. Acción de la Hiperprolactinemia.	127
2.B. Estudios sobre el Mecanismo de Retroalimentación Positivo Ejercido por los Esteroides Sexuales sobre la Secreción de Gonadotrofinas en la Rata Adulta.	141
2.B.1. Acción de la Melatonina.	141
2.B.2. Acción del Sistema Serotoninérgico.	149
2.B.3. Acción de la Hiperprolactinemia.	157

**USIO**

## ABREVIATURAS

A:	Adrenalina
AHA:	Area Hipotalámica Anterior
ANOVA:	Análisis de Varianza
APO:	Area Preóptica
APOM:	Area Preóptica Medial
ASQ:	Area Supraquiasmática
CA:	Catecolaminas
DA:	Dopamina
DBH:	Dopamina- $\beta$ -Hidroxilasa
E <sub>2</sub> :	Estradiol
EM:	Eminencia Media
FSH:	Hormona Folículo-Estimulante
GABA:	Acido $\gamma$ -Aminobutírico
GCS:	Gangliectomía Cervical Superior
GH:	Hormona de Crecimiento
GR:	Gonadotrofinas
HMB:	Hipotálamo Medio Basal
5-HT:	Serotonina
5-HTP:	5-Hidroxitriptofano
i.p.:	Intraperitoneal
i.v.:	Intravenosa
LCR:	Líquido Céfalo-Raquídeo
LH:	Hormona Luteinizante
LRH:	Hormona Liberadora de LH y FSH
$\mu$ g:	Microgramos
ml:	Mililitros

NA: Noradrenalina  
P: Progesterona  
PCA: Para-Cloroanfetamina  
PCPA: Para-Clorofenilalanina  
Pgs: Prostaglandinas  
PIF: Factor Inhibidor de Prolactina  
PMS: Suero de Yegua Preñada  
PRF: Factor Liberador de Prolactina  
PRL: Prolactina  
POE: Péptidos Opioides Endógenos  
Px: Pinealectomía  
RIA: Radioinmunoensayo  
s.c.: Subcutánea  
SNC: Sistema Nervioso Central  
TRH: Hormona Liberadora de Tirotrófina





### 1.A. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-OVARICO

El SNC controla la función gonadotrófica de la hipófisis a través de la síntesis y liberación de la hormona liberadora de LH y FSH (LRH), la que produce a nivel hipofisario la liberación de LH y FSH. Estas hormonas, al actuar sobre el ovario, regulan su funcionamiento. Además, las hormonas ováricas modulan la secreción de gonadotrofinas actuando a nivel hipotalámico e hipofisario.

Para poder interpretar el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, es necesario estudiar independientemente cada uno de los niveles que lo constituyen, para luego poder integrarlos en los distintos mecanismos de retroalimentación que los interconectan.

#### Nivel Hipotalámico

En 1971 se esclareció la estructura química de LRH que es la hormona hipotalámica que regula la secreción de LH y FSH. Se trata de un decapeptido cuya secuencia de aminoácidos es Glu-His-Trip-Ser-Tir-Gli-Leu-Arg-Prol-Gli-NH<sub>2</sub> (1).

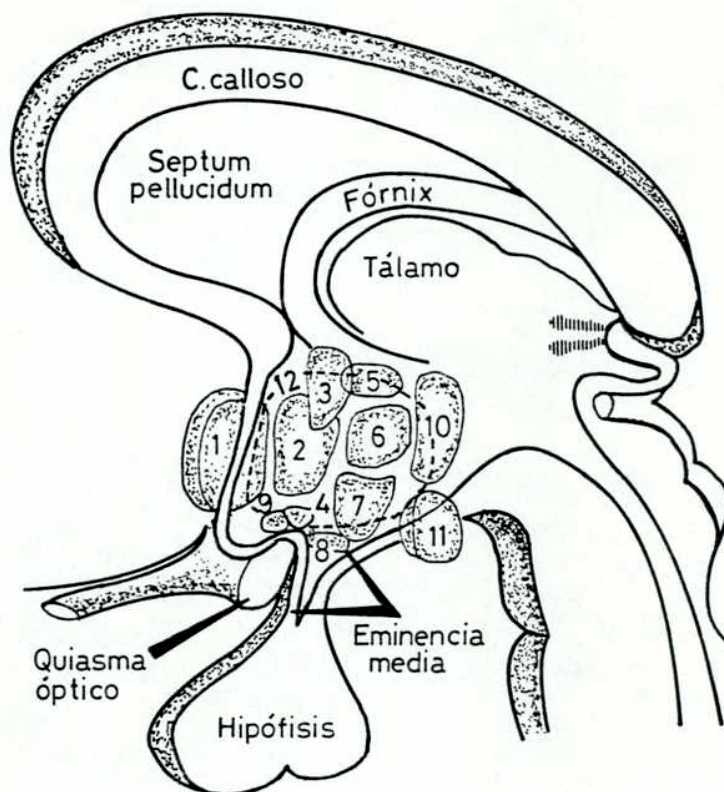
Mediante diversas técnicas de RIA y microdissección se ha podido estudiar la localización intrahipotalámica de LRH. Se vio

que está concentrada principalmente en la EM y el núcleo arcuato (2), encontrándose también grandes cantidades en el órgano vascular de la lámina terminalis (3) y en pequeñas cantidades en los núcleos supra y ventromediano y supraquiasmático. Sin embargo, el hecho de haberse hallado mayor concentración de LRH en esas zonas, no significa que sea en ellas donde la hormona se sintetiza. Mediante técnicas inmunocitoquímicas se han podido mapear los cuerpos celulares y las proyecciones de las neuronas LRH hipotalámicas. Algunos de dichos cuerpos celulares se localizan en el HMB y en el núcleo arcuato, pero la mayoría se encuentra dentro del área preóptica medial (4). Se ha sugerido que la LRH se sintetiza en el APO y ASQ y también en la zona del núcleo paraventricular, acumulándose en la región de la EM (5) (Figura 1).

### Nivel Hipofisario

La glándula hipofisaria tiene poca autonomía. La secreción de GR prácticamente se anula al estar separada del hipotálamo. La síntesis y liberación de LH y FSH adenohipofisarias se realiza debido al estímulo de LRH, de donde se desprende que todos aquellos factores que regulan la secreción de GR actúan indirectamente sobre la hipófisis. Existen sin embargo evidencias de que tanto la

FIGURA 1. Areas y núcleos hipotalámicos.



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

testosterona como los estrógenos pueden actuar a nivel hipofisario modificando la respuesta de la glándula a LRH (6,7).

La LRH es capaz de promover la liberación de LH y FSH, aunque no se descarta la posibilidad de que un factor hipotalámico independiente controle la secreción de FSH. Es posible encontrar ambas GR dentro de la misma célula gonadotropa humana. Sin embargo, hay evidencias que indican que la LRH produce una regulación diferencial para LH y FSH. Por ejemplo, utilizando fetos humanos, se observó que las células gonadotropas primitivas se desarrollan antes que el sistema portahipofisario y secretan en principio FSH y PRL en respuesta a LRH en el medio de cultivo. Una vez desarrollado el sistema porta, comienza a secretarse mayor cantidad de LH en relación a FSH en respuesta a LRH.

Otra posible evidencia del control diferencial ejercido por LRH sobre LH y FSH es el hecho de que al aumentar los niveles de estrógenos durante el período de madurez sexual y el inicio del ciclo sexual en la mujer, se produce una inhibición preferencial de FSH y un aumento paradójico de LH, con una reducción de la relación FSH/LH.

El desarrollo ontogénico diferencial y la modulación diferente ejercida por las hormonas periféricas al efecto de LRH podrían ser una evidencia de la independencia funcional de ambas GR, a pe

sar de estar reguladas por un mismo factor (Figura 2).

### Nivel Ovárico

El ovario desarrolla su función gametogénica y endócrina por acción de LH y FSH. La FSH provoca el crecimiento y la maduración folicular actuando sinérgicamente con la LH y el estradiol. La unión específica de la FSH al ovario se realiza exclusivamente a receptores de las células de la granulosa, mientras que los receptores a LH se encuentran en las células de la teca, en las células luteínicas y en algunas regiones de las células de la granulosa.

La FSH es fundamental para el desarrollo de los folículos más pequeños, donde estimula la producción de estradiol. Esta hormona provoca la madurez de las células de la granulosa y el desarrollo de receptores de LH, con la consecuente secreción de progesterona bajo el estímulo preovulatorio de LH (Figura 3).

Las células de la granulosa incubadas "in vitro" sintetizan progesterona antes de luteinizarse, sugiriendo que estas células pueden secretar dicha hormona antes de la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (8).

La LH actúa predominantemente sobre la síntesis de esteroides

FIGURA 2. Esquema de las divisiones de la hipófisis (mamíferos).

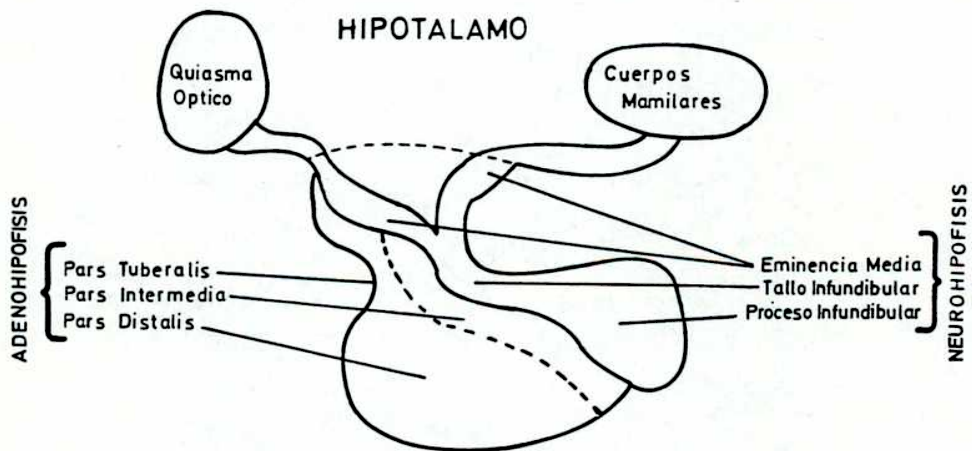
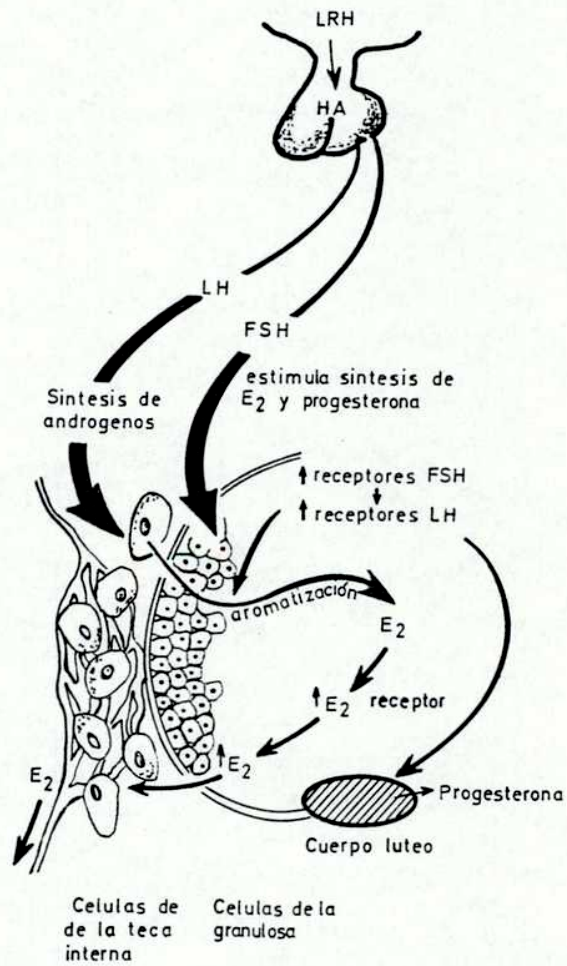


FIGURA 3. Funciones de las células de la teca interna y de la granulosa.



HA: Hipófisis Anterior; E<sub>2</sub>: Estradiol.



ováricos. Esto comienza con la unión de la hormona hipofisaria circulante a receptores específicos de alta afinidad ubicados en la membrana plasmática. La acción de la hormona es mediada por el AMP cíclico y proteína-quinasa. Numerosos estudios demostraron que el desarrollo de receptores a LH en los folículos ováricos va acompañado de un aumento de adenilato ciclasa y AMP cíclico(9,10). Los receptores a LH han sido caracterizados en el cuerpo lúteo de numerosas especies incluyendo al ser humano (11). La activación de estos receptores va acompañada por un aumento en la formación de AMP cíclico y de síntesis de progesterona.

La liberación de LH a mitad del ciclo reproductivo es esencial para la maduración del ovocito y la ovulación. Dentro del folículo, los cambios bioquímicos que preceden a la ovulación incluyen la despolarización de mucoproteínas del líquido folicular, con un aumento de la presión osmótica que produce una acumulación mayor del líquido folicular y agrandamiento del folículo (12). Se ha encontrado que las células de la granulosa liberan un activador plasminogénico en cantidades importantes que llegan a su punto máximo antes de la ovulación. Esta sustancia, que forma parte de un sistema proteolítico de importancia fundamental en la ruptura folicular, es activada por la LH in vivo e in vitro.

## Mecanismos de Regulación

### MECANISMO DE RETROALIMENTACION LARGO NEGATIVO EJERCIDO POR LOS ESTEROIDES OVARICOS SOBRE LA SECRECION DE GONADOTROFINAS

La secreción de gonadotrofinas es inhibida por la acción de los esteroides ováricos. El 17- $\beta$ -estradiol es el inhibidor más potente de la secreción gonadotrófica. La extirpación de los ovarios va seguida por un incremento tanto de LH como de FSH, que se hace evidente tanto en la rata como en la mujer dentro de las primeras 24 horas (13). Esta elevación alcanza su máximo aproximadamente al mes de la castración (13). La administración de estrógenos en estos casos, impide el incremento de gonadotrofinas. El aumento post-castración es mayor en el caso de FSH que en el de LH y ésto parece deberse a que la inhibición ejercida por la hormona ovárica es mayor para la FSH (14) o bien a la falta de inhibina, que es un potente inhibidor de la FSH (15).

la administración de 17- $\beta$ -estradiol en forma continua produce una disminución de los niveles de LH y FSH circulantes, tanto en la mujer como en la rata. En ratas castradas, la progesterona no modifica los niveles séricos de LH y FSH. Sin embargo, asociada a pequeñas concentraciones de estrógenos, induce una caída rá-

pida de ambas gonadotrofinas (15).

MECANISMO DE RETROALIMENTACION LARGO POSITIVO EJERCIDO POR  
LOS ESTEROIDES OVARICOS SOBRE LA SECRECION DE GONADOTROFINAS

Una de las características fundamentales del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico es la ciclicidad con la que se producen los cambios de los distintos elementos que constituyen el eje, como son las variaciones hipotalámicas en la síntesis y liberación de LRH que determina la liberación cíclica de GR, la ovulación y la producción de estrógeno y progesterona por el ovario.

El control cíclico de GR está relacionado en el caso de la rata, con la ausencia de andrógenos circulantes durante los primeros días de vida post-natal, lo que permite el desarrollo de determinadas estructuras nerviosas ubicadas en el hipotálamo anterior (áreas PO y SQ), denominadas "centro cíclico". En el macho, la presencia de testosterona a partir del nacimiento impide el desarrollo del centro cíclico ejerciéndose únicamente un control tónico de la secreción de GR. Los mecanismos responsables de dicho control residen en el hipotálamo medio (núcleos arcuato y ventromediano), y son los que mantienen la secreción basal de GR. Se lo denomina centro tónico (ver en detalle, Capítulo 1.B.).

Una de las características fundamentales del centro cíclico es la capacidad de responder a la administración de estrógenos con una descarga de LRH y por lo tanto de GR, produciéndose un efecto de retroalimentación positivo. Este mecanismo, característico de la hembra, es el responsable de la ovulación y la conservación de los ciclos sexuales.

Estudios realizados en la rata, han permitido demostrar que el mecanismo positivo madura alrededor de los 20-22 días de edad (16). En edades más tempranas se produce únicamente un efecto de retroalimentación negativo, es decir, descenso de los niveles gonadotróficos luego de la administración de estrógenos. Este hecho está demostrando que el control tónico de la secreción de GR responsable de mantener los niveles de las mismas en condiciones ba sales, se ejerce tanto en el macho como en la hembra desde el nacimiento y que el desarrollo del mecanismo cíclico en la hembra, completa un evento fisiológico en este sexo.

El efecto positivo ejercido por los estrógenos sobre la secreción de LH y FSH se produce en la hembra en condiciones fisiológicas. Durante el ciclo sexual normal de la mujer, el pico de liberación de ambas GR tiene lugar aproximadamente 24 horas después de que los niveles de estrógeno han alcanzado el máximo. En la rata, es posible adelantar la ovulación mediante la administrara

ción de estrógenos. La progesterona administrada en una sola dosis luego de la de estrógenos, potencia el efecto positivo de estos últimos tanto en la rata como en la mujer.

Todos aquellos factores que pueden modificar al mecanismo de retroalimentación positivo, afectan la ovulación y los ciclos sexuales. Estos factores pueden ser de origen nervioso (alteraciones en la concentración de neurotransmisores, influencia de otras estructuras nerviosas sobre la sensibilidad del centro cíclico, etc), hormonal (modificación de los niveles de esteroides circulantes), etc.

La glándula pineal es capaz de modificar la función reproductiva tanto en el macho como en la hembra. Como se describirá posteriormente (Capítulo 2.B.1.) , la administración de melatonina, principal hormona segregada por la glándula pineal, puede abolir el efecto positivo ejercido por los estrógenos sobre la secreción de LH en determinadas condiciones, mientras que en otras es capaz de facilitarlos. Teniendo en cuenta que la exposición a la luz modifica la función pineal y también el ciclo ovulatorio, los cambios en la secreción de melatonina inducidos por la luz, modificarán a nivel hipotalámico el efecto positivo ejercido por los estrógenos y así su acción sobre el ciclo sexual.

En resumen, los mecanismos de retroalimentación ejercidos por

las hormonas ováricas sobre la secreción de gonadotrofinas pueden ser positivos o negativos. Ambos se producen en condiciones fisiológicas y se los puede observar durante el ciclo normal. La prevalencia de uno sobre el otro depende del momento del ciclo, ya que esto implica un cambio de umbral de los distintos receptores involucrados en el mecanismo, de la concentración de hormonas ováricas, etc. Asimismo, la obtención de una estimulación o inhibición de la secreción de GR por acción esteroidea, depende de la dosis utilizada (en general dosis altas y sostenidas producen inhibición) y del momento del ciclo en el que se administran los esteroides.

#### MECANISMO DE RETROALIMENTACION CORTO NEGATIVO

Este mecanismo, en el cual LH y FSH pueden actuar a nivel hipotalámico controlando la síntesis y/o liberación de LRH y de esta manera su propia secreción, ha sido demostrado en varias situaciones experimentales. Por ejemplo, se vio que la administración de LH es capaz de modificar la actividad eléctrica del hipotálamo; también se comprobó que el implante de LH y FSH en el hipotálamo, produce una disminución de los niveles plasmáticos de GR (17,18).

## MECANISMO DE RETROALIMENTACION ULTRACORTO NEGATIVO

Se demostró "in vitro", que la LRH es capaz de inhibir su propia secreción a nivel del área hipotalámica anterior (19) lugar donde aparentemente se sintetiza en mayores cantidades. Este mecanismo estaría demostrando que la acumulación de LRH dentro de las células produciría una inhibición de la síntesis del mismo; en cambio, su liberación sería un estímulo para aumentar la síntesis.

### Liberación Pulsátil de GR

Uno de los factores claves en el control gonadotrófico de la función ovárica es la naturaleza pulsátil o episódica de la liberación de esas hormonas por la hipófisis, la cual está sujeta a la modulación ejercida por los esteroides ováricos. En ausencia de gónadas, los niveles altos de GR muestran un incremento en la amplitud y frecuencia de la descarga pulsátil de GR. El estradiol parece ser más efectivo en mantener la amplitud de los pulsos, en cambio la progesterona ejerce su efecto negativo disminuyendo la frecuencia de los mismos (20).

Se sabe que la liberación pulsátil de GR está relacionada temporalmente con la secreción también pulsátil de LRH hipotalámica

y a su acción sobre los gonadotropos hipofisarios a través de la circulación portal (21). Existen pruebas que demuestran que la liberación pulsátil de LRH está vinculada con la liberación central de CA, siendo la NA estimulante y la DA inhibitoria (22,23).

Ha sido demostrada la importancia de la naturaleza pulsátil de la secreción gonadotrófica para mantener una función ovárica óptima, en experimentos realizados por Knobil y colaboradores(24), quienes observaron que el estímulo continuo con LRH en monas con lesión del núcleo arcuato, induce un efecto de regulación negativo sobre los gonadotropos, con interrupción de la función ovárica.

### Ciclos Reproductivos

En mamíferos hembra se pueden observar dos tipos de ciclos reproductivos, producto de la integración de los mecanismos de retroalimentación positivo y negativo: estral y menstrual. Los primeros se encuentran en mamíferos inferiores como los roedores y los segundos solamente en los primates.

### Ciclo Menstrual

Este ciclo dura aproximadamente 28 días y culmina con una he



morragia o menstruación. El primer día de menstruación se considera día 1 del ciclo.

Cuando la función ovárica no se realiza convenientemente y disminuyen los niveles de esteroides circulantes, se produce un incremento de LH y FSH, como ocurre durante la menopausia y la castración. Esto se debe a que el efecto inhibitorio ejercido por los esteroides ováricos se atenúa o desaparece.

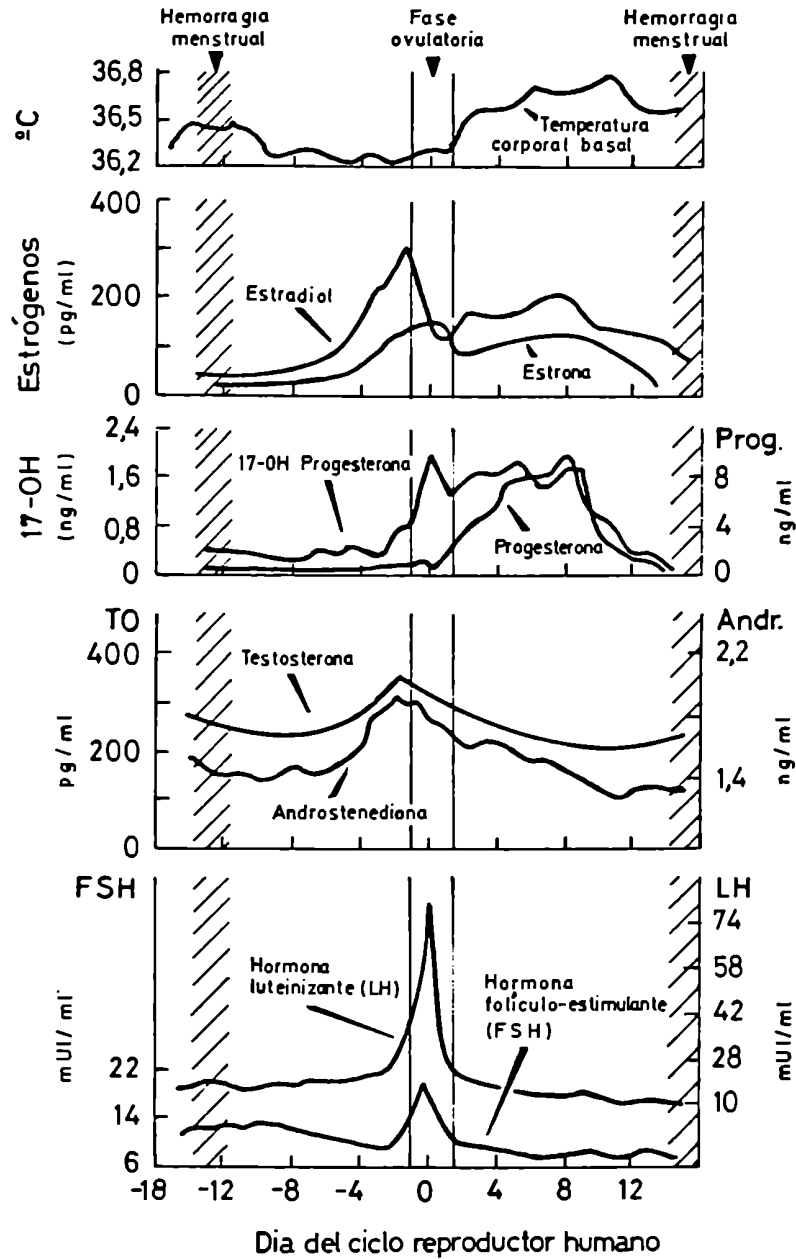
Durante la etapa prepuberal existen bajos niveles de esteroides y GR; ésto se debe en parte a que la LRH es sintetizada en pequeñas concentraciones y no estimula significativamente a la hipófisis, por lo tanto el eje hipotálamo-hipófiso-ovárico se encuentra poco activado.

Los niveles de GR, estrógenos, andrógenos y progestágenos sufren modificaciones cíclicas durante el ciclo sexual. Estos cambios cíclicos son comandados por el hipotálamo a través de la síntesis y liberación de LRH (Figura 4).

Los eventos que caracterizan al ciclo menstrual pueden ser divididos, para su mejor comprensión, en una fase folicular, una fase ovulatoria y una luteínica.

En la fase folicular temprana, que comienza al final de la fase luteínica del ciclo precedente, se observa un incremento en los niveles de FSH y el comienzo del desarrollo folicular. La con

FIGURA 4. Niveles de hormonas durante el ciclo menstrual.



Se indica con 0 la mitad del ciclo. A la izquierda del mismo, la fase folicular y a la derecha la fase luteínica.

centración de LH también aumenta pero 2 ó 3 días más tarde. Este aumento de GR está directamente relacionado con un incremento en la amplitud y frecuencia de los pulsos de secreción.

La secreción de esteroides se mantiene al principio relativamente constante. Aproximadamente una semana antes del pico ovulatorio de LH y FSH, se produce un incremento en los niveles de estradiol y estrona. El estradiol alcanza su nivel máximo el día anterior al del pico preovulatorio de LH. El aumento en los niveles de estrógenos provoca, en las horas siguientes, un descenso en los niveles de FSH. Esto no ocurre con la LH que continúa subiendo. Este comportamiento diferencial para ambas hormonas estaría dado por una mayor sensibilidad de la FSH al efecto de retroalimentación negativo ejercido por los esteroides ováricos o bien por un incremento en la secreción de inhibina por el ovario, que inhibe selectivamente a FSH (15).

Durante la fase ovulatoria, se observa el efecto de retroalimentación positivo de los esteroides sexuales sobre la secreción de LH y FSH, con una gran liberación de ambas hormonas aproximadamente 24 horas después del pico estrogénico. Un día antes de ese fenómeno, se produce también una liberación de progesterona que potencia el efecto positivo de los estrógenos (25). La descarga de LH y FSH promueve la maduración final del folículo, cuya ruptura

ra se produce 16 a 24 horas después del pico de LH.

La fase luteínica se caracteriza por una secreción significativamente mayor de progesterona, que llega a su máximo 8 días después del pico de LH. Debido al aumento en los niveles de progesterona y estrógenos, la LH y la FSH descienden en esta fase del ciclo.

Los niveles de estrógenos son mayores en la fase luteínica que en la folicular; además se mantienen permanentemente altos hasta por lo menos la mitad de la fase, en que comienzan a descender junto con los de progesterona.

El efecto de retroalimentación negativo que ejercen los esterooides sexuales sobre la secreción de GR en la fase luteínica, en lugar del efecto positivo de la fase preovulatoria, podría estar relacionado con una sensibilidad distinta del eje hipotálamo-hipofisario a estas hormonas, a diferencias en los niveles de hormonas ováricas en sangre entre estas fases del ciclo sexual o a una sensibilidad diferente de la hipófisis a LRH. La primera posibilidad está avalada por estudios que demuestran que la respuesta positiva de LH y FSH a los estrógenos varía a medida que va progresando la fase folicular; la segunda posibilidad, por la observación de que dosis continuas y elevadas de estrógenos y progesterona mantienen una inhibición permanente de la secreción gonadotró-

fica. Respecto a la última posibilidad, se vio que la sensibilidad de la hipófisis a LRH en cuanto a la liberación de LH, aumenta durante la fase folicular al acercarse al momento de la ovulación.

La secreción de GR se realiza en forma pulsátil relacionada con incrementos periódicos de LRH (26). Esta pulsatilidad se manifiesta tanto durante el ciclo sexual como en la menopausia.

### Ciclo Estral

Los roedores de laboratorio, tales como el ratón, la rata y el hamster, son especies poliéstricas que repiten ciclos a través del año sin mucha variación. La rata es la especie más estudiada experimentalmente. Su ciclo dura aproximadamente 5 días, divisibles en 4 estadios como lo ejemplifica la citología vaginal.

El estro, es el período de apareamiento y es cuando ocurre la copulación. Se caracteriza por la maduración de múltiples folículos ováricos, agrandamiento uterino y gran proliferación de la mucosa vaginal, lo que provoca la exfoliación de células escamosas cornificadas. Dura entre 10 y 24 horas y en este período ocurre la ovulación.

El metaestro, es el período intermitente entre estro y dies-

tro y ocurre poco después de la ovulación. Normalmente dura entre 10 y 14 horas. Los ovarios presentan cuerpo lúteo y folículos pequeños; el útero presenta una disminución de tamaño y vascularidad respecto al período precedente. En los extendidos vaginales aparecen muchos leucocitos junto con algunas células cornificadas.

El diestro se caracteriza por la presencia de extendidos vaginales formados casi enteramente por leucocitos. Se observa regresión del cuerpo lúteo y del útero. Dura entre 48 y 72 horas.

El proestro se caracteriza por la involución funcional del cuerpo lúteo. Los extendidos vaginales están formados casi enteramente por células epiteliales nucleadas. Se puede observar hinchazón preovulatoria de folículos ováricos. Dura aproximadamente 12 horas y precede inmediatamente al estro.

El fenómeno crítico en el ciclo estral es la ovulación. El desarrollo del folículo y la producción de estrógenos son promovidos por la LH y la FSH. Cuando la concentración de estrógenos en sangre es alta, la liberación de FSH disminuye y la de LH aumenta. Este mecanismo por el cual ocurre el pico de LH y la ovulación, se sabe que está regulado por neuronas hipotalámicas, las que a su vez están controladas por mecanismos generadores de ritmos circadianos endógenos, presumiblemente dentro del núcleo supraquiasmá-

tico (27,28). Se sabe que las lesiones de la región supraquiasmática en la rata, provoca estro continuo por períodos prolongados (28). El efecto de tales lesiones se atribuye a la pérdida de las funciones circadianas que se combinan para producir el ciclo de 4 ó 5 días (27).

Existe considerable variación entre los mamíferos que exhiben ciclos estrales, en cuanto a su duración y número de ciclos por año, pero la mayor información proviene de la rata y el hamster en cuanto a los mecanismos neurales que controlan el ciclo estral.

Se ha caracterizado el perfil de secreción de LH a través del ciclo estral de la rata. Gallo y colaboradores describieron la naturaleza pulsátil de esa hormona en las distintas etapas que lo conforman (29). Durante estro, los niveles de LH son los más bajos del ciclo, debido a la baja frecuencia de la liberación pulsátil. En metaestro los niveles de LH se encuentran elevados, siendo los más altos del período de baja liberación de esa hormona del ciclo estral. Ese aumento se debe a un incremento en la amplitud y al acortamiento del intervalo entre pulsos. Este ritmo permanece a través del diestro y la mañana del proestro. En la tarde del proestro, el pico de LH también es pulsátil, produciéndose picos secretorios de amplitud incrementada y frecuencia más rápida que

las observadas en otros momentos del ciclo estral.

El perfil de secreción de LH durante el ciclo estral sigue al de LRH. Aparentemente el índice de secreción bajo del estro es provocado por una atenuación de la liberación episódica de LRH. Se puede especular que la disminución súbita de la amplitud de pul sos de LH en diestro y la mañana del proestro es el resultado de una reducción en la concentración de LRH secretada en cada episodio inducida por los estrógenos.

Cada día del ciclo posee su perfil característico de secreción esteroidea. El estro es un período relativamente quiescente en cuanto a la secreción de esteroides ováricos. El cuerpo lúteo comienza a secretar progesterona a bajo nivel en la tarde del estro, seguido por tenores de secreción altos en la tarde del metaestro. Este alto nivel se mantiene hasta el mediodía del diestro, y luego cae abruptamente. Durante la actividad secretora umenta da del cuerpo lúteo, la secreción de estradiol también comienza a elevarse durante metaestro hasta el mediodía del diestro. Cuando se interrumpe la secreción de progesterona, la de estradiol umenta ta en dos fases bien definidas: una lenta, hasta las primeras ho ras del proestro, es seguida por un aumento rápido ya sea prece diendo o poco después del inicio del pico de LH de proestro. La



progesterona aparentemente juega un rol importante en la determinación del perfil característico de aumento de secreción de estradiol entre metaestro y la tarde del proestro.

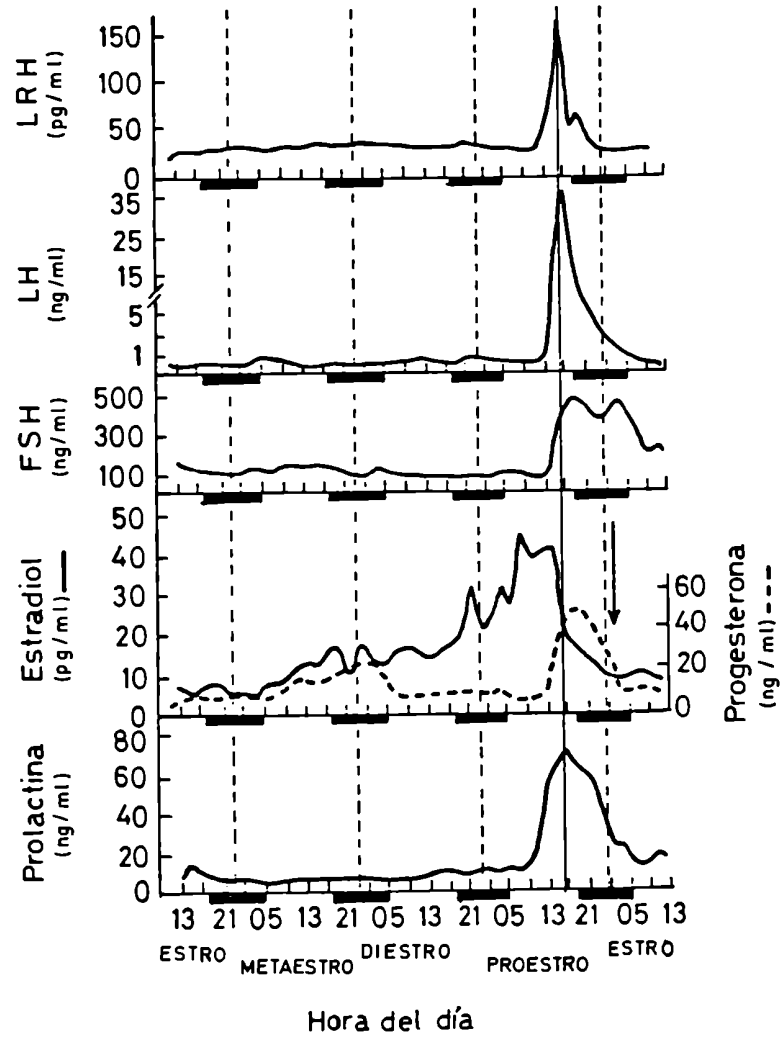
Se conoce poco respecto a la participación de las fluctuaciones diarias de estradiol y progesterona en la modulación de la secreción de LH durante las distintas fases del ciclo. Los niveles elevados de ambas hormonas en la tarde del proestro posiblemente reducen la secreción de LH y LRH a los bajos niveles del estro, y la pausa en la secreción esteroidea del estro posiblemente es la responsable del aumento abrupto en la amplitud y frecuencia de descarga de LH en metaestro. El aumento en la concentración de receptores hipofisarios a LRH en la tarde del metaestro, sería también producto de la secreción aumentada de LRH en ese día.

Varias observaciones sostienen que el sitio de acción del estradiol y la progesterona para el control de la secreción episódica de LH durante el ciclo es la hipófisis. A medida que la progesterona domina entre los esteroides ováricos, desde la tarde del proestro hasta el diestro, la respuesta hipofisaria a LRH exógena disminuye. Por otro lado, a medida que aumenta la secreción de estradiol, la respuesta hipofisaria a LRH también aumenta, por exposición de la glándula al estrógeno. Aparentemente aumentaría la cantidad de LH liberable en la hipófisis.

La secreción preovulatoria de LH en la tarde del proestro, de naturaleza pulsátil, muestra cambios discretos en la amplitud y frecuencia, que se pueden dividir en tres fases distintas: luego de una descarga de baja amplitud en la mañana del proestro, la liberación durante el período crítico parece subir en forma lineal, aunque la observación cuidadosa muestra que esta fase ascendente está compuesta por pulsos de amplitud y frecuencia alta. Luego de la hora y media, esta fase entra en un plateau con pulsos de alta amplitud y baja frecuencia, que dura aproximadamente una hora. Luego comienza a disminuir, a medida que baja la frecuencia de descarga. Parecería que el pico preovulatorio de LH puede ser producto de cambios en la cantidad y perfil de descarga de LRH. Durante la fase descendente parece intervenir en el retorno a la secreción basal, una disminución en la secreción de LRH más que una refractariedad de la hipófisis al estímulo prolongado.

Se ha observado una elevación en la concentración de LRH tanto circulante como en el plasma porta-hipofisario en la tarde del proestro (30), la cual es responsable posiblemente del disparo de LH en el período crítico. La descarga de LH se produce entre las 14 y 16 horas del día del proestro. Los eventos neuroendócrinos que llevan a la ovulación en la rata se observan esquemáticamente en la Figura 5.

FIGURA 5. Niveles de hormonas durante el ciclo estral de la rata.



Las barras negras indican los períodos de oscuridad. La flecha indica el momento de la ovulación.

En la rata hembra se pueden observar, por lo tanto, dos modalidades de secreción. La secreción basal se caracteriza por poseer picos episódicos de descarga cuya frecuencia y amplitud varía de acuerdo a las distintas fases del ciclo estral. Este tipo de secreción se establece tempranamente, durante el período juvenil. En la rata adulta, la secreción basal es interrumpida en la tarde del proestro por pulsos de gran amplitud y frecuencia, que constituyen el pico preovulatorio de LH. Este tipo de secreción cíclica se completa a las 5 semanas de vida postnatal.

La descarga periódica de LRH y las acciones regulatorias ejercidas por los esteroides ováricos son las que determinan las dos modalidades de secreción. Existen evidencias de que el estradiol ejerce una atenuación profunda sobre la amplitud de los pulsos de LRH y así sobre LH y FSH. Dado que los estudios no han permitido identificar estradiol y LRH en la misma neurona (31), puede ser que las neuronas productoras de LRH no sean el sitio de acción directo de la acción regulatoria del estradiol, sino que la misma se realice a través de otros sistemas neuronales y que luego sea traducida a las neuronas LRH.

La regulación de la secreción de LRH puede involucrar la liberación de neurotransmisores en o alrededor de las neuronas productoras de esa hormona. La naturaleza precisa de las interaccio

nes entre el sistema peptidérgico LRH y el sistema central monoaminérgico no es del todo clara.

Varias evidencias muestran que las neuronas productoras de NA del locus coeruleus de la rata parecen facilitar, mientras que las productoras de DA del sistema túberoinfundibular parecen inhibir la liberación de GR (32). Las fibras nerviosas provenientes de esos dos sistemas se encuentran asociadas con las terminaciones de las neuronas productoras de LRH a nivel de la EM (33). La existencia de una relación funcional entre esteroides sexuales y los sistemas monoaminérgicos es sugerida por la localización autorradiográfica de estradiol en los núcleos de neuronas NA y también por la de neuronas conteniendo receptores para estradiol rodeadas por terminales CA (34).

Utilizando una técnica combinada de autorradiografía e inmunohistoquímica, se pudo localizar estradiol en neuronas conteniendo tirosina hidroxilasa dentro del núcleo arcuato (35). Esto sugiere que el estradiol influye directamente sobre las neuronas CA, pudiendo ejercer sobre ellas efectos genómicos en sitios nucleares. Además se sugiere que las neuronas CA influyen sobre las neuronas peptidérgicas por inervación directa. Esta evidencia morfológica, junto a la observación de la existencia de un recambio disminuido de DA y aumentado de NA en la EM de la rata en el proes-

tro (32,36), da sostén al concepto de que el estradiol activa un sistema catecolaminérgico dual, que involucra un mecanismo dopaminérgico inhibitorio y uno noradrenérgico estimulante sobre el control de la secreción de LRH.

Otros neurotransmisores también parecen actuar en la regulación de la actividad de las neuronas LRH. Existe evidencia experimental que sugiere que la acetilcolina y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) estimulan y que la serotonina inhibe la liberación de LRH. Neuronas serotoninérgicas, colinérgicas y gabaérgicas están asociadas a circuitos neuronales que controlan la secreción de LRH.

La participación serotoninérgica en el control preovulatorio de LH es confusa. Algunos datos indican que la 5-HT ejerce un rol facilitador de la liberación fásica de LH y la ovulación, mientras que otros muestran un efecto inhibitorio. Las razones de estas discrepancias no se explican, aunque no puede descartarse que existan ambos mecanismos, que se activen bajo distintas condiciones fisiológicas y experimentales. Hay evidencias morfológicas de la presencia de terminales nerviosas serotoninérgicas en estrecho contacto con terminales que contienen LRH a nivel de la EM, lo que favorece la hipótesis sobre una interacción entre ambos sistemas a ese nivel. La concentración de 5-HT dentro de la EM varía durante el ciclo estral de la rata, observándose una reducción del

50 % en la tarde del proestro, probablemente asociada con la liberación de LH. La mayoría de las terminales serotoninérgicas se encuentran en el núcleo SQ, área que se sabe que está involucrada en el control de la ovulación y la regulación de ritmos circadianos de numerosas hormonas hipofisarias, entre ellas la LH. La inhibición de la síntesis de 5-HT o de sus receptores o el bloqueo del ritmo diario de 5-HT, anula completamente el ritmo circadiano de LH, la ovulación y la liberación de LH por administración de E<sub>2</sub> y P en la rata ovariectomizada (ver en detalle, Capítulo 2.A.3.).

Respecto a la participación de los péptidos opioides endógenos, se sabe que son capaces de reducir crónicamente la secreción de LH. Los POE se encuentran en grandes concentraciones dentro del hipotálamo, en la región relacionada directamente con el control de la secreción de GR. Se encontraron receptores opiáceos y neuronas productoras de tales péptidos en vecindad con las que contienen LRH, dentro del área PO y otras zonas que participan en la regulación de la liberación de LH, como el caso de la amígdala. Se cree que los opioides actúan alterando la actividad de aminas biogénicas hipotalámicas, por ejemplo, reduciendo la actividad de neuronas NA o estimulando las 5-HT. Se especula que los POE ejercen un rol inhibitor sobre la maduración del SNC durante la etapa prepuberal de la rata hembra (ver en detalle, Capítulo 2.A.4.).

Otro de los elementos químicos que parecen interactuar con la producción de LRH durante el ciclo sexual, son las prostaglandinas (Pgs). Se ha establecido que las de la serie E estimulan la liberación de LH y FSH incrementando aparentemente la liberación de LRH (37,38). Se cree que el efecto de las Pgs sobre la secreción de LRH es independiente de los mecanismos adrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico o colinérgico.

Se ha intentado explorar la participación de los distintos neurotransmisores en el efecto hipotalámico de las Pgs. En tal sentido, no se pudo impedir la acción de la  $PgE_2$  sobre la secreción de LH mediante el bloqueo del sistema CA o colinérgico (37). Sin embargo, se comprobó que la capacidad estimulante de la NA sobre la secreción de LRH disminuye significativamente cuando se incuban los tejidos con inhibidores de la síntesis de Pgs, efecto que puede ser revertido mediante la administración de  $PgE_2$  (39).



### 1.B. DIFERENCIACION SEXUAL DEL HIPOTALAMO

Son bien conocidas las diferencias entre ambos sexos, en especial aquellas que se refieren a los caracteres sexuales primarios y secundarios. Una de las diferencias fundamentales desde el punto de vista endócrino entre hembras y machos, es la presencia en las primeras de los ciclos sexuales. Estos ciclos, según los antiguos conceptos de Moore y Preece (40), eran debidos a la interacción entre la hipófisis y las gónadas; la primera segregaba gonadotrofinas en forma cíclica, las que actuando a nivel ovárico producían hormonas sexuales también en forma de ciclos.

Los estudios orientados a la determinación de la autonomía de la hipófisis en lo referente al control de los ciclos sexuales, han tenido su respuesta 25 años después que Moore y Preece formularan su teoría. Martínez y Bittner (41) demostraron mediante el transplante de hipófisis de machos en hembras y viceversa, que la hipófisis de un macho al ser colocada dentro de la silla turca de una rata hembra hipofisectomizada, adquiere la propiedad de segregar GR en forma cíclica y, por lo tanto, mantiene los ciclos normalmente en el animal receptor. Por otro lado, la hipófisis de la hembra al ser transplantada en un macho hipófisoprivo, adquiere la característica de secreción continua de GR (secreción tóni-

ca) que caracteriza al macho.

Es evidente, de acuerdo a estas experiencias, que la secreción cíclica o tónica de GR en la hembra y el macho respectivamente, no se debe a una acción autónoma de la hipófisis sino que depende de otras estructuras. Como se demostró más tarde, las diferencias sexuales en el tipo de secreción gonadotrófica se deben a la influencia del SNC sobre la hipófisis y es en el hipotálamo donde se originan los impulsos que dan como resultado la secreción cíclica o tónica de GR.

La administración de hormonas sexuales a animales en distintos momentos de maduración sexual ha permitido aclarar muchos de los aspectos de la diferenciación sexual. Desde muchos años atrás se tenían evidencias de que las hormonas podían actuar como inductoras de modificaciones fundamentales en el SNC (42,43). En 1936, Pfeiffer, (44) publicó un conjunto de observaciones que se pueden resumir así:

- 1) el injerto de un testículo en ratas hembra recién nacidas produce un síndrome anovulatorio, con desarrollo folicular sin cuerpo amarillo y estro permanente.
- 2) si se castra un macho recién nacido y una vez adulto se le injerta un ovario, éste muestra folículos normales y desarrolla

cuerpo lúteo. En el macho no castrado el injerto ovárico no desarrolla.

3) si se castra una rata hembra al nacer y se injerta un ovario cuando llega a la adultez, el mismo desarrolla normalmente y el animal ovula.

La administración de testosterona en animales prepúberes bajo diversas circunstancias experimentales permitió aclarar algunos hechos (45). En primer lugar, quedó bien establecido que la edad del animal que recibe la hormona es fundamentalmente importante en la respuesta obtenida.

El testículo de la rata secreta andrógenos ya a partir del nacimiento, en cambio el ovario inicia su secreción hormonal de manera significativa más tarde, alrededor de los 10 días de edad. Esto indica que existe una diferencia fundamental, desde el punto de vista hormonal entre ratas hembra y machos: mientras que el macho posee hormonas sexuales circulantes desde el nacimiento, la hembra carece de las mismas durante los primeros días de vida (o su concentración no es suficiente para afectar el desarrollo del SNC). Para que la administración de testosterona sea efectiva y provoque en la rata hembra el síndrome anovulatorio, debe ser administrada en todos los casos, antes del 5° día de vida. Los ani

males inyectados al 10° día ovularon cuando adultos en un 60 % de los casos, mientras que aquellos que se inyectaron a los 20 días de edad no presentaron alteración alguna (46).

Como en la rata macho la secreción de andrógenos se produce desde el nacimiento, para impedir sus efectos masculinizantes sobre el SNC, la castración debe realizarse antes del 3° día de vida. De este modo si se injerta un ovario en este animal se conseguirá hacerlo ovular (47).

De acuerdo con las evidencias existentes en la literatura, se desprende que en la rata y el ratón, la diferenciación del tipo de secreción gonadotrófica se produce durante los primeros días de edad del animal y está directamente influenciada por la presencia o no de hormonas androgénicas en ese período.

De acuerdo con los conocimientos existentes sobre el control nervioso de la hipófisis y a los experimentos de transplante de hipófisis de machos y hembras relatados anteriormente, que demostraron la participación de otras estructuras en la diferenciación sexual del ritmo gonadotrófico no fue difícil suponer que los andrógenos participaban en estos mecanismos actuando a través del SNC, especialmente a nivel hipotalámico (área PO-SQ del hipotálamo anterior) (Figura 6). La demostración de este hecho surgió a partir de experimentos en los que se pudo obtener el síndrome anog

vulatorio, semejante al observado con testosterona, por medio de diversas lesiones hipotalámicas. Por ejemplo, la destrucción electrolítica del área hipotalámica anterior, cerca del área preóptica, provocó en la rata hembra, una esterilidad permanente con estro continuo (48).

En base a esas experiencias se considera actualmente la existencia de dos niveles en lo que se refiere al control ejercido por el SNC sobre la secreción de GR: el primero se encuentra en el hipotálamo medio, en la zona de los núcleos arcuato y ventromediano; en ésta residen los mecanismos nerviosos responsables del control tónico o macho de la secreción gonadotrófica (Figura 7). El segundo nivel de regulación está situado en el hipotálamo anterior, en la zona de los núcleos preóptico-supraquiasmático, siendo estas áreas hipotalámicas responsables del control cíclico de la secreción gonadotrófica, ya que están directamente involucradas en la descarga cíclica de GR. Este segundo nivel actúa mediante la activación cíclica de los núcleos medianos del hipotálamo, responsables de la descarga tónica de GR. El resultado de esa activación es la descarga gonadotrófica en forma de ciclos, que provoca la ovulación.

Varios experimentos avalan la existencia de esos mecanismos. Se pueden citar entre ellos, los referentes a la desconexión del

hipotálamo medio del área hipotalámica anterior. Los animales con este tipo de desconexión no ovulan, pero mantienen una secreción tónica o basal de GR. Por otro lado, el estímulo eléctrico del hipotálamo anterior produce descarga de GR y ovulación en animales con esterilidad permanente inducida por administración de testosterona en los primeros días de vida (49,50). Esta observación demuestra que la administración de andrógenos a hembras recién nacidas altera los mecanismos ovulatorios a nivel del hipotálamo anterior (núcleos PO y SQ). Como conclusión e integrando todo lo expuesto, se puede considerar que:

- 1) las diferencias sexuales en el ritmo de secreción gonadotrófica, cíclico en la hembra y tónico en el macho, se deben a un tipo de control diferente ejercido por el hipotálamo sobre la anterohipófisis en ambos sexos.
- 2) tanto la rata macho como la hembra nacen con el primer nivel de control, que es de tipo tónico.
- 3) en la hembra, la falta de hormonas sexuales circulantes permite que entre el día 1° y 10° de vida se desarrolle el segundo nivel en el área hipotalámica anterior, siendo éste responsable de la secreción cíclica de GR.
- 4) en el macho, donde los testículos segregan andrógenos desde

el momento del nacimiento, el área involucrada en el control cíclico no se desarrolla, por efecto directo de las hormonas testiculares, teniendo por lo tanto un control tónico de la secreción de GR (Figuras 6 y 7).

Luego de la demostración de la influencia de los andrógenos en la diferenciación hipotalámica del control gonadotrófico, se ha tratado de determinar la especificidad de la acción androgénica. Los estudios han demostrado que es posible modificar el ritmo de secreción gonadotrófica y obtener esterilidad permanente, mediante la administración de un gran número de hormonas naturales como también de productos de síntesis. Por ejemplo, se puede citar en tre otros, a los estrógenos (51), progesterona (52), GR (53), etc. No se conoce exactamente el mecanismo de acción de estas sustancias y si juegan un papel importante en condiciones fisiológicas.

FIGURA 6. Efecto de la testosterona sobre la secreción cíclica de gonadotrofinas.

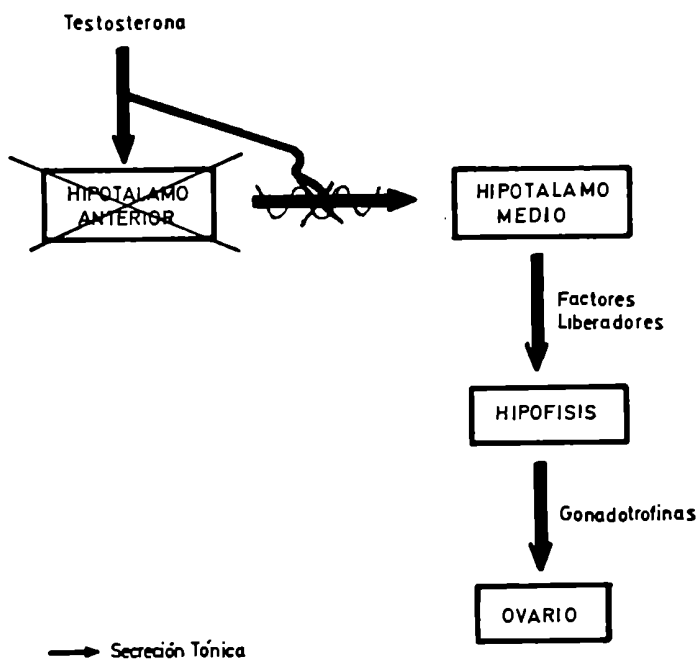
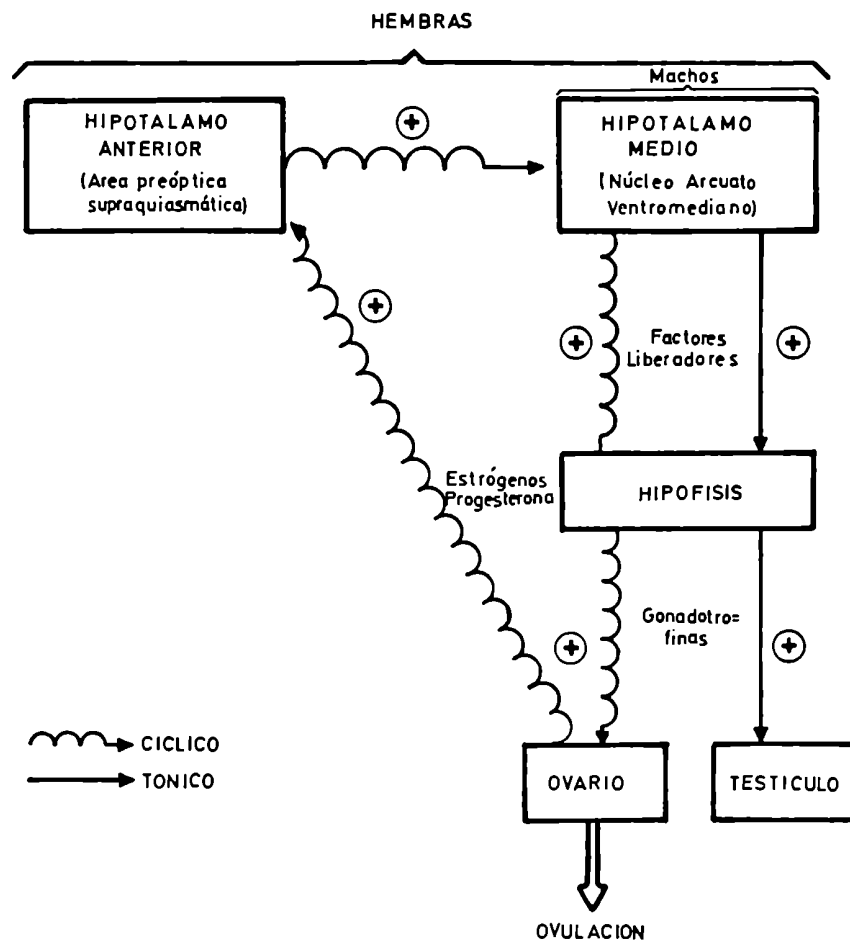




FIGURA 7. Control tónico (machos) y cíclico (hembras) de la secreción de gonadotrofinas.



### 1.C. CONTROL NEUROENDOCRINO DE LA PUBERTAD EN LA RATA HEMBRA

Parece haber concenso de que la pubertad no depende de un único mecanismo. Más bien, parece ser el resultado de la integración de varios procesos que se desarrollan en distintos momentos a través del período prepuberal. A continuación se reveen y discuten los mecanismos posibles involucrados en la génesis del primer pico preovulatorio de GR en la rata.

La primera ovulación ocurre, en el caso de la rata, alrededor de los 35-40 días de vida postnatal. Ojeda y colaboradores (54) proponen dividir al intervalo entre el nacimiento y la pubertad en cuatro fases: un período neonatal, que comprende la primera semana de vida postnatal; un período infantil, que se extiende entre los días 7 y 21 de vida; un período juvenil, entre los días 21 a aproximadamente 32 o más precisamente hasta la primera manifestación de actividad estrogénica aumentada (presencia de fluido uterino) y un período peripuberal, que incluye los días que acompañan la primera ovulación.

Existen tres componentes básicos que interactúan para alcanzar la madurez sexual: el cerebro, la hipófisis y las gónadas.

#### Glándula Hipófisis

La capacidad de los gonadotropos para responder a LRH desarrolla durante los últimos días de gestación, se hace máxima durante la segunda semana de vida postnatal y decrece luego a medida que el animal se acerca a la pubertad (55). En el primer proestro, bajo la influencia de niveles elevados de estrógeno, la respuesta a LRH aumenta nuevamente. Además, el aumento en los niveles de LRH observado en este período tiene de por sí un efecto sensibilizador sobre la hipófisis. De este modo, parece evidente que la hipófisis puede responder al estímulo de LRH con un aumento de LH muy tempranamente.

Dado que el SNC y el ovario alcanzan un desarrollo completo a una edad relativamente tardía, se puede concluir que la hipófisis es el primer componente del eje que adquiere competencia reproductiva.

#### El Hipotálamo y el Desarrollo del Mecanismo de Retroalimentación Positivo

Aunque no cabe duda de que el hipotálamo está sujeto a una variedad de influencias inhibitorias y estimulantes (56), también es claro que la madurez adecuada de áreas hipotalámicas específicas es condición fundamental para que ocurra la pubertad.

Pequeñas cantidades de LRH pueden ser detectadas por radioinmunoensayo en fetos de 17 días de gestación. Luego del nacimiento, la concentración de LRH en el HMB aumenta lentamente hacia la etapa puberal, pero la capacidad del hipotálamo para liberar el neuropéptido aumenta por primera vez alrededor de la segunda semana de vida. Existe evidencia indirecta que sugiere que esta capacidad aumenta otra vez durante la etapa juvenil.

En la pubertad, como consecuencia de los niveles permanentemente elevados de estrógenos, se produce el pico de LRH que provoca la primera descarga preovulatoria de LH y FSH. Mientras que el pico de LRH es en gran medida un fenómeno estrógeno-dependiente, el sistema liberador de LRH no se mantiene inactivo durante los días prepuberales, cuando los niveles de estrógenos son bajos. Hay autores que han descripto picos esporádicos de LH en ratas infantiles y juveniles (57). La magnitud de estas descargas parece estar atenuada durante el período juvenil (días 21 a 32), probablemente debido a una mayor influencia negativa esteroidea.

Durante el desarrollo juvenil tardío ocurre un cambio en la liberación pulsátil de LH, con pulsos más prominentes en la tarde que en la mañana (58). Este cambio parece reflejar los pasos de madurez finales del sistema liberador de LRH, dado que pocos días después ocurre el primer pico preovulatorio de LRH.

Los mecanismos que controlan la liberación prepuberal de LH no se conocen. La presencia de picos de LH en ratas infantiles fue inicialmente atribuída al mecanismo de retroalimentación positivo estrogénico funcional. Pero este concepto fue abandonado debido a que también se observó en ratas macho, que el disturbio entre las crías lo anula y que la administración de suero anti-estradiol no lo evita. También, durante la segunda semana de vida existe suficiente  $\alpha$ -feto-proteína en la circulación como para unir la mayor parte del estradiol existente (59). De este modo, parecería claro que es el SNC, al menos en parte, el involucrado en la génesis de los picos de LH. Al respecto, se vio que un aumento en el recambio de NA acompaña a los pulsos de LH (60).

Es evidente la importancia del tipo de liberación pulsátil de LRH para el desarrollo puberal, dado que la administración pulsátil de neuropéptido en monas prepúberes adelantó la primera ovulación y generó un perfil hormonal indistinguible del observado durante la pubertad normal (61). Así, mientras que la liberación de esporádica de LH en ratas inmaduras representa probablemente una actividad desordenada de la maquinaria liberadora de LRH en desarrollo, la sincronización vespertina de pulsos puede indicar una terminación de conexiones sinápticas entre las neuronas secretoras de LRH. Además puede reflejar el establecimiento de interacciones

neuronales funcionales LRH.

Han sido involucrados varios neurotransmisores en la maduración del sistema liberador de LRH, pudiendo ser que ellos operen en conjunto. Durante los días juveniles ocurre un aumento progresivo en el recambio de NA y DA, una disminución en la sensibilidad de los receptores hipotalámicos a la DA parece desarrollarse en presencia de un recambio elevado de DA (62) y se hace menos pronunciado el tono opioide inhibitorio que opera durante el período infantil (63).

Está bien establecida la participación de la NA en la liberación cíclica de LH en el animal adulto. La NA también parece participar en el primer pico preovulatorio de LH, dado que la destrucción de terminales hipotalámicas NA por medio de la neurotoxina específica 6-hidroxidopamina anula el pico de LRH inducido por administración de PMS en ratas prepúberes (64). El cambio principal observado en la actividad de los neurotransmisores durante los días que acompañan a la primera ovulación, es el aumento en el recambio de NA (65).

Se puede concluir que la alteración en la actividad de los neurotransmisores más directamente relacionada con la génesis del pico de LRH es el cambio en el metabolismo de NA. Cambios secuenciales en las actividades de DA, serotonina y opioidea también pue

den formar parte de los procesos de maduración de la secreción de LRH, pero de manera no bien aclarada.

Los mecanismos intracelulares que llevan al primer pico de LRH incluyen un aumento en la capacidad hipotalámica de producir PgE<sub>2</sub>. El aumento en la síntesis de PgE<sub>2</sub> es a la vez parcialmente dependiente de la elevación de los niveles de estradiol que antecede al pico de GR; así, el E<sub>2</sub> parece jugar un rol importante dentro de los procesos a través de los cuales el hipotálamo adquiere competencia. No solamente afecta el flujo de impulsos noradrenérgicos y la síntesis de PgE<sub>2</sub>, sino que también facilita el crecimiento neuronal y la formación de sinapsis maduras en áreas hipotalámicas ligadas con el control de la secreción de GR (66). Tal adquisición de conexiones interneuronales maduras puede ser fundamental tanto para la liberación pulsátil sincrónica de LH como para el pico preovulatorio de LRH.

La capacidad del eje hipotálamo-hipofisario para responder al estradiol con un pico de LH, desarrolla al final del período infantil (alrededor de los 20 días de edad). En este momento, sin embargo, los niveles necesarios para provocar el pico son el doble de los del primer proestro. Antes de esa edad, el estradiol es incapaz de inducir el pico de LH.

Luego del establecimiento del perfil de liberación de LH de

amplitud baja matutina y alta vespertina y en presencia de niveles adultos de liberación de GH y PRL, los ovarios comienzan a producir cantidades aumentadas de  $E_2$  y estimulan el crecimiento uterino y la acumulación de fluido uterino. Una vez que alcanza un nivel adecuado por un período de tiempo suficiente, el  $E_2$  actúa sobre una unidad hipotálamo-hipofisaria competente para provocar el primer pico de LRH y GR. Este aumento es acompañado por un incremento de 3 ó 4 veces en los niveles de P que puede facilitar el efecto estimulante del  $E_2$  sobre la liberación de LRH y LH (67).

Se puede concluir que el hipotálamo es el segundo componente del eje en alcanzar la competencia. Aunque durante los días prepuberales ocurren ajustes tardíos, el sistema liberador de LRH está totalmente capacitado para responder al estradiol con una liberación de LH de magnitud preovulatoria al final del período infantil (aproximadamente a los 22 días de edad).

#### Mecanismo de Retroalimentación Negativo Esteroideo

Durante los días infantiles y neonatales, el efecto negativo inducido por el  $E_2$  sobre la secreción de GR está oculto por la presencia de niveles elevados de  $\alpha$ -feto-proteína que une a los estrógenos con avidéz (68). El efecto negativo predominante en ese



momento es provisto por los andrógenos. Cuando esa proteína declina, aumenta la efectividad del E<sub>2</sub> haciéndose máxima durante los días juveniles. La capacidad del E<sub>2</sub> para mantener controlada la concentración de GR permanece operativa hasta el mismo día del proestro (69). Entre el momento del primer pico de GR y la ovulación ocurre una caída abrupta en la sensibilidad del SNC, de modo que el E<sub>2</sub> se hace menos efectivo para mantener a nivel la liberación de LH y FSH. Casi toda la efectividad es alcanzada sin embargo en presencia de niveles postovulatorios de P, los que en sí mismos no suprimen la liberación de GR. Así, en la pubertad existe un cambio de umbral de sensibilidad al efecto negativo del E<sub>2</sub> pero ese cambio no parece ser un fenómeno asociado con la primera ovulación y responsable del inicio puberal (70). Datos obtenidos en niñas agonadales y monas Rhesus parecen avalar el concepto de que el cambio en dicho umbral acompaña la pubertad pero no la inicia. Esto hace pensar que la madurez del SNC juega un rol esencial para que ocurra la pubertad. En el caso de los primates, se ha sugerido la existencia de un freno central de la secreción de GR como el responsable de mantener en su punto los niveles de las mismas en la etapa juvenil. En el caso de la rata, este mecanismo no parece jugar un rol predominante en la determinación del perfil prepuberal de la secreción gonadotrófica. En cambio, el

mecanismo de retroalimentación negativo esteroideo parece ser fundamental en el mantenimiento de la secreción de GR a bajo nivel.

La integración final del eje para iniciar la función cíclica no ocurre a menos que el ovario adquiriera la capacidad de secretar esteroides en concentraciones preovulatorias. El desarrollo ovárico se produce bajo la influencia del SNC que actúa gobernando la secreción de GR y también parecería que a través de influencias neurales directas sobre la glándula.

### El Ovario

El desarrollo del folículo preovulatorio lleva aproximadamente 19 días desde el inicio, inducido por los niveles elevados de FSH en ratas infantiles. Esos tenores altos parecen ser importantes para el inicio de la onda de crecimiento folicular que da como resultado el desarrollo de algunos de los folículos destinados a ovular en la pubertad.

Aunque el ovario infantil puede responder a las GR tanto exógenas como endógenas con secreción de esteroides, en la pubertad se observa el mayor grado de respuesta. La secreción de E<sub>2</sub> y P en respuesta a la administración de GR aumenta gradualmente durante el período juvenil y luego abruptamente pocos días antes de la o-

vulación. Estos cambios en la función esteroidea del ovario, como así también el desarrollo de la glándula en general, están determinados por factores intrínsecos y extrínsecos. Entre los intrínsecos se encuentra el aumento infantil de receptores a FSH que es seguido por un aumento juvenil de receptores a LH. Mientras que el número de receptores a LH en todo el ovario aumenta moderadamente en la pubertad, ocurre un marcado aumento en el contenido de receptores a LH en las células de la granulosa entre el período juvenil y el primer proestro, indicando un desarrollo folicular acelerado. Estos cambios en los receptores a LH se correlacionan bien con la capacidad de la LH para provocar una secreción de esteroides. En el primer proestro, la capacidad del ovario para producir  $E_2$  y P es máxima y se observa una caída abrupta en la producción de 3- $\alpha$ -androstenediol (metabolito androgénico 5- $\alpha$ -reducido). Alrededor del día 25 de edad ocurre una disminución en el número de receptores ováricos a LRH y esta declinación es mayor cuando se observa la mayor acumulación de fluido uterino. Esta caída de receptores a LRH podría indicar una influencia inhibitoria disminuída de LRH durante los días pre y puberales. Al mismo tiempo se hace más acentuada la influencia estimulante provista por mecanismos  $\beta$ -adrenérgicos. Receptores  $\beta$ -adrenérgicos del tipo  $\beta_2$  pueden ser detectados en ovarios juveniles y se vio que

aumentan durante el desarrollo preovulatorio. Su activación con agonistas  $\beta_2$  produce la liberación de P, andrógenos y algo de E<sub>2</sub>. Con excepción de androstenediona, la liberación del resto de esteroides se ve sólo en ovarios preovulatorios (P y testosterona) y luego de la ovulación (P). Se vio que el control adrenérgico de los ovarios es provisto tanto por la médula adrenal como por los nervios adrenérgicos ováricos. Mientras que la supresión de adrenalina (A) circulante por remoción de la médula adrenal retrasa el inicio puberal, la A puede actuar sobre células de la granulosa "in vitro" en concentraciones nanomolares aumentando la liberación de P y potenciando el efecto de las GR.

La sección del nervio ovárico resulta en una caída rápida de la liberación de esteroides. Luego existe un aumento en el contenido de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y un desarrollo de hipersensibilidad esteroidea a la estimulación  $\beta$  (medida en células de la granulosa en ratas juveniles).

El ovario también recibe inervación del nervio vago. Su sección disminuye la respuesta ovárica a GR y retrasa significativamente el inicio puberal, sugiriendo que la influencia vagal es estimulante de la función ovárica prepuberal. Las fibras vagales parecen ser peptidérgicas.

Así parecería que el desarrollo ovárico está regulado no so-

lamente por las GR sino también por aferentes neurales que pueden llevar información directa desde el hipotálamo a la glándula. Tal conexión puede explicar por qué el ovario está activado en la pubertad, a pesar de los bajos niveles de GR (aunque el cambio en la liberación pulsátil de LH ocurre antes de la pubertad).

Otras hormonas hipofisarias, la PRL y la GH, juegan un rol importante en la determinación del momento del desarrollo puberal en la rata hembra. La secreción de ambas aumenta durante el período prepuberal, en el momento en que las GR están bajas. La PRL adelanta el inicio puberal actuando a nivel del SNC (71) y del ovario (72). A nivel ovárico, la PRL favorece el desarrollo foliular y aumenta la respuesta esteroidea a las GR. Parece ejercer estos efectos facilitando las acciones de la LH a través del mantenimiento y/o aumento de la síntesis de receptores a LH. En contraste, el mecanismo que involucra el efecto central de la PRL no se conoce bien. Hay quienes observaron que la PRL libera FSH cuando se implantaba en el hipotálamo (73,73). Otros postularon que la PRL desensibilizaría los receptores a DA (mediante el aumento de recambio de DA) y así liberaría a LRH del tono inhibitorio do paminérgico (ver en detalle, Capítulo 2.A.5.).

La supresión de la GH retrasa el inicio puberal (75), fenómeno que no parece correlacionarse con cambios en el peso corporal,

sino que está más en relación con el desarrollo ovárico retrasado, producto de la deficiencia en GH. Al igual que la PRL, la GH puede actuar sobre el ovario para aumentar la capacidad esteroideogénica glandular a las GR (75).



2.A. ESTUDIOS SOBRE EL DESARROLLO DEL MECANISMO DE RETROALIMENTACION POSITIVO EJERCIDO POR LOS ESTEROIDES SEXUALES SOBRE LA SECRECION DE GONADOTROFINAS EN LA RATA PREPUBER

2.A.1. DESARROLLO DEL MECANISMO DE RETROALIMENTACION POSITIVO NORMAL

2.A.1.a. Acción de los Estrógenos "in vitro" sobre la Síntesis de Proteínas en Hipotálamo de Ratas Prepúberes

Introducción

Es un hecho bien conocido que los estrógenos juegan un papel fundamental en la descarga ovulatoria de GR a nivel hipotalámico, y que éste es un mecanismo fundamental en lo que se refiere a la aparición de la pubertad y los ciclos sexuales (76,77). Teniendo en cuenta la estructura peptídica del factor liberador de LH y FSH, los cambios en la síntesis proteica del hipotálamo bajo determinadas circunstancias experimentales, pueden ser un índice de modificaciones en la síntesis de LRH.

La finalidad de este trabajo ha sido investigar si los estrógenos "in vitro" son capaces de modificar la síntesis de proteínas



del hipotálamo; determinar, en caso afirmativo, la edad del animal en que este hecho se produce y estudiar si existen áreas específicas del hipotálamo involucradas en este fenómeno.

### Materiales y Método

Se utilizaron ratas macho y hembra prepúberes que crecieron en el vivero del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires bajo condiciones de luz y temperatura controladas (12 horas de luz, de 8 a 20 y 25 grados centígrados). Las ratas pertenecen a la cepa de dicho Departamento.

Los animales se sacrificaron por decapitación a los 10, 15 y 20 días de edad, extrayéndose el hipotálamo que fue dividido en tres áreas: anterior, media y posterior, mediante dos secciones transversales. La primera de ellas se realizó a través del quiasma óptico y la segunda inmediatamente detrás del infundíbulo, como fuera descrito en trabajos previos (78). Cada una de estas áreas fue dividida en dos porciones simétricas a través de un eje ántero-posterior; una de ellas fue incubada en un medio conteniendo 0.01 µg/ml de benzoato de estradiol y la otra mitad en un medio sin hormona. Para cada experimento individual se utilizaron 2 animales.

Una vez obtenidas, las muestras de tejido se secaron en papel de filtro, se pesaron en una balanza de torsión y luego se incubaron en 1 ml de medio isotónico conteniendo 1  $\mu$ Ci de leucina tritiada (L-4-5-3 H leucina, 20 Ci/ $\mu$ M). La incubación se realizó durante 90 minutos a 37 grados centígrados en un agitador metabólico tipo Dubnoff en fase de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5 v/v).

Una vez finalizada la incubación, se lavó el contenido dos veces con el medio de cultivo, se centrifugó y homogeneizó en 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % conteniendo 0.2 % de leucina no radioactiva. Luego de la homogeneización, se centrifugó la suspensión a 6.500 g durante 15 minutos. La fracción insoluble en ácido se lavó con el mismo al 5 %, dos veces con cloroformo: metanol y una vez con éter. El precipitado se separó por centrifugación en frío. El residuo se resuspendió con 2 ml de TCA, se calentó a 90 grados centígrados durante 15 minutos y se centrifugó nuevamente en frío. El residuo proteico se disolvió en 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 M y se tomaron alícuotas para determinar la concentración de proteínas (79) y medir la radioactividad. Esta última se determinó en un contador de centelleo líquido.

La radioactividad incorporada a proteínas se expresó en desintegraciones/minuto (DPM) por mg de proteína. Los resultados se analizaron estadísticamente de acuerdo al test "t" de Student.

## Resultados

En la Tabla I está representado el efecto del estradiol "in vitro" sobre la síntesis de proteínas en distintas áreas del hipotálamo y corteza cerebral de ratas hembra prepúberes. Como se puede observar, 0.01 µg/ml de hormona provocó un aumento significativo en la incorporación de leucina tritiada a proteínas del área hipotalámica anterior en ratas de 15 y 20 días de edad, pero no en animales de 10 días. Por otro lado, la adición de estradiol no modificó la síntesis de proteínas en las áreas hipotalámicas media y posterior, ni en la corteza cerebral.

Los estudios en ratas macho muestran que el estradiol no modificó la síntesis de proteínas en ninguna de las áreas hipotalámicas a ninguna de las edades estudiadas (Tabla II).

## Conclusiones

Se demuestra que el estradiol es capaz de estimular la síntesis de proteínas del área hipotalámica anterior de la rata hembra prepúber a partir de los 15 días de edad y no antes. Este efecto no se observa en la rata macho.

Teniendo en cuenta la estructura peptídica de la LRH, se puede

TABLA I. Incorporación de L(<sup>3</sup>H) leucina en Proteínas de Hipotálamo de Ratasa Hembra Prepúberes.

Tejido	10 Días		15 Días		20 Días	
	Control	Estradiol	Control	Estradiol	Control	Estradiol
Hipotálamo Anterior	17.378±1.837 <sup>a</sup> (6)	19.237±2.634 (6)	13.596±1.832 (14)	19.343±2.439 <sup>b</sup> (14)	8.109±1.028 (10)	12.520±1.677 <sup>b</sup> (10)
			p<0.025		p<0.025	
Medio	15.756±2.000 (6)	15.266±1.959 (6)	14.300±1.661 (13)	12.163±1.611 (13)	6.524±862 (8)	8.404±1.751 (8)
Posterior	18.984±2.163 (6)	19.977±3.796 (6)	17.134±2.131 (10)	21.904±2.756 (10)	8.115±1.506 (10)	9.169±1.728 (10)
Corteza Cerebral	12.508±2.510 (6)	11.124±2.551 (6)	10.801±1.300 (13)	9.972±1.522 (13)	2.952±557 (10)	3.762±620 (10)

a. DPM/mg de proteína (promedio ± error standard). Número de determinaciones entre paréntesis.

b. Estadísticamente significativo comparado con el control.

TABLA II. Incorporación de L(<sup>3</sup>H) leucina en Proteínas de Hipotálamo en Ratas Macho Prepúberes.

Tejido	10 Días		15 Días		20 Días	
	Control	Estradiol	Control	Estradiol	Control	Estradiol
Hipotálamo Anterior	11.017±2.824 (6)	11.169±2.872 <sup>a</sup> (6)	10.338±2.131 (6)	10.827±2.053 (6)	9.742±1.877 (7)	8.178±1.478 (7)
Medio	9.281±2.140 (6)	11.905±2.854 (6)	8.890±1.734 (6)	9.798±1.964 (6)	7.920±1.709 (8)	6.229±834 (8)
Posterior	12.229±1.763 (7)	11.230±2.140 (7)	11.462±2.332 (6)	12.208±1.638 (6)	11.347±2.650 (7)	10.050±2.202 (7)
Corteza Cerebral	4.947±677 (7)	6.288±819 (7)	4.300±1.022 (6)	4805±921 (6)	3.008±677 (6)	2.358±238 (6)

a. DPM/mg de proteína (promedio ± error estandard.  
Número de determinaciones entre paréntesis.

de especular que el efecto estimulante del estradiol sobre la síntesis de proteínas del área hipotalámica anterior, está vinculado con el efecto de retroalimentación positivo ejercido por la hormona ovárica sobre la secreción de dicha hormona.

2.A.1.b. Acción de los estrógenos "in vivo" sobre la secreción de LH en ratas prepúberes

Introducción

De acuerdo con los conceptos actuales sobre la diferenciación sexual del hipotálamo, la hembra tiene la capacidad de secretar GR en forma cíclica mientras que el macho lo hace de manera tónica o constante (45). Esta diferencia se debe a la presencia, en el hipotálamo de la hembra, de centros nerviosos responsables de la activación cíclica de la hipófisis (80). La respuesta de los núcleos hipotalámicos a los estrógenos es fundamental para el control cíclico de la secreción de GR, ya que esa hormona es la que induce la liberación cíclica de la LRH y por lo tanto de LH y FSH.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la administración de estradiol sobre la secreción de LH en ratas hembra prepúberes de distintas edades, con el fin de determinar en

qué momento de la vida de esos animales maduran dichos centros. Se estudió también qué ocurre con la administración hormonal de E<sub>2</sub> a ratas hembra androgenizadas al nacer, en las que la presencia de andrógenos en la etapa perinatal produce una alteración permanente de la secreción de GR (45), y en ratas macho prepúberes de distintas edades.

### Materiales y Método

Se utilizaron ratas hembra y machos prepúberes, cuyo mantenimiento ya se describió anteriormente, que fueron sacrificadas a los 10, 15, 22 y 25 días de edad. Un grupo de hembras se androgenizó en el segundo día de vida con 1 mg de propionato de testosterona y se sacrificó también a los 10, 15, 22 y 25 días de edad.

Todos los animales fueron inyectados con 10 µg de benzoato de estradiol disuelto en aceite 72 y 24 horas antes del sacrificio, por vía s.c. Las ratas utilizadas como control se inyectaron solamente con el vehículo.

Luego del sacrificio por decapitación, se recogió la sangre del tronco y una vez retraído el coágulo se separó el suero. La determinación de LH sérica se realizó mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) por doble anticuerpo, según el método de Nis

wender y colaboradores (81) que utiliza LH ovina tanto para inmunización (primer anticuerpo) como para radioiodinación. La metodología seguida para el ensayo es la sugerida por el National Institute of Health, con ligeras modificaciones realizadas en el laboratorio. Los reactivos fueron provistos por el National Institute of Arthrities, Metabolism and Digestive Diseases (NIAMDD) dependiente del NIH, USA.

Se marcó LH pura ovina con Iodo 125 utilizando Cloramina T como agente oxidante y metabisulfito de sodio como reductor (82). El primer anticuerpo proviene de conejos inyectados con la hormona específica pura. Para separar el complejo hormona-primer anticuerpo que es soluble, se utilizó como aglutinante o segundo anticuerpo suero de carnero antigammaglobulina de conejo.

Para cada determinación de RIA se realizó una curva de referencia, en que se desplazó el complejo hormona marcada-primer anticuerpo con diluciones conocidas de hormona sin marcar (standard).

La concentración de LH en cada muestra experimental se determinó por duplicado. Los resultados se expresaron en nanogramos por mililitro de suero (ng/ml) en términos del estándar LH-RP1 del NIAMDD. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de alrededor del 6 y 13 % respectivamente. La sensibilidad



mínima del método fue de 2 a 5 ng/ml de suero.

La comparación estadística se realizó mediante el test "t" de Student.

### Resultados y Conclusiones

Como puede observarse en la Tabla III, el efecto de la administración de estradiol sobre la secreción de LH en ratas hembra prepúberes fue diferente según la edad; mientras que en animales de 10 y 15 días provocó una inhibición de la secreción de LH, la estimuló a los 22 y 25 días de edad. En ratas macho y en hembras androgenizadas al nacer en las que se anuló el desarrollo del centro cíclico, se pudo observar solamente el efecto de retroalimentación negativo del estradiol en todas las edades estudiadas, es decir, una inhibición de los niveles de LH. Estos resultados indican que existe una diferencia sexual en lo que se refiere al efecto del estradiol sobre la secreción de LH, siendo esta hormona capaz de estimular la secreción de esa gonadotropina en la hembra pero no en el macho.

Ha sido establecido que durante el período de diferenciación sexual del hipotálamo de la rata hembra se desarrollan núcleos hipotalámicos que son los responsables de la secreción cíclica de

TABLA III. Efecto del Estradiol sobre la Secreción de LH.

Edad (días)	HEMBRAS		MACHOS		HEMBRAS ANDROGENIZADAS	
	Control	Estradiol	Control	Estradiol	Control	Estradiol
10	25±4.1 (10)	12±1.1 * (10)	30±2.1 (10)	15±1.0 * (10)	30±1.3 (15)	16±0.9 * (10)
15	91±7.3 (10)	13±0.9 * (9)	33±4.1 (10)	12±7.2 * (10)	28±1.4 (7)	12±0.7 * (7)
22	30±2.1 (8)	90±7.2 * (10)	20±1.4 (9)	10±0.9 * (9)	27±1.3 (8)	10±0.8 (12)
25	28±3.0 (10)	110±6.0 * (11)	25±1.2 (11)	9±0.7 * (12)	30±1.4 (15)	12±0.9 * (10)

Los resultados están expresados en ng de LH/ml de suero.

Promedio ± error estandar. Entre paréntesis está representado el número de determinaciones.

\* Estadísticamente significativo con respecto al control.

GR (45). Estos núcleos, de acuerdo a numerosas evidencias experimentales, están ubicados en el área PO y SQ del hipotálamo anterior. Como se vio anteriormente, es en este área en que se produce un estímulo de la síntesis proteica por administración de estradiol, a partir de aproximadamente los 15 días de edad del animal (ver 2.A.1.a.). Los resultados presentados muestran que el efecto estimulante de la hormona ovárica sobre la secreción de LH comienza a ser detectado alrededor de los 20 días de edad. Es evidente, de acuerdo a ambos experimentos, que el mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los estrógenos sobre la secreción de GR, implica la madurez de centros nerviosos ubicados en el hipotálamo de la rata hembra lo que ocurre alrededor de los 20 días de edad. Las ratas macho no presentaron modificaciones en la síntesis de proteínas del hipotálamo anterior por acción del estradiol, ni presentaron estimulación de la secreción de LH por administración de esa hormona. Esto confirma el concepto sobre insensibilidad del hipotálamo anterior a la acción de los estrógenos en estos animales.

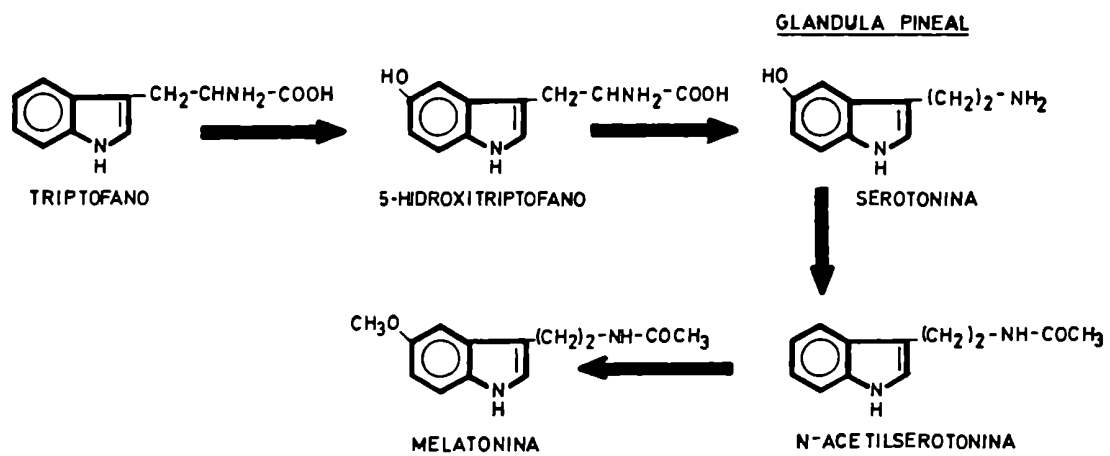
## 2.A.2. ACCION DE LA GLANDULA PINEAL

### Introducción

La melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina), es el prototipo de una familia de compuestos biológicamente activos, los metoxindoles, producidos por la glándula pineal de todos los vertebrados, incluyendo al hombre. Su descubrimiento y las investigaciones que generó, proveyeron los primeros elementos bioquímicos para el análisis experimental de la función pineal. En 1958, Lerner y colaboradores (83) purificaron dicho principio y lo identificaron químicamente: la melatonina resultó ser aproximadamente  $10^5$  veces más potente que la NA para producir aclaramiento de la piel de anfibios y su efecto se pudo demostrar en concentraciones de  $10^{-13}$  g/ml. Los efectos de la melatonina sobre la pigmentación dérmica de los mamíferos son mucho menos marcados y probablemente indirectos, a través de la modificación de la función hipofisaria. En ellos, la melatonina ejerce efectos significativos a nivel de centros integrativos neuroendócrinos (84).

La síntesis de la melatonina se inicia a partir de la captación del aminoácido triptofano de la circulación general (Figura 8); una vez en la pineal, parte del mismo se utiliza para la síntesis de proteínas, mientras que una fracción mayor es convertida a serotonina y sus derivados. El paso inicial lo constituye la oxidación del triptofano a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por acción de la enzima triptofano hidroxilasa, y éste es luego decarboxila-

FIGURA 8. Síntesis de Melatonina.



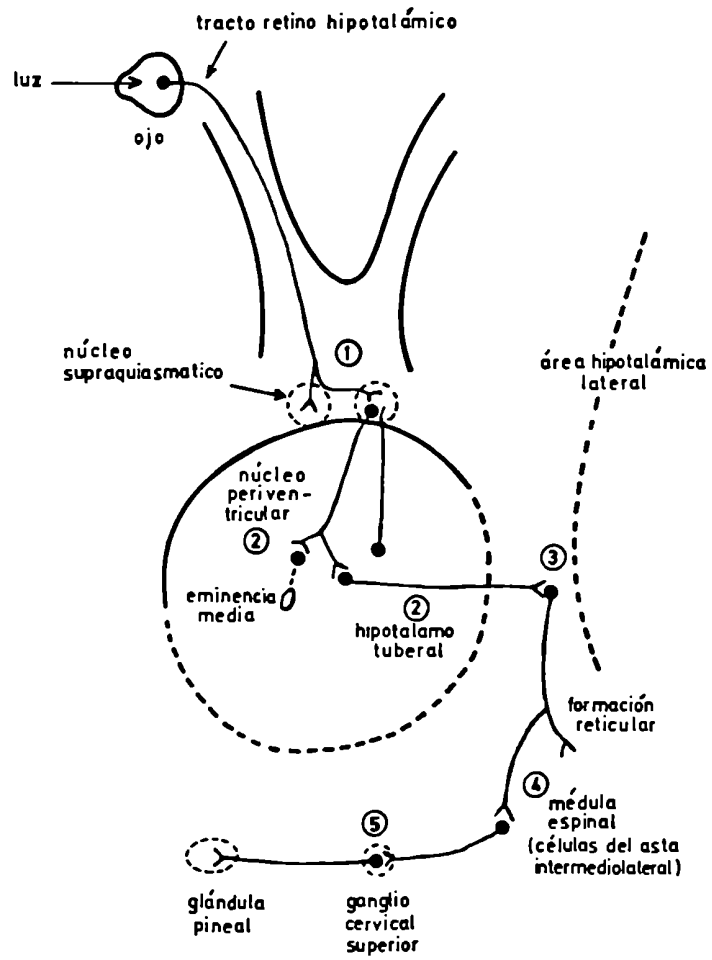
do a serotonina por una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. Las concentraciones de serotonina resultantes son las más altas del organismo y muestran un marcado ritmo diario con niveles máximos durante el período de luz, decayendo abruptamente al exponer al animal a la oscuridad (85). La síntesis pineal de melatonina es máxima durante la oscuridad y se origina a partir de la serotonina por una doble acción enzimática. Esta conversión involucra la N-acetilación de la serotonina a N-acetilserotonina, catalizada por la N-acetiltransferasa (NAT), y la ortometilación de ésta a melatonina por acción de la hidroxiorotometiltransferasa (HIOMT). La NAT se encuentra en varios tejidos, mientras que la HIOMT se detecta sólo en la glándula pineal, retina y glándula harderiana (86). La posibilidad de síntesis extrapineal de melatonina, sugerida por estos estudios, fue confirmada años después por la descripción de niveles residuales de melatonina plasmática luego de la pinealectomía (Px) (87) y por la identificación inmunohistoquímica de melatonina en dichos tejidos (88).

Datos experimentales acumulados en los últimos 30 años indican que la actividad bioquímica de la glándula pineal, depende fundamentalmente del ambiente luminoso en el que es mantenido el animal. La exposición de ratas a iluminación constante disminuye el peso de la glándula y oblitera el ritmo diario normal de la acti-

vidad de la HIOMT y la NAT y de los niveles pineales y plasmáticos de melatonina (89). En los mamíferos los efectos no se ejercen en forma directa, como ocurre en vertebrados inferiores, sino a través de una vía neuronal multisináptica originada en la retina (Figura 9). Esta conexión utiliza como vía final común, las fibras postganglionares simpáticas del ganglio cervical superior, que constituyen la única vinculación neural entre el SNC y la glándula pineal. La interrupción de esta vía por gangliectomía bilateral, resulta en una alteración severa de la función pineal comparable, desde el punto de vista neuroendócrino, con la pinealectomía (Px).

La NA liberada por los terminales simpáticos pineales por el estímulo sensorial (oscuridad), interacciona con un receptor  $\beta$  - adrenérgico en los pinealocitos e induce la síntesis de AMP cíclico y Pgs (90). A través de fenómenos ligados a la fosforilación de proteínas y activación del genoma, se induce la síntesis de enzimas específicas (NAT y HIOMT) (85). Estos cambios metabólicos explican la elevación abrupta de melatonina en plasma y LCR por exposición del animal a la oscuridad (91). De esta manera, la glándula pineal provee al SNC de una señal circulante potencialmente utilizable para la sincronización de distintos ritmos biológicos (circadianos, circanuales, etc.) (92).

FIGURA 9. Vía neural que conecta la retina con la glándula pineal.





Si bien la luz ambiental es el regulador principal de la función pineal, el sistema no carece de retroalimentación por los distintos órganos efectores cuya función afecta. La evidencia experimental indica que la glándula pineal posee diversos receptores hormonales (a estrógenos, andrógenos, progestágenos, prolactina, etc.), algunos de ellos controlados por el neurotransmisor NA (84, 93). A través de estos mecanismos o por efectos de membrana en las terminales sinápticas o en los cuerpos ganglionares, varias hormonas controlan la secreción de melatonina, configurando de esta manera un mecanismo de retroalimentación pineal-hipofisario-gonadal. Un ejemplo lo dan los cambios en la síntesis de melatonina y péptidos pineales durante el ciclo estral de la rata, superpuestos a los cambios pineales diurnos luz-oscuridad, y resultantes de la acción secuencial de esteroides y GR sobre dicha estructura (94).

En los últimos años se ha obtenido evidencia experimental en el ser humano y en animales de laboratorio, acerca de la existencia de otros compuestos pineales con actividad hormonal, de tipo indólico, como el 5-metoxitriptofol (análogo de la melatonina) o de naturaleza peptídica, como la arginina-vasotocina (95).

La pinealectomía altera el estado reproductivo de la mayoría de las especies estudiadas. Si se somete a hamsters a deprivación

de luz por lesión ocular o exposición a fotoperíodos menores de 12 horas diarias de luz, las gónadas regresionan en 8 ó 10 semanas. En animales Px ésta regresión no se produce, lo cual indica que el efecto del fotoperíodo sobre el eje neuroendócrino-gonadal es mediado por la glándula pineal. Observaciones similares se han efectuado en otras especies animales. Estos resultados indican que la pineal produce una sustancia antigonadal en respuesta a condiciones ambientales que inhiben la actividad gonadal (fotoperíodos cortos) y han permitido la elaboración de una hipótesis coherente sobre la participación glandular en la regulación neuroendócrina. De acuerdo a ésta, la pineal es un transductor que convierte en señal endócrina la información fótica que le llega por vía neuronal desde la retina. Dicha información, consistente primariamente en la lectura del fotoperíodo, regula el ingreso o la salida de la estación de apareamiento y por lo tanto juega un papel fundamental en la sincronización de la reproducción con las condiciones más favorables para la sobrevivencia de la cría (96). La Px no elimina la activación anual de las gónadas sino que la retrasa o acelera. Esta es la razón por la que en animales sometidos a condiciones ambientales constantes de luz y temperatura, como la rata de laboratorio, los efectos de la Px están muy atenuados y se requiere la exposición a fotoperíodos normales para esta especie (2 ó 3

horas de luz de escasa intensidad por día) para que se exterioricen.

Varios estudios sugieren que la glándula pineal puede jugar un papel importante en la regulación de la aparición de la pubertad en la rata hembra. La Px adelanta la apertura vaginal (97) y la inducción de la ovulación por administración de PMS (98). Sin embargo, el sitio de acción (central o periférico) de las secreciones de origen pineal responsables de esos efectos permanece sin dilucidar.

La administración de melatonina revierte la mayoría de las secuelas endócrinas de la Px (99). En ratas hembra, la misma retarda la apertura vaginal (100), disminuye la proporción de extendidos vaginales característicos del estro (101) e inhibe, cuando se la inyecta en proestro, la descarga de LH y la ovulación en ratas adultas (102) y la ovulación inducida por PMS en ratas prepúberes (96). En ratas macho disminuye el peso de los testículos y órganos accesorios (103). Los efectos antigonadales de la melatonina se ejercen primariamente a nivel del SNC. La perfusión del tercer ventrículo con melatonina, disminuye los niveles plasmáticos de LH y FSH y aumenta los de PRL (104), mientras que la perfusión de hipófisis "in situ" carece de efectos (105) siempre y cuando no se trate de ratas hembra neonatas en las que sí se descu-

brió un sitio hipofisario de acción (106).

Una característica peculiar de la glándula pineal es su sensibilidad a la administración exógena de melatonina. La inyección de ésta afecta la concentración de lípidos pineales (107), modifica los niveles de serotonina pineal (108) y produce cambios ultraestructurales compatibles con una estimulación glandular en varias especies. En la rata, la inyección de melatonina aumenta la actividad de las dos enzimas participantes en su síntesis a partir de la serotonina e incrementa la concentración glandular de tubulina, lo que se correlaciona con el aumento del número de microtúbulos observado microscópicamente (109). Estos resultados sugieren que luego de la inyección de melatonina, se estimula el proceso secretorio pineal. La demostración directa de esta hipótesis fue dada por la verificación de que la inyección de melatonina induce la liberación de arginina-vasotocina en el LCR (95). A partir de estos hallazgos queda planteada la posibilidad de que parte de los cambios originalmente imputados a la melatonina sean causados por la liberación de una segunda hormona pineal, por ejemplo, arginina-vasotocina.

Teniendo en cuenta que la madurez del mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides ováricos sobre la secreción de GR es uno de los eventos principales involucrados en

el inicio de la pubertad en la hembra (54), el trabajo descrito a continuación tuvo por objeto determinar el efecto de la Px y el tratamiento con melatonina, sobre la ontogenia de la respuesta estimulante de la secreción de LH a la administración de estradiol y progesterona. La Px fue realizada en el día 10 de vida que es el momento aproximado en que la pineal de la rata comienza a sintetizar melatonina de manera típicamente rítmica (110).

### Materiales y Método

Se utilizaron ratas hembra prepúberes de la cepa del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, que crecieron en las condiciones descritas anteriormente.

La Px y las operaciones simuladas (sham Px) se realizaron bajo anestesia con éter en el día 10 de vida, según el método descrito por otros autores (111). Los animales recuperaron su actividad a los 20 minutos de la operación.

Los grupos de animales Px, sham Px y control fueron sacrificados a las 5 de la tarde. En ese momento tenían 16, 18, 20 y 22 días de vida. Tres días antes recibieron 10  $\mu$ g de benzoato de estradiol o vehículo por vía s.c., mientras que se administró progesterona en dosis de 1 mg/rata o el vehículo en ratas previamen-

te tratadas con estradiol, 5 horas antes del sacrificio.

El mismo se realizó por decapitación y se recogió la sangre del tronco. Una vez separado el suero, se determinaron los niveles de LH por RIA según el método antes descrito (Capítulo 2.A. 1.b.).

En otro experimento se estudió el efecto de la administración de melatonina sobre el desarrollo del mecanismo liberador de LH por estradiol y progesterona. Se utilizaron ratas intactas y no Px dado que existen datos previos que indican que es necesaria una glándula pineal intacta en el hamster para obtener respuestas neuroendócrinas a inyecciones diarias de melatonina realizadas en horas de la tarde, posiblemente debido a cambios diarios en la sensibilidad del receptor inducidos por la secreción de melatonina endógena (112).

Se administró una dosis diaria de 10 µg/rata de melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a las 10 horas de la fase de luz del fotoperíodo diario (momento de máxima sensibilidad a la hormona en animales adultos (112,113), durante 10 días consecutivos. Los animales control fueron inyectados únicamente con el vehículo (etanol: salina, 5:45).

Completados los tratamientos, los animales se sacrificaron por decapitación y se determinaron los niveles de LH en suero por

RIA en cada muestra. Tres días antes del sacrificio se administró 10 µg/rata de benzoato de estradiol y 5 horas antes 1 mg de progesterona. En ese momento los animales tenían 16, 18, 20, 22 y 24 días de edad.

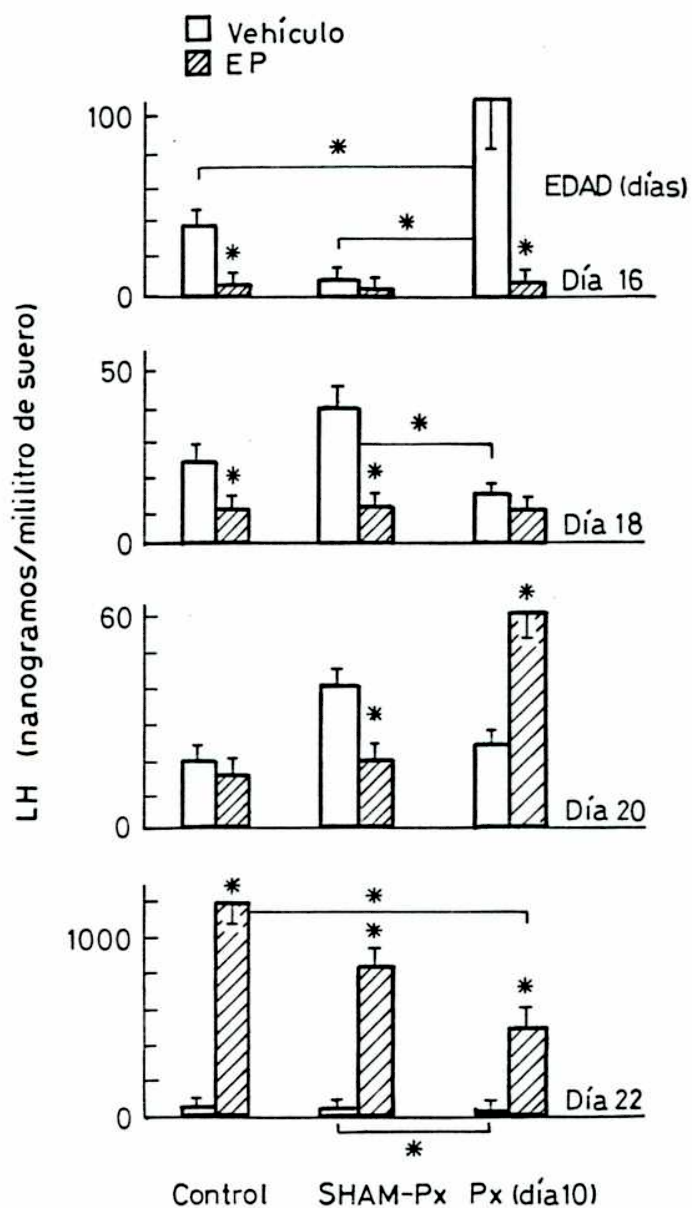
El análisis estadístico se realizó en ambos experimentos utilizando ANOVA de doble entrada luego de la transformación logarítmica de los datos, seguido por el test de Tuckey (114,115).

### Resultados

El efecto de la Px u operaciones simuladas sobre el desarrollo del mecanismo de retroalimentación positivo esteroideo en ratas hembra prepúberes, se puede observar en la Figura 10. La administración de E<sub>2</sub>-P disminuyó los niveles de LH en ratas intactas menores de 20 días de edad. A esa edad, la inyección de esteroides no suprimió los niveles de LH y se puede observar una liberación significativa de LH por E<sub>2</sub>-P a los 22 días de vida. Un perfil semejante de liberación de LH se puede ver en ratas con operación simulada, excepto que a los 20 días también aparece el efecto de retroalimentación negativo esteroideo.

La remoción pineal alteró significativamente la antogenia del mecanismo positivo esteroideo sobre la secreción de LH (Figura 10).

FIGURA 10. Efecto de la pinealectomía (Px) o de la pinealectomía -sham sobre la liberación de LH inducida por estrógenos-progesterona.



Cada barra representa el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 9-11 animales por grupo. \* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las líneas horizontales con asteriscos indican diferencias significativas entre grupos.



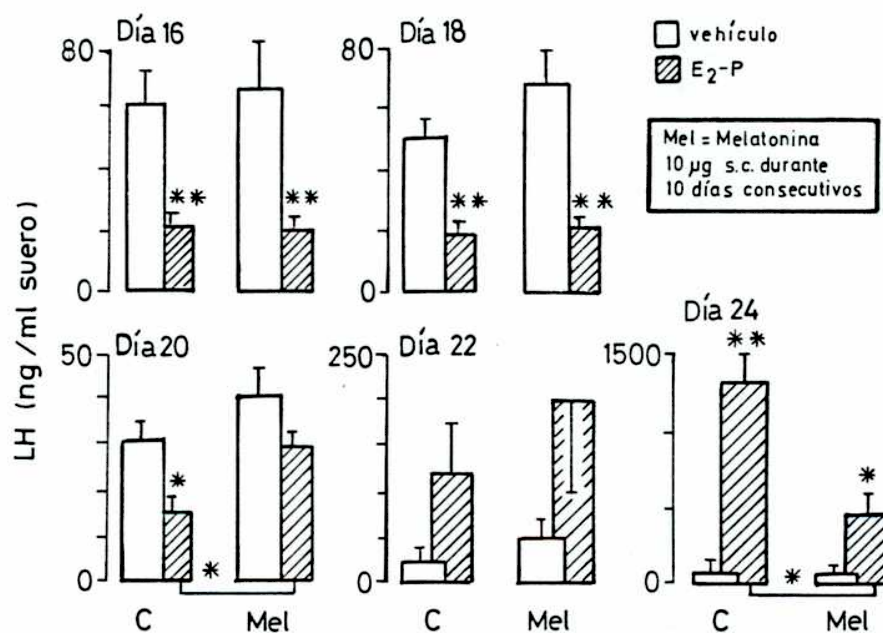
Las ratas Px exhiben una reducción en los niveles de LH por administración de E<sub>2</sub>-P solamente a los 16 días de edad. A los 18 días ya no se observa el efecto negativo que sí se observa en animales control, mientras que a los 20 días ya se detecta el efecto estimulante de los esteroides sobre la secreción de LH, dos días antes que en ratas control y con operación simulada. Se pueden ver otras diferencias entre animales Px y sham Px, como por ejemplo, luego de la remoción pineal se encuentran valores basales de LH incrementados a los 16 días de edad y disminuídos a los 18 y 22 días de vida.

Los resultados de la administración de melatonina en ratas hembra prepúberes se observan en la Figura 11. A los 20 días de edad, momento alrededor del cual aparece la liberación de LH inducida por E<sub>2</sub>-P en animales Px, el tratamiento con melatonina anuló la respuesta negativa ejercida por la administración de esteroides sobre la liberación de LH, mientras que a los 24 días de edad, la liberación de LH inducida por E<sub>2</sub>-P fue significativamente menor en animales inyectados con melatonina que en los control.

### Conclusiones

La pinealectomía adelanta la madurez del mecanismo central

FIGURA 11. Efecto de una dosis diaria de 10  $\mu\text{g}$  de melatonina (a las 6 de la tarde) sobre el desarrollo de la liberación de LH inducida por  $\text{E}_2\text{-P}$  en ratas hembra prepúberes intactas.



Los controles (C) recibieron solamente el vehículo. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  error estándar de grupos de 9-11 animales. Los asteriscos señalan diferencias significativas (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , según el test de Tuckey). Donde no hay líneas horizontales, los asteriscos se refieren a significación respecto al valor control respectivo.

que controla la liberación preovulatoria de LH en la rata. La supresión de la melatonina producida por la glándula pineal podría estar involucrada de alguna manera en el adelanto puberal inducido por la Px. Existen datos que demuestran que la melatonina es incapaz de afectar la respuesta liberadora de LH a la administración de LRH en ratas hembra adultas, pero la deprime en cultivos de hipófisis provenientes de ratas prepúberes menores de 20 días de edad (116). La pérdida de la inhibición en ese momento del desarrollo podría ser importante en la regulación de la maduración del sistema reproductivo. Sin embargo, no puede excluirse, a partir de nuestros experimentos, la posibilidad de que la glándula pineal retrase la aparición de la pubertad liberando otros compuestos, como por ejemplo, péptidos antigonadales (117).

### 2.A.3. ACCION DEL SISTEMA SEROTONINERGICO

#### Introducción

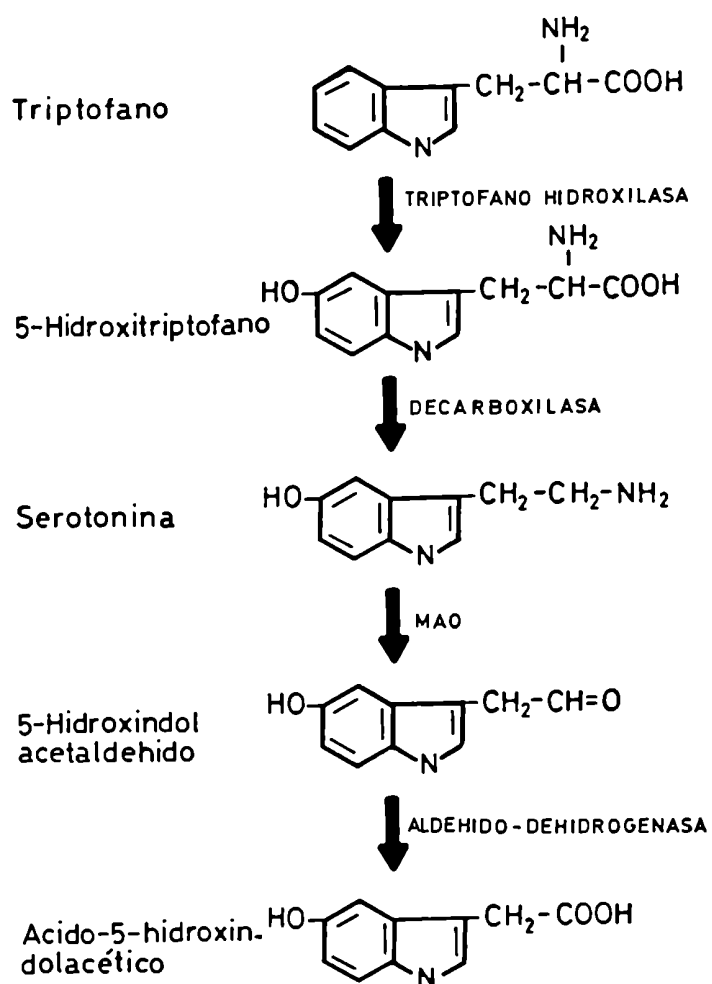
La serotonina (5-HT) es un indol formado a partir del aminoácido L-triptofano. Los niveles sanguíneos del mismo influyen en el grado de síntesis de la 5-HT. La hidroxilación del triptofano es catalizada por la enzima triptofano hidroxilasa y el 5-hidrox*i*

triptofano formado es rápidamente descarboxilado para formar serotonina (Figura 12). El mecanismo principal de inactivación de la 5-HT luego de su liberación en el espacio sináptico, es la recaptación seguida por el catabolismo por medio de la enzima monoaminoxidasa (MAO). El principal metabolito formado es el ácido 5-hidroxitriptofano. En la glándula pineal la 5-HT es convertida a melatonina, como se vio en el Capítulo anterior.

Aparentemente el índice de síntesis, liberación, recaptación y metabolismo, así como también la sensibilidad de los receptores postsinápticos, parecen jugar un rol regulatorio de importancia en la modulación de los efectos de la 5-HT.

Los cuerpos celulares de las neuronas que contienen 5-HT están localizados en el núcleo Rafe del tallo cerebral. Sus axones están densamente distribuidos por la espina cordal, diencéfalo, sistema límbico y otras regiones del cerebro anterior. Los núcleos dorsal y central superior del Rafe son la fuente de la mayoría de las fibras serotoninérgicas que inervan al hipotálamo (118). La 5-HT se encuentra densamente distribuida en esa estructura, con altas concentraciones en los núcleos arcuato, supraquiasmático y premamilar (119). También se la encuentra en la EM. Las células serotoninérgicas provenientes del núcleo dorsal del Rafe proyectan hacia el área POM, núcleo SQ, área hipotalámica anterior y nú

FIGURA 12. Vías de síntesis y degradación de la Serotonina.



cleo arcuato; en cambio, las provenientes del núcleo medial del Rafe inervan al núcleo ventromedial, arcuato y la EM además del núcleo POM y la región septal.

La mayoría de las fibras serotoninérgicas hipotalámicas provienen de neuronas cuyos cuerpos celulares se encuentran fuera del hipotálamo, dado que el aislamiento quirúrgico total del mismo provoca una caída del 70 % del contenido de 5-HT (120). Sin embargo, el 50 % del contenido en triptofano hidroxilasa permanece dentro de la isla (121). Esto sugiere la presencia de algún elemento celular dentro del hipotálamo medio basal capaz de sintetizar 5-HT.

Se ha demostrado la presencia de un grupo de cuerpos celulares dentro del núcleo dorsomedial del hipotálamo que concentra específicamente 5-HT, lo que es coherente con la existencia probable de neuronas serotoninérgicas intrahipotalámicas (122).

Han sido realizadas varias experiencias para entender cuál es la participación de las neuronas 5-HT en el control de la secreción de GR. La mayoría de las evidencias sugieren que pueden operar componentes tanto inhibitorios como estimulantes en la modulación serotoninérgica de la liberación de LH. Se ha observado que mientras que la administración sistémica de 5-HT resultó inefectiva para modificar los niveles de LH en ratas macho normales y cas

trados de larga data, redujo significativamente los niveles de esa hormona en animales castrados 2 días antes (123).

En ratas hembra adultas castradas, la administración intraventricular de 5-HT inhibió la secreción de LH (124). El estímulo eléctrico del núcleo dorsal del Rafe, también inhibió la secreción episódica de LH (125). El estímulo del núcleo arcuato inhibió dicha liberación episódica, pero si se trataba previamente a los animales con PCPA, inhibidor de la síntesis de 5-HT, la estimulación de ese núcleo provocó aumento en los niveles de LH (126) que pudo revertirse parcialmente mediante la administración de 5-HTP, precursor de la síntesis de 5-HT. Una reversión semejante del efecto del estímulo del núcleo arcuato se observó luego del tratamiento con estrógenos (127).

Las neuronas 5-HT provenientes del núcleo dorsal del Rafe, parecen estar involucradas en el estímulo diario de la liberación de LH provocado por el implante de estradiol dentro de una cápsula de Silastic en hembras castradas (128).

El bloqueo de la síntesis de 5-HT mediante la administración de PCPA, previno la ovulación (129) y el pico de LH característico del proestro (128). El bloqueo de receptores serotoninérgicos también previno la liberación diaria de LH por administración de estradiol dentro de una cápsula de Silastic (128). La administra

ción sistémica de grandes concentraciones de 5-HT bloqueó la ovulación inducida por administración de PMS en ratas prepúberes (130). La elevación farmacológica de los niveles endógenos de 5-HT también inhibió la superovulación en estos animales (131) y su primió la liberación de LH por LRH en cultivos de hipófisis in vi tro (106). Una acción similar se obtuvo mediante el uso de melatonina pero sólo si las hipófisis provenían de ratas neonatas (106). Esto hace pensar que la inhibición observada podría deberse, al menos en parte, a una acción directa de la 5-HT sobre la respuesta liberadora de la hipófisis a LRH.

Existen altas concentraciones de LRH en terminales nerviosas ubicadas en la EM, donde tiene lugar el almacenamiento y la liberación, siendo esa estructura la terminal del sistema neuronal cu yos cuerpos celulares residen en el área PO, SQ y otras áreas ros trales del hipotálamo. La presencia de fibras serotoninérgicas en la EM (121), favorece la hipótesis sobre una interacción entre a xones de ambas células a ese nivel. Existen evidencias sobre can bios en la concentración de 5-HT en la EM durante el ciclo estral de la rata, observándose una reducción del 50 % en la tarde del proestro, lo que está relacionado posiblemente con la liberación fásica de LH (132).

Otra forma de participación de las neuronas 5-HT es liberan-



do su contenido dentro de los capilares fenestrados de la EM y así la 5-HT actuaría directamente sobre los gonadotropos afectando a ese nivel la secreción de LH (133). Al respecto, se observó una captación de 5-HT marcada dentro de células productoras de LH y también la presencia de fibras serotoninérgicas en regiones específicas del lóbulo anterior de la hipófisis (134,135).

El mayor número de terminales serotoninérgicas hipotalámicas, se halla en el núcleo SQ (119), área que se sabe que está involucrada en el control de la ovulación y en la regulación de ritmos circadianos de gran número de hormonas de la hipófisis anterior. Hay quienes consideran que la acción inhibitoria de la 5-HT podría estar mediada por estas neuronas en ausencia de esteroides (125). La destrucción del núcleo SQ anula las variaciones diarias de LH al igual que el tratamiento con antagonistas serotoninérgicos (128).

Podría existir un sistema 5-HT adicional intrahipotalámico, ya que la destrucción de las neuronas serotoninérgicas mediante la neurotoxina 5,6-dihidroxitriptamina elevó los niveles de LH en ratas con aislamiento quirúrgico del hipotálamo (136), quedando cantidades considerables de 5-HT y triptofano-hidroxilasa dentro de la isla hipotalámica.

Como ya se vio anteriormente, la participación de la 5-HT en

la liberación preovulatoria de LH es confusa. Existe un ritmo metabólico central circadiano del indol, aparentemente relacionado con la ritmicidad del núcleo SQ (137,138). En la tarde del proestro, a medida que la secreción de LH sube, los niveles hipotalámicos de 5-HT bajan (137). La manipulación de los niveles de 5-HT cerebrales mediante procedimientos farmacológicos, ya sea aumentando o disminuyendo los niveles de manera defasada con el ritmo diario, con lo que se lo bloquea (138,139), inhibió la ovulación (136, 129) y el pico de LH inducido por estrógenos en ratas castradas (128,139). También, el estímulo del núcleo dorsal del Rafe inhibió la ovulación (140), la liberación de LH por administración de esteroides (141) y el aumento diario de LH inducido por administración de estradiol dentro de una cápsula de Silastic (128). Por otro lado, la disminución drástica de los niveles hipotalámicos de 5-HT de manera crónica, atenuó el pico de LH inducido por estrógenos (142), lo que pudo ser revertido mediante la administración de progesterona (143).

En general, aunque existen evidencias que sostienen la existencia de un papel facilitador de la 5-HT sobre la liberación preovulatoria de LH, la naturaleza de su participación permanece confusa, especialmente por el hecho de que los agentes farmacológicos que modifican los niveles de 5-HT también pueden afectar los

de catecolaminas (144).

En resumen, se puede decir que la acción de la 5-HT sobre la secreción de LH es contradictoria. Por un lado se demostró una influencia inhibitoria, por ejemplo sobre la secreción pulsátil en ratas hembra castradas y sobre los niveles postcastración en ratas macho con dos días de operación. Por otro lado, se conoce un efecto permisivo de la 5-HT sobre la liberación de LH en respuesta a los esteroides sexuales. Pudiera ser que el entorno esteroideo y el tiempo de administración de las drogas que interfieren con la 5-HT, sean factores importantes a considerar en los resultados obtenidos, y que tanto componentes inhibitorios como estimulantes operen simultáneamente en la acción moduladora de las neuronas serotoninérgicas sobre la secreción de LH. Kordon y colaboradores propusieron que los efectos inhibitorios podrían ser el resultado de una acción de la 5-HT sobre neuronas LRH ubicadas dentro del HMB, mientras que el indol podría actuar sobre áreas más rostrales para ejercer su papel facilitador sobre la secreción de LH y la ovulación (131).

Teniendo en cuenta que en la rata hembra existen diferentes estructuras nerviosas localizadas en el hipotálamo anterior, que están involucradas en el efecto de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides ováricos sobre la secreción de LH y que

maduran alrededor de los 22 días de edad (16), decidimos estudiar el efecto ejercido por el sistema serotoninérgico sobre la secreción de LH inducida por dichos esteroides durante la etapa prepuberal de estos animales y también su participación en la secreción de LH en ratas macho prepúberes.

Este trabajo muestra el efecto de la estimulación de la vía serotoninérgica mediante la administración de 5-HTP, precursor inmediato en la síntesis de 5-HT, y su inhibición mediante el uso de una neurotoxina serotoninérgica como la para-cloroanfetamina (PCA), sobre la liberación de LH inducida por administración de E<sub>2</sub>-P en ratas hembra de distintas edades dentro de la etapa prepuberal y el efecto de la administración de 5-HTP en machos prepúberes de distintas edades.

### Materiales y Método

Se utilizaron ratas hembra y macho prepúberes de la Cepa del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, que crecieron en las condiciones ya descriptas.

Se administró benzoato de estradiol por vía s.c. en ratas hembra, 76 horas antes del sacrificio, en dosis de 10 µg/rata y la progesterona, por la misma vía, 5 horas previo al sacrificio en

dosis de 1 mg/rata.

El 5-HTP (Calbiochem Chemical, La Jolla, California), se administró en dosis de 75 mg/kg de peso corporal, por vía i.p., disuelto en solución salina, una hora antes del sacrificio.

Se utilizó para-cloroanfetamina (PCA) (Regis Chemical, Morton Grove, Illinois), neurotoxina selectiva para neuronas 5-HT capaz de reducir los niveles de 5-HT cerebrales 2 ó 3 días después de su administración (145). Se inyectó en dosis de 5 mg/kg de peso corporal, disuelta en solución salina, por vía i.p., al mediodía durante 3 días consecutivos, comenzando 76 horas previo al sacrificio.

Se vio previamente que las dosis de 5-HTP y PCA utilizadas fueron selectivas para inducir cambios en la secreción de LH, en ratas adultas (146).

Los animales control fueron inyectados con el vehículo.

Una vez completados los tratamientos, se sacrificó a los animales por decapitación a los 16, 18, 20, 26, 30 y 35 días de edad. Se recogió la sangre del tronco y se determinaron los niveles de LH por RIA en suero, como ya se describió previamente. Los valores se expresaron en ng/ml de suero y se compararon estadísticamente utilizando ANOVA y el test de Tuckey (114,115), o el test "t" de Student.

Se determinó el contenido de serotonina en hipotálamo e hipófisis anterior de ratas hembra prepúberes de acuerdo al método descrito por Reinhard y Roth (147), que utiliza cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detector electroquímico. Se extrajo el tejido inmediatamente luego del sacrificio y se lo congeló en hielo seco, como se describió en otros trabajos (148). El contenido de 5-HT se expresó en picomoles (pM)/mg de tejido.

## Resultados

### Efecto de la administración de E<sub>2</sub>-P y 5-HTP sobre los niveles de LH en ratas prepúberes

La administración de E<sub>2</sub>-P provocó una reducción significativa en los niveles de LH en ratas hembra de 16, 18 y 20 días de edad; en cambio, los elevó a los 26, 30 y 35 días de vida (Tabla IV). El tratamiento con 5-HTP incrementó los niveles de LH en hembras de 16, 18 y 20 días, pero no a los 26, 30 y 35 días de edad (Tabla IV). La liberación de LH por 5-HTP disminuyó significativamente desde los 16 a los 20 días. La liberación de LH inducida por E<sub>2</sub>-P fue significativamente reducida por la administración de 5-HTP a los 26 días y bloqueada totalmente a los 30 y 35 días de edad.

TABLA IV. Efecto de 5-HTP y E<sub>2</sub>-P sobre la Secreción de LH en Ratas Hembra Prepúberes.  
(Media ± error estandard. Número de determinaciones entre paréntesis).

Edad (días)	LH (ng/ml suero)				Valor de P
	(A) CONTROL	(B) 5-HTP	(C) E <sub>2</sub> -P	(D) 5-HTP + E <sub>2</sub> -P	
16	44,6±16,7 (11)	906±78,1 (10)	8,64±0.5 (12)		A vs B A vs C B vs C
18	21,7±3,2 (8)	415,3±158,2 (8)	12,5±1,9 (7)		A vs B B vs C A vs C
20	21,9±2,3 (9)	67±12,3 (8)	11,3±1,4 (10)		A vs B A vs C B vs C
26	18,1±4,9 (9)	18,1±4,49 (8)	1381±126,7 (10)	612±70,8 (10)	A vs C A vs D B vs C B vs D C vs D
30	29,8±5,1 (9)	19,8±1,8 (9)	1625±340 (10)	42±8,6 (9)	A vs C C vs D B vs C
35	20±4,2 (9)	18,3±3 (9)	1105±376 (9)	31±6,3 (9)	A vs C C vs D

No se observan modificaciones en la secreción de LH por administración de 5-HTP en ratas macho sea cual fuere la edad utilizada dentro de la etapa prepuberal (Tabla V).

Efecto de la administración de PCA sobre la liberación de LH por E<sub>2</sub>-P en ratas hembra prepúberes

La Tabla VI, muestra que el pretratamiento con PCA modificó la inhibición de la secreción de LH inducida por administración de E<sub>2</sub>-P en ratas hembra de 18 días de edad, dado que dicho tratamiento no produjo cambios en la concentración de LH en ratas tratadas con la neurotoxina. Por otro lado, mientras que en ratas de 20 días, la administración de E<sub>2</sub>-P provocó la disminución de los niveles de LH, dicho tratamiento indujo una liberación significativa de LH en ratas pretratadas con PCA. El tratamiento con PCA potenció la liberación de LH por acción de los esteroides sexuales a los 26 días de edad (Tabla VI).

Contenido hipotalámico e hipofisario de 5-HT en ratas hembra prepúberes

Los resultados muestran claramente que hay un cambio signifi



TABLA V. Efecto de 5-HTP sobre la Secreción de LH en Ratas Macho Prepúberes.

Edad (días)	LH (ng/ml suero)		Valor de p
	Control	5-HTP	
16	27,5 ± 3,5 (10)	20,2 ± 3,6 (10)	N.S.
18	20,2 ± 2,0 (9)	21,1 ± 1,4 (10)	N.S.
20	18,5 ± 1,7 (10)	16,1 ± 1,2 (10)	N.S.
26	16,4 ± 1,8 (8)	17,5 ± 2,5 (10)	N.S.

Media ± error estandard. Número de determinaciones entre paréntesis. N.S.: No significativo.

Tabla VI. Efecto de PCA sobre la Secreción de LH Inducida por E<sub>2</sub>-P en Ratas Hembra Prepúberes.

Edad (días)	LH (ng/ml suero)				PCA + E <sub>2</sub> -P (D)	Valor de p <0.01 <0.05
	CONTROL (A)	E <sub>2</sub> -P (B)	PCA (C)	PCA		
18	18,5 ± 2,2 (8)	12,9 ± 1,3 (8)	19,0 ± 2,8 (7)	21,0 ± 1,4 (7)		A vs B B vs C B vs D
20	15,1 ± 1,4 (7)	9,3 ± 1,3 (8)	16,3 ± 2,4 (7)	439 ± 22,3 (9)		A vs B A vs D B vs C B vs D C vs D
26	18,2 ± 4,9 (7)	1381 ± 126,7 (10)	16,3 ± 2,4 (8)	2220 ± 280 (10)		A vs B A vs D B vs C B vs D C vs D

Media ± error estandard.

Número de determinaciones entre paréntesis.

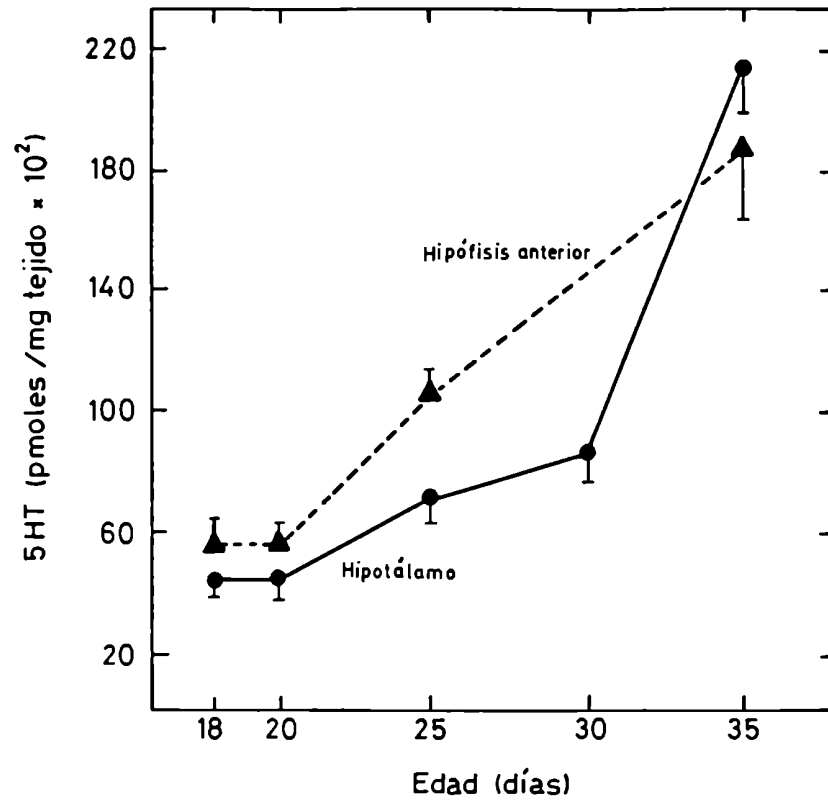
cativo en la concentración de 5-HT tanto en hipotálamo como en hipófisis entre los 20 y 25 días de edad (Figura 13). Mientras que dicho contenido es semejante a los 18 y 20 días, se puede ver un incremento progresivo a los 25, 30 y 35 días de edad.

### Discusión

Trabajos previos demostraron la incapacidad de las hormonas ováricas para inducir liberación de LH antes de los 22 días de edad, indicando que a esta edad alcanzan madurez las estructuras nerviosas involucradas en ese mecanismo positivo (16,149). Estos resultados coinciden con aquellos, dado que la administración de E<sub>2</sub>-P disminuyó los niveles de LH en ratas de 16, 18 y 20 días de edad y los elevó significativamente a partir de los 26 días.

La administración de PCA alteró significativamente la ontogenia del mecanismo de retroalimentación positivo esteroideo, ya que a los 18 días de edad, no se observa una disminución en los niveles de LH por administración de E<sub>2</sub>-P en animales pretratados con PCA, y la aparición del efecto positivo esteroideo se puede observar ya a los 20 días de vida, 2 días más temprano que en animales control, quienes a esa edad todavía exhiben el efecto negativo ejercido por E<sub>2</sub>-P sobre la secreción de LH. Estos resultados, y

FIGURA 13. Contenido hipotalámico e hipofisario de serotonina (5-HT) en ratas hembra prepúberes de diferentes edades.



Cada punto representa la media de 7-10 animales  $\pm$  error estándar. Las diferencias entre los valores a los 18 y 20 días vs 25, 30 y 35 días, son significativas ( $p < 0.01$ ).

los obtenidos en ratas de 26 días, en los que se ve que la administración de 5-HTP reduce la liberación de LH por E<sub>2</sub>-P, mientras que el pretratamiento con PCA la potencia, nos permiten concluir que la 5-HT ejerce un efecto inhibitorio sobre el desarrollo del mecanismo de retroalimentación positivo, así como sobre ese mecanismo una vez maduro. Al respecto, se vio previamente que la Px, que suprime la fuente principal de melatonina, derivada de la 5-HT, adelanta el inicio puberal (100) y la madurez de los mecanismos involucrados en el efecto positivo esteroideo sobre la liberación de LH. La administración de melatonina inhibe dicho mecanismo (ver 2.A.2.).

Es interesante notar que aunque la PCA potencia la liberación de LH por administración de E<sub>2</sub>-P a los 20 días de edad, a los 18 días no se observan diferencias significativas entre las ratas control y las tratadas con PCA y E<sub>2</sub>-P. Al respecto, se sabe que los esteroides ováricos ejercen, en la rata hembra, un efecto negativo sobre la secreción de GR hasta aproximadamente los 20 días de edad (54). A los 22 días, los esteroides ováricos ya inducen una influencia estimulante sobre la secreción de LH que aumenta progresivamente hasta los 26-28 días. Antes del inicio del mecanismo de retroalimentación positivo, existe un período de transición, entre los 20 y 22 días de edad, en el cual los este-

roides fallan en modificar los niveles de LH.

Dado que la administración de PCA adelanta el desarrollo del mecanismo positivo, es probable que en las ratas así tratadas, el período de insensibilidad de la liberación de LH a los esteroides sexuales ocurra más temprano que en las ratas control. El hecho de que la administración de E<sub>2</sub>-P no modifique la concentración de LH en ratas pretratadas con PCA a los 18 días de edad, en lugar de inducir un efecto de retroalimentación negativo, parece indicar que en este grupo el período de insensibilidad ocurre alrededor de esta edad. Consecuentemente, el efecto potenciador del PCA sobre la liberación de LH por E<sub>2</sub>-P puede ser detectado luego de los 18 días de edad. Teniendo en cuenta que el efecto positivo ejercido por los esteroides sexuales sobre la secreción de GR es uno de los principales eventos involucrados en el desarrollo puberal de la hembra, podría postularse que la inhibición del desarrollo de ese mecanismo por acción de la 5-HT en ratas prepúberes, podría representar una acción moduladora del sistema serotoninérgico sobre el inicio puberal de la rata hembra.

La administración de PCA no modificó los niveles basales de LH y esto sugiere que no existiría una acción tónica de la 5-HT sobre dicha secreción. Esto podría indicar que la probable participación regulatoria del sistema 5-HT es principalmente sobre los

mecanismos por los cuales los esteroides ováricos inducen liberación de LH.

La administración de 5-HTP produce liberación de LH a los 16, 18 y 20 días, pero no a partir de los 26 días de edad. Podría considerarse que entre los 20 y 26 días tienen lugar, en la rata hembra, fenómenos relacionados con el control hipotalámico de la secreción de GR (la madurez del mecanismo de retroalimentación positivo esteroideo, por ejemplo), que están conectados, probablemente con modificaciones en el efecto de los distintos neurotransmisores sobre esas hormonas hipofisarias. Al respecto es interesante recordar que también ocurre un cambio en el efecto de la melatonina sobre la secreción de LRH entre hembras prepúberes y adultas, que posiblemente esté conectado con la madurez del sistema reproductivo (150,116).

El contenido hipotalámico e hipofisario de 5-HT es significicativamente menor en ratas hembra de 18 y 20 días de edad que en animales más grandes. Entre los 20 y 25 días, se observa un incremento significativo en la concentración de 5-HT, tanto en hipotálamo como en hipófisis. Esto indicaría que entre ambas edades tienen lugar cambios fisiológicos en el contenido de 5-HT a nivel del eje hipotálamo-hipofisrio, probablemente relacionados con la madurez del sistema 5-HT y/o con su actividad funcional.

Las modificaciones en la respuesta liberadora de LH a la administración de 5-HTP, que disminuye progresivamente desde los 16 a los 20 días y desaparece luego de esta edad, podrían estar relacionadas con los cambios en la concentración de 5-HT observados luego de los 20 días de edad. Se podría postular, entonces, que en la rata hembra existen modificaciones en el efecto ejercido por el sistema serotoninérgico sobre la secreción de LH luego de la madurez del mecanismo de retroalimentación positivo esteroideo, y que las mismas son acompañadas por cambios en la concentración del neurotransmisor en el eje hipotálamo-hipofisario. Faltaría determinar si ese efecto de la serotonina representa o no una acción regulatoria de la misma, que es característica de la hembra como consecuencia de la diferenciación sexual del hipotálamo en el tipo cíclico de control gonadotrófico. El hecho de que en ratas macho no se haya encontrado liberación de LH por acción de la administración de 5-HTP, le da soporte a esa presunción.

Papel de la diferenciación sexual del hipotálamo en el efecto ejercido por el sistema serotoninérgico sobre la secreción de LH en ratas hembra y macho prepúberes

Existen evidencias de la existencia de diferencia sexual





Se utilizaron ratas macho y hembra prepúberes de la capa del Departamento de Fisiología, que crecieron en viveros de la Facultad de Medicina en las condiciones ya descritas. El día del nacimiento (día 1) se redujo el número de crías a 10 por madre.

Se separaron machos y hembras neonatos según los distintos grupos de tratamientos a realizar (quirúrgicos o manipulaciones hormonales).

Se castraron machos recién nacidos (dentro de las primeras 48 horas de vida) bajo anestesia por frío; otro grupo fue sometido a operación simulada (control).

Se inyectaron hembras recién nacidas con 1 mg de propionato de testosterona disuelta en aceite por vía s.c.; otro grupo recibió solamente el vehículo oleoso (control).

Se administró 5-HTP (75 mg/kg de peso) disuelto en solución salina, por vía i.p., una hora antes del sacrificio. Los animales utilizados como control recibieron solamente solución salina.

Todos los animales se sacrificaron por decapitación a las 5 de la tarde cuando tenían 16 y 20 días de edad. Se recogió la sangre del tronco y se determinó LH en suero por RIA según ya se describió. Los resultados (en ng/ml de suero) se compararon estadísticamente utilizando el test "t" de Student.

## Resultados

Se pueden observar en la Tabla VII, los efectos de la administración de 5-HTP sobre los niveles de LH en ratas hembra normales y androgenizadas al nacer, ratas macho normales y castrados al nacer, a los 16 y 20 días de edad.

La administración de 5-HTP incrementó significativamente los niveles séricos de LH en ratas hembra control de 16 y 20 días de edad, siendo la respuesta significativamente más baja a los 20 que a los 16 días. La androgenización neonatal de la hembra, abolió la liberación de LH por administración de 5-HTP en ambas edades.

Por otro lado, mientras que la administración de 5-HTP no provocó cambios en los niveles de LH en ratas macho normales de 16 y 20 días, en animales castrados neonatalmente indujo una liberación de LH tanto a los 16 como a los 20 días de edad. El perfil de secreción fue similar al de la hembra control, o sea, menor liberación a los 20 que a los 16 días de edad.

## Discusión

Se considera que la interacción de los andrógenos testiculares con el hipotálamo poco después del nacimiento en la rata ma-

TABLA VII. Efecto de 5-HTP sobre la Liberación de LH (ng/ml) en Ratas Prepúberes de 16 y 20 días de edad.

	16 Días		20 Días		Valor de p
	CONTROL	5-HTP	CONTROL	5-HTP	
Hembra Normal	28,6±3,7 (9)	9283±120,2 (9)	29,8±3,6 (7)	52,2±6,1 (10)	<0.01
Hembra Andro genizada *	15,3±3,4 (9)	24,3±4,2 (10)	21,5±5,3 (10)	24,5±5,4 (10)	N.S.
Macho Control	21,4±5,2 (7)	19,2±3,9 (10)	20,4±4,9 (10)	15,3±2,7 (10)	N.S.
Macho Castrado *	1278±254,3 (10)	3925±614,3 (10)	1325±280,3 (10)	2706,4±354 (10)	<0.01

Media ± error estándar. Número de determinaciones entre paréntesis.

\* Castrados o androgenizados dentro de las 48 horas de vida.

cho, permite solamente el desarrollo del tipo tónico de control de la secreción de GR (153,154). Por otro lado, el tipo cíclico de control gonadotrófico por el hipotálamo, resultado de la falta de exposición a altos niveles de esteroides sexuales durante los primeros días de vida, muestra como característica en el animal a dulto, al efecto de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides ováricos sobre la secreción de LH. Este mecanismo involucrado en el inicio puberal de la hembra, madura entre los 20 y 22 días de edad en el caso de la rata (78,16).

Como se vio anteriormente, la administración de 5-HTP fue ca paz de provocar la liberación de LH en ratas hembra de 16 y 20 días de edad, pero no en machos de esa misma edad. Sin embargo la castración del macho dentro de las primeras 48 horas de vida, per mitió la estimulación de la secreción de LH por 5-HTP en esas eda des, de manera similar a la observada en hembras control. Más aún, ambos grupos presentan mayor liberación de LH por administración de 5-HTP a los 16 que a los 20 días de edad. Por otro lado, las hembras androgenizadas al nacer no respondieron a la administración de 5-HTP a los 16 ni a los 20 días de edad.

Estos resultados demuestran que la diferencia sexual en la respuesta secretoria de LH a 5-HTP en ratas prepúberes es debida a la exposición neonatal a andrógenos. Ha sido descrito previa

mente que la concentración de 5-HT cerebral en ratas prepúberes, muestra una diferencia sexual y que la misma estaría conectada con el proceso de diferenciación sexual del SNC inducido por los andrógenos en los primeros días de vida (151,152). De acuerdo a nuestros resultados, y considerando que la liberación de LH por administración de 5-HTP podría estar relacionada con la influencia regulatoria de la serotonina sobre el hipotálamo de la hembra, es probable que la diferenciación sexual del hipotálamo, que permite el desarrollo del control cíclico de regulación hipotalámica sobre la secreción de GR, también involucre la diferenciación de un sistema regulatorio para el control cíclico, en el cual la 5-HT esté implicada.

A pesar de los resultados obtenidos, y con el fin de clarificar el efecto de la administración de 5-HTP en ratas macho, sería necesario estudiar qué ocurre con distintas dosis y distintos períodos de tiempo luego del tratamiento con el precursor de la serotonina, o con la hora del día en que se realizan los experimentos, dado que existe un ritmo diario del sistema serotoninérgico central que puede influir sobre la respuesta al 5-HTP exógeno(139).

Aún teniendo en cuenta que otras condiciones experimentales pueden proveer mayor información sobre el efecto del sistema serotoninérgico sobre la secreción de LH en ratas hembra y macho, se

puede ver a partir de estos resultados, que existe una diferencia sexual en la liberación de LH por administración de 5-HTP que está relacionada con la exposición neonatal a andrógenos. Sobre esta base, se puede suponer que con la diferenciación sexual del hipotálamo en el tipo cíclico de control gonadotrófico, también se desarrolla un mecanismo regulatorio para este tipo de control, en el cual está involucrada la serotonina.

En conclusión, todos estos hallazgos sostienen el concepto de una participación del sistema serotoninérgico en el control de la secreción de LH en ratas hembra prepúberes, ejerciendo una influencia inhibitoria sobre el inicio del efecto positivo esteroideo sobre dicha secreción y un efecto inhibitorio sobre ese mecanismo una vez que hubo madurado. Además, la administración de 5-HTP estimuló la liberación de LH hasta los 20 días de edad en la hembra pero no en el macho, efecto relacionado con la diferenciación sexual del hipotálamo en el tipo de control cíclico de secreción de GR.

Ese efecto estimulante del 5-HTP sobre la secreción de LH desaparece ya a los 26 días de edad. Dado que entre los 20 y 26 días madura el mecanismo positivo esteroideo sobre la secreción de LH, es probable que la falta de respuesta a la acción del 5-HTP observada luego de los 20 días esté conectada con cambios en la regula

ción de la secreción de GR que tienen lugar durante el desarrollo de ese evento fisiológico.

#### 2.A.4. ACCION DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES ENDOGENOS

##### Introducción

Se conocen tres grupos principales de péptidos opioides endógenos en la rata: endorfinas, encefalinas y dinorfinas, que son sintetizados en neuronas específicas. Cada uno de ellos posee una distribución determinada en el cerebro de la rata.

La  $\beta$ -endorfina es un péptido de 31 aminoácidos con alta afinidad por los receptores opiáceos  $\mu$ ,  $k$  y  $\delta$ . Es la endorfina que inhibe con mayor potencia la liberación de LH en la rata macho castrada (155). Los cuerpos celulares de estas neuronas están localizados en la región del núcleo arcuato que proyecta dentro de la EM, donde la  $\beta$ -endorfina es secretada dentro de los vasos portales. Estas neuronas inervan menos densamente el núcleo paraventricular y moderadamente la región POM, septum, AHA y el núcleo SQ en donde se han encontrado altas concentraciones de  $\beta$ -endorfina (156), En el septum y el área POM, los niveles de dicho péptido fluctúan de manera circadiana, con picos alrededor de la media noche aso-



ciados con el aumento de LRH en el HMB.

Los dos pentapéptidos, metionina-encefalina y leucina-encefalina, están distribuidos ampliamente en el cerebro de la rata. Se han localizado en neuronas separadas y los niveles del primero exceden en gran porcentaje a los del segundo. Muestran especial afinidad por los receptores tipo  $\delta$  y moderada afinidad por los del tipo  $\mu$ . Los cuerpos celulares con inmunorreactividad del tipo encefalina han sido encontrados en el área POM, SQ, AHA, núcleo arcuato, etc. En cambio, las fibras están distribuidas uniformemente en el área PO, HMB e inclusive en la capa externa de la EM. Los niveles de metionina-encefalina en el HMB y la región POA Y AHA, fluctúan diariamente, paralelamente con la LRH en el HMB; los picos ocurren durante la media noche, con concentraciones bajas durante el día. Se han encontrado concentraciones considerables de encefalina en la hipófisis anterior de ratas macho, donde los niveles aumentan gradualmente durante el desarrollo. La castración disminuye los niveles hipofisarios de metionina-encefalina. Dado que son degradadas con facilidad en los tejidos y fluidos corporales, los efectos de las encefalinas sobre la liberación de LH "in vivo" han sido difíciles de estudiar. Hay quienes observaron una disminución en la concentración de LH luego de la inyección de metionina-encefalina en la rata macho normal. Análogos sintéticos

de la misma, que presumiblemente resisten la degradación, inhiben la secreción de LH (157).

La dinorfina fue aislada por primera vez a partir de hipófisis de porcino y ha sido encontrada en distintos lugares del cerebro de la rata (158). Está localizada especialmente dentro del núcleo arcuato. Se han encontrado terminales inmunorreactivas en dicho núcleo y en el área POM. Como en el caso anterior, los niveles hipotalámicos muestran una periodicidad diaria con altas concentraciones durante la noche. A pesar de su localización en el área POM y núcleo arcuato, y su mayor afinidad por los receptores k, el efecto de las dinorfinas sobre la liberación de LH no está demasiado estudiado.

Los tres tipos de opioides descritos se encuentran distribuidos además en la hipófisis anterior, donde también se encontraron receptores específicos. También hay evidencias de que los péptidos opioides hipofisarios pueden afectar la respuesta de los gonadotropos a LRH (159).

La presencia de receptores opiáceos y de neuronas productoras de péptidos opioides en regiones del SNC que participan en la regulación neuroendócrina de la liberación de LRH (núcleos SQ, arcuato, área POM, etc.) ha sugerido que los POE podrían participar en el control de la secreción de GR. Varias evidencias en la ra-

ta, sugieren que los POE ejercen un efecto tónico inhibitorio de la secreción de LH (160,161,162), pudiendo ser un componente dentro del circuito que ejerce un control inhibitorio sobre la secreción de LRH.

El opioide sintético morfina, suprime la liberación de LH en la rata hembra castrada (155). Del mismo modo, con excepción de leucina-encefalina y metionina-encefalina, varios análogos de la última y otros péptidos naturales, suprimen la liberación pulsátil de LH en estos animales.

La supresión de la secreción de LH por acción de la  $\beta$ -endorfina es diferente de la ejercida por los esteroides gonadales. A diferencia del estradiol, la infusión continua de este péptido por vía intraventricular, suprimió ambos componentes (amplitud y frecuencia) de la liberación pulsátil de LH en la hembra castrada.

El sitio de acción de los POE u agonistas de los mismos, parece ser en algún lugar vecino a las neuronas LRH dentro de la vía septo-preóptico-tuberal, siendo las neuronas adrenérgicas el lugar donde posiblemente se encuentran los receptores opiáceos (163). La observación de que disminuye la liberación pulsátil de LH luego de la microinyección de morfina dentro del núcleo dorsal del Rafe de la hembra castrada (fuente de la mayoría de las fibras 5-HT que inervan al hipotálamo), indicaría que el sistema serotoninér-

gico cerebral también mediaría el efecto de los POE (164).

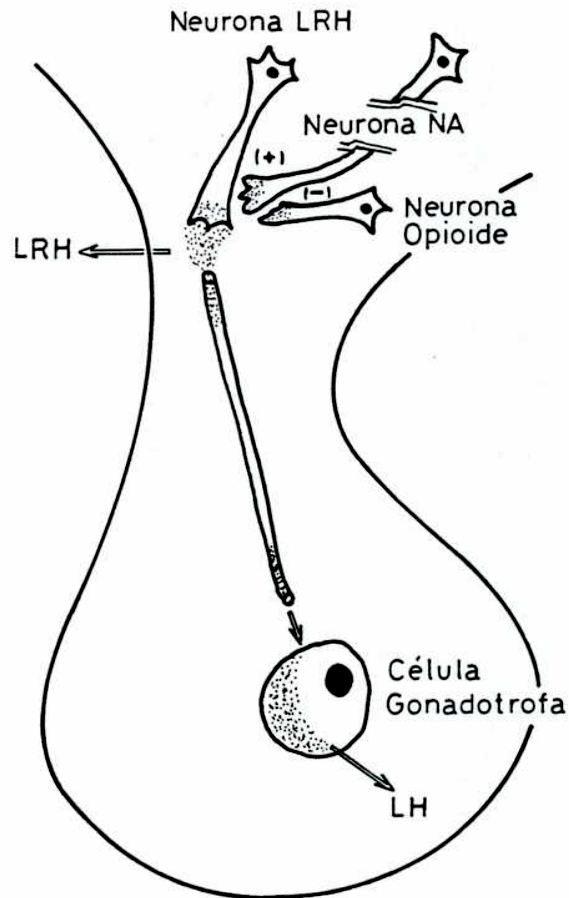
Aunque parecería que está involucrado más de un tipo de receptor a opiáceos, existe mayor preferencia para los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  sobre los  $\delta$  y  $\epsilon$  en la transmisión de los efectos inhibitorios de los POE sobre la secreción de LH en la hembra castrada. Es posible que existan múltiples subtipos de receptores a POE en las terminales adrenérgicas de la vía septo-preóptico-tuberal.

En ratas tratadas previamente con estradiol, el antagonista de receptores opiáceos Naloxona, estimuló rápidamente la liberación de LH, en cambio, se necesitó más de una inyección del antagonista para provocar la misma respuesta en hembras adultas no tratadas previamente con estradiol (165). Se ha encontrado que la Naloxona es capaz de provocar la liberación de LH en varios estadios del ciclo estral (162). La magnitud de dicha liberación fue similar entre diestro y proestro y esto contrasta con el aumento progresivo de la liberación de LH en respuesta a LRH durante este período (162). Se ha sugerido que la cantidad de LRH liberada por administración de Naloxona puede disminuir gradualmente a medida que aumentan los niveles de estradiol y los de progesterona caen en la circulación entre diestro y proestro (166). Estas suposiciones coincidirían con el punto de vista de que los POE ejercen un efecto negativo sobre la liberación de LH a través del ciclo (155),cu

yo tono varía de acuerdo al tenor de esteroides circulantes. Se ha encontrado, confirmando lo anterior, que hay una variación en los niveles de POE en determinadas áreas del hipotálamo durante el ciclo estral y luego de la administración de estrógenos en la hembra castrada (167,168).

Varias evidencias demuestran que existe un aumento en la actividad de las neuronas adrenérgicas en relación con el incremento en los niveles de LRH en el HMB previo al pico preovulatorio de LH (36). Aunque no se sabe con certeza qué procesos neurales controlan o inducen dicho aumento, los POE parecen ser uno de los elementos involucrados en el aumento de la actividad catecolaminérgica en el HMB y área PO en proestro (155) y hay evidencias de que los POE ejercen una influencia tónica inhibitoria sobre la liberación de LH y que la NA y A pueden mediar su influencia sobre las neuronas LRH (161) (Figura 14). La morfina y los POE bloquean la secreción de LH y LRH preovulatorias (169), la ovulación y el pico de LH inducido por esteroides ováricos en la hembra castrada (170). Estos efectos probablemente se manifiestan mediante la supresión del aumento del recambio de NA y A (170), más que por la respuesta de las neuronas LRH a estos neurotransmisores. Está avalado el hecho de que los opiáceos pueden modificar la liberación de NA y A en las proximidades de las neuronas LRH en las regiones

FIGURA 14. Probable mecanismo de inhibición de la secreción de LH por opiáceos.



del área POM y EM-arcuato, por hallazgos de que estas CA y la clonidina, agonista de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, rápidamente activaron la liberación de LH en ratas tratadas con morfina (171). Inversamente, la interrupción de la influencia inhibitoria de los POE mediante el uso de Naloxona, aumentó rápidamente el recambio de CA hipotalámicas (170) y la salida de NA y A desde el área PO e HMB, lo que probablemente a su vez, induzca la liberación de LRH (166). Además, la reducción previa del depósito liberable de NA y A en el área POM y EM-arcuato o el bloqueo de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, impidió la liberación de LH y LRH por administración de Naloxona (161).

Estudios recientes, utilizando la respuesta liberadora de LH a Naloxona como índice de su influencia sobre la liberación de LRH, también sugirieron alguna reducción de la influencia inhibitoria de los POE antes y durante el pico de LH en proestro o inducido por  $E_2$  y P en hembras castradas (162).

La morfina bloqueó el aumento de LRH en el HMB inducido por progesterona en hembras castradas pretratadas con estradiol (161). Dado que la morfina inhibe el recambio de NA y A (170), esto sugiere que la supresión del aumento de LRH en el HMB puede deberse a deficiencias de la señal noradrenérgica, observación semejante a lo encontrado luego de la supresión de NA ya sea con inhibidores de la DBH o con 6-hidroxidopamina (172).

Ha sido observado un aumento significativo en los niveles de

$\beta$ -endorfina en la EM de ratas en proestro y en asociación con la descarga preovulatoria de LH inducida por esteroides ováricos en hembras castradas. Aunque dichos aumentos son difíciles de interpretar, dado que la Naloxona falló en liberar LH durante este período (162), pudiera ser que la disminución en la liberación de  $\beta$ -endorfina pueda permitir un aumento transitorio en los niveles de LH en el HMB.

Tomando los datos precedentes en conjunto, se sugiere que en algún momento de la mañana del proestro, la influencia inhibitoria de los POE es interrumpida localmente en regiones del área POM y EM-arcuato, para permitir un aumento en el recambio de CA, siendo éste un paso inicial en la secuencia de eventos neurales que culmina con la descarga masiva de LH en la tarde del proestro.

En ratas hembra prepúberes, los POE parecen jugar un rol importante entre los mecanismos que controlan el desarrollo puberal. Se vio que la administración perinatal de Naloxona, provocó adelantado puberal en esos animales (173).

El trabajo descrito a continuación ha sido realizado con el propósito de determinar la influencia ejercida por los POE sobre la madurez del mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides sexuales sobre la secreción de LH, siendo éste uno de los principales eventos involucrados en el pico preovulatorio



de LH y el inicio puberal de la hembra. Se describirá el efecto ejercido por la administración de Naloxona, antagonista específico de receptores opiáceos, sobre los niveles de LH en ratas hembra tratadas con E<sub>2</sub>-P a distintas edades de la etapa prepuberal.

### Materiales y Método

Se utilizaron ratas hembra prepúberes de la cepa del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, que crecieron en viveros en las condiciones ya descriptas.

El benzoato de estradiol fue administrado por vía s.c. 76 horas previo al sacrificio, en dosis de 10 µg/rata y la progesterona, por la misma vía en dosis de 1 mg/rata, 5 horas previo al sacrificio. Los animales control fueron inyectados con el vehículo oleoso.

La Naloxona (Endo Lab., Garden City, N.Y., USA) disuelta en 0.87 % de ClNa, se administró en dosis de 5 mg/kg de peso corporal por vía i.p., 30 minutos previo al sacrificio.

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación a las 5 de la tarde, teniendo en ese momento 14, 20 y 25 días de edad. Se recogió la sangre del tronco y luego de la retracción del coágulo se determinaron los niveles de LH en suero por RIA tal como

fuera descrito anteriormente. Los resultados se compararon estadísticamente utilizando ANOVA y el test de Tuckey (114,115).

### Resultados

En la Tabla VIII se pueden observar los efectos de la administración de Naloxona y E<sub>2</sub>-P sobre los niveles de LH en ratas hembra prepúberes de 14, 20 y 25 días de edad. La administración de E<sub>2</sub>-P en ratas de 14 días provocó un efecto de retroalimentación negativo sobre la secreción de LH, dado que los niveles de esa hormona fueron significativamente menores que en ratas control ( $p < 0.01$ ). Por otro lado, la administración de Naloxona en estos animales, produjo un incremento significativo en los niveles basales de LH, que fue bloqueado por la administración simultánea de E<sub>2</sub>-P. En este último caso, las ratas tratadas con Naloxona y E<sub>2</sub>-P mostraron niveles de LH semejantes a los del grupo tratado solamente con E<sub>2</sub>-P.

A los 20 días de edad, la administración de E<sub>2</sub>-P no produjo cambios significativos en la secreción de LH mientras que la Naloxona los incrementó. La inyección de E<sub>2</sub>-P en ratas de 20 días tratadas con Naloxona, provocó un incremento en los niveles de LH, siendo éste significativamente mayor que el observado cuando se

TABLA VIII. Efecto de Naloxona y E<sub>2</sub>-P sobre la Secreción de LH en Ratas Hembra Prepúberes.

Edad (días)	LH (ng/ml suero)			Naloxona + E <sub>2</sub> -P (D)	Valor de P <0.01 <0.02
	CONTROL (A)	E <sub>2</sub> -P (B)	Naloxona (C)		
14	43,7±9,1 (9)	6,5±0,7 (7)	242,5±3,7 (9)	6,7±1,0 (8)	A vs B A vs C A vs D B vs C C vs D
20	22,0±2,8 (7)	43,0±11,5 (7)	103,1±17,4 (9)	771,8±248,3 (9)	A vs C A vs D B vs C B vs D
25	20,1±4,1 (7)	1904,8±290,3 (8)	61,7±9,6 (8)	3075,3±282,4 (8)	A vs B A vs C A vs D B vs D C vs D

Media ± error standard. Número de determinaciones entre paréntesis.

administró Naloxona solamente ( $p < 0.02$ ).

En animales de 25 días de edad, la administración de  $E_2$ -P indujo un efecto de retroalimentación positivo sobre la secreción de LH. A esta edad, la administración de Naloxona resultó en un aumento de los niveles basales de LH y además provocó una potenciación significativa de la liberación de esa hormona por administración de  $E_2$ -P.

La liberación de LH por acción de la Naloxona fue disminuyendo desde los 14 a los 25 días de manera significativa.

### Discusión

En el inicio puberal de la rata hembra están aparentemente involucrados dos fenómenos importantes: una disminución del efecto inhibitorio ejercido por los esteroides gonadales sobre la secreción de GR (174) y el desarrollo del mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides sexuales sobre la liberación de LH y FSH. Trabajos previos han demostrado que las estructuras nerviosas involucradas en este mecanismo maduran alrededor de los 20 días de edad, luego de lo cual los esteroides inducen liberación de LH (78,16).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con datos

previos, dado que la administración de E<sub>2</sub>-P produjo una disminución en los niveles de secreción de LH a los 14 días de edad, no modificó dichos valores a los 20 días e indujo liberación de LH a los 25 días de edad.

Los péptidos opioides endógenos, que ejercen un efecto inhibitorio sobre la secreción de GR, parecen tener un rol fisiológico en el inicio puberal de la rata hembra, dado que la administración perinatal de Naloxona, provocó un aumento en la concentración sérica de LH y adelantó la edad de inicio puberal determinada de acuerdo al día de apertura vaginal y primer estro. Dichos animales mostraron mayores niveles de LH y FSH en el primer proestro que las ratas control (173).

Este trabajo confirma datos previos, dado que se puede observar un aumento significativo en los niveles de LH a los 14, 20 y 25 días de edad luego de la administración de Naloxona (63). La inyección de E<sub>2</sub>-P anuló la respuesta liberadora de LH por Naloxona a los 14 días de edad, a pesar de que existe evidencia de que el efecto negativo ejercido por los esteroides ováricos estaría mediado en parte por los péptidos opioides hipotalámicos (175,176). En nuestro caso, el hecho de que la Naloxona no haya modificado la inhibición inducida por administración de E<sub>2</sub>-P sobre la secreción de LH a los 14 días de edad, indica que el efecto negativo

esteroideo no sería dependiente de la mediación opioide. Más evidencia al respecto ha sido también presentada (177).

La administración de esteroides ováricos en ratas tratadas con Naloxona a los 20 días de edad indujo una liberación de LH, indicando que la inhibición opioide es capaz de adelantar la madurez del mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides ováricos sobre la secreción de LH. Más aún, la administración de Naloxona potenció la liberación de LH por acción de  $E_2$ -P a los 25 días de edad, lo que confirmaría la existencia de un efecto inhibitorio opioide sobre ese mecanismo. Dicha inhibición podría estar conectada con la conocida acción regulatoria de los péptidos opioides sobre el inicio puberal de la rata hembra.

Es interesante notar que la liberación de LH en respuesta a Naloxona fue disminuyendo entre los 14 y 25 días de edad, en coincidencia con lo hallado por otros autores (63). Esta reducción quizás represente una disminución en el efecto inhibitorio ejercido por el sistema opioide sobre la secreción de LH (175,176), que podría estar relacionada con el desarrollo del mecanismo positivo esteroideo sobre la secreción de esa gonadotrofina.

Estos resultados, en los que encontramos que los opioides endógenos podrían ejercer una influencia inhibitoria de la maduración del mecanismo de retroalimentación positivo, y el hecho de que

la liberación de LH en respuesta a Naloxona se observe solamente en la rata hembra prepúber (177), permite especular que el efecto regulatorio de los opiáceos sobre el desarrollo del mecanismo positivo esteroideo sobre la secreción de GR podría estar también asociado con la diferenciación sexual del hipotálamo en el tipo cíclico de control de la función gonadotrófica.

#### 2.A.5. ACCION DE LA HIPERPROLACTINEMIA

##### Introducción

En la mayoría de los mamíferos, la secreción de prolactina (PRL) se encuentra bajo el control inhibitorio del hipotálamo (178) y el principal mediador parece ser la DA liberada desde las neuronas dopaminérgicas del sistema túbero-infundibular (TIDA), cuyos cuerpos celulares están localizados en el núcleo arcuato y los axones terminan en la capa externa de la EM (179).

La biosíntesis de DA se produce dentro de los terminales axónicos que liberan el producto dentro de los capilares del sistema porta-hipofisario y desde allí a los lactotropos de la hipófisis anterior, en concentraciones suficientes para inhibir la secreción de PRL. La capacidad de la DA para inhibir dicha secreción se de

mostró tanto "in vivo" como "in vitro" (180,181), hallándose receptores de alta afinidad para DA en los lactotropos de distintas especies, inclusive el ser humano (182).

Dado que la liberación de PRL no está regulada por señales negativas provenientes de sus órganos blancos, el mecanismo de retroalimentación corto que opera por medio de la regulación hipotálamica (vía flujo retrógrado) adquiere especial importancia. En dicho mecanismo, la PRL altera la liberación de DA y así controla su propia secreción. Altas concentraciones de PRL provocan una mayor liberación de DA por el hipotálamo, la cual suprime posteriormente la liberación de PRL desde la hipófisis, y viceversa, si los niveles de PRL disminuyen. Este mecanismo se demostró primero en la rata (183) y luego se confirmó en el ratón y el hamster. Posiblemente opere el mismo mecanismo en primates.

El control hipotalámico de la secreción de PRL es predominantemente inhibitorio tónico, pero también parece ser necesario el rol funcional de ciertos factores liberadores, sobre todo durante la actividad secretora aguda.

Existe evidencia experimental en varias especies, inclusive en el ser humano, de que la TRH, serotonina, péptidos opioides endógenos, histamina, ocitocina, angiotensina y otras sustancias, pueden estar involucradas en el control de la secreción de PRL. De



todas ellas sólo se ha identificado adecuadamente a la TRH y al VIP (péptido intestinal vasoactivo) como factores liberadores de esta hormona.

Varios neurotransmisores y neuromoduladores parecen estar involucrados en el control hipotalámico de la liberación de PRL. La integración entre ellos, controlaría la secreción de esta hormona bajo diferentes condiciones fisiológicas.

El aumento de la actividad serotoninérgica provoca un aumento de la secreción de PRL (184). Dichos efectos son independientes de la vía dopaminérgica. Las señales parecen provenir del núcleo dorsal del Rafe, y la liberación de 5-HT se produce en las terminales del HMB (185).

Los péptidos opioides estimulan la liberación de PRL (186). Evidencias experimentales indican que el control opiáceo de la secreción de PRL en la rata, está mediado a través de la inhibición del recambio de DA y de su liberación por las neuronas del sistema túberoinfundibular.

La administración intraventricular de histamina en la rata induce liberación de PRL, mientras que la difenhidramina, bloqueante histaminérgico, anula la liberación de PRL inducida por estrés (187). Otro antagonista, la cimetidina, induce liberación de PRL y galactorrea (188).

La PRL es liberada en forma de pulsos de distinta magnitud, superpuestos a una secreción basal continua. La mayor concentración de PRL en plasma humano ocurre durante el sueño nocturno (189). En la primera hora de vigilia, la misma cae para alcanzar los niveles más bajos en la media mañana. Este tipo de ciclo se observa en niños y niñas prepúberes, púberes y adultos.

Varios estímulos de estrés tales como el ejercicio físico, cirugía, hipoglucemia y anestésicos inducen secreción de PRL, tanto en el hombre como en la mujer.

Durante la pubertad de la mujer, el nivel medio de PRL en suero aumenta hasta alcanzar el nivel adulto. Este cambio no ocurre en el hombre. Aunque existen evidencias sobre la existencia de un pequeño pico de PRL en mitad del ciclo, con mayores niveles durante la fase luteal, no hay grandes cambios en la concentración de PRL durante el ciclo sexual de la mujer (190). En cambio, en la rata se observa un aumento significativo de PRL junto con LH y FSH durante el proestro (191).

Los estrógenos promueven tanto la síntesis como la liberación de PRL por la hipófisis, tanto en la mujer como en la rata (192). Este efecto es dosis-dependiente. La influencia estimulante de los mismos sobre esa glándula, parece deberse a una acción directa sobre el lactotrofo, aumentando la síntesis de DNA y RNA mensajeros.

jero y así la síntesis de PRL. También, posee un efecto anti-dopaminérgico, disminuyendo marcadamente la liberación de DA y la habilidad de la misma para inhibir la secreción de PRL (193). La administración conjunta de progesterona, luego de la de estrógenos, provoca una liberación aguda de PRL así como de LH (194).

Estudios realizados tanto en animales de laboratorio como en la mujer, sugieren una relación inversa entre la secreción de GR y la de PRL (195,196,197). En el caso de la mujer, niveles elevados de PRL provocan en general un síndrome anovulatorio con amenorrea y galactorrea (196). Se ha sugerido que la hiperprolactinemia afecta los mecanismos hipotalámicos involucrados en el efecto de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides ováricos sobre la secreción de LH, necesario para inducir la ovulación (197). También se han presentado evidencias de que la hiperprolactinemia afecta directamente la función ovárica (198,199), lo que a su vez podría ser responsable de las alteraciones observadas en el mecanismo positivo esteroideo.

La administración de PRL en ratas hembra, adelanta el inicio puberal (71,73,200). El implante de PRL en el hipotálamo induce liberación de LH y FSH (73,74) y sobre esta base, se ha sugerido la existencia de un efecto estimulante directo de esa hormona sobre la secreción de LRH, como uno de los mecanismos posibles invu

lucrados en la inducción de pubertad precoz por hiperprolactinemia en esos animales.

Otros autores han sugerido la existencia de un sitio ovárico de acción de la PRL para provocar pubertad precoz (72).

Dado que el mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides ováricos sobre la secreción de GR es uno de los eventos principales involucrados en el desarrollo puberal de la hembra, el trabajo descripto a continuación tuvo por objeto determinar si la hiperprolactinemia inducida por administración de Sulpirida, antagonista de receptores dopaminérgicos, puede afectar la madurez del efecto estimulante ejercido por E<sub>2</sub>-P sobre la secreción de LH en la rata.

### Materiales y Método

Se utilizaron ratas hembra prepúberes de la cepa del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, que crecieron en las condiciones ya descriptas.

La hiperprolactinemia fue inducida por medio de la administración de Sulpirida que eleva los niveles de PRL endógena tanto en la mujer (201) como en la rata (202). Dicha droga se administró por vía s.c. en dosis de 7 mg/100 g de peso por día (en dos in

yecciones, a las 8 hs y a las 14 hs), durante 6 días consecutivos, disuelta en solución fisiológica. Los grupos control fueron inyectados con el vehículo.

Los animales se sacrificaron por decapitación 3 horas después de la última inyección de Sulpirida; tres días antes se administró benzoato de estradiol en dosis de 10  $\mu\text{g}$ /rata por vía s.c., y 5 horas antes 1 mg/rata de progesterona, por la misma vía. Se realizó el tratamiento simultáneo de esteroides y Sulpirida, de tal modo que en el 3° día de administración de Sulpirida, se inyectó el estradiol, y en el 6° día de inyección de la droga, se administró la progesterona.

Un grupo de animales recibió solamente el tratamiento esteroideo y otro grupo, únicamente Sulpirida. El 4° grupo se utilizó como control.

En el momento del sacrificio los animales tenían 14, 20, 24, 28 y 32 días de edad. Se recogió la sangre del tronco y luego de separar el suero se determinaron los niveles de LH y PRL por RIA por doble anticuerpo. La PRL sérica se dosó utilizando los equipos provistos por el NIAMDD, dependiente del NIH. La marcación de PRL altamente purificada de rata, se realizó en nuestro laboratorio utilizando Cloramina T y Metabisulfito de sodio tal como se describió previamente para la marcación de LH. Para cada ensayo

se realizó una curva de referencia utilizando el estándar de PRL provisto por el NIAMDD. Los resultados se expresaron en ng/ml de suero en términos del Rat Prolactin RP1 (estándar).

El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Tuckey (114,115).

### Resultados

Como se puede observar en la Tabla IX, la administración de 7 mg/100 g de peso de Sulpirida durante 6 días consecutivos, provocó un aumento significativo en los niveles de PRL sérica, comparados con los valores control, en todas las edades estudiadas ( $p < 0.01$ ).

El tratamiento con esteroides ( $E_2$ -P) indujo la liberación de PRL en animales control e hiperprolactinémicos por Sulpirida a los 24, 28 y 32 días de edad, pero no en ratas más jóvenes. Los niveles de PRL en ratas tratadas con Sulpirida y  $E_2$ -P a los 24, 28 y 32 días de edad, fueron significativamente más elevados que en aquellos tratados con Sulpirida solamente, o los que recibieron solamente el tratamiento con esteroides.

La hiperprolactinemia por Sulpirida indujo una liberación de LH por administración de  $E_2$ -P similar a la encontrada en animales

TABLA IX. Prolactina Sérica en Ratas Prepúberes tratadas con Sulpirida y E<sub>2</sub>-P.

Edad (días)	Prolactina (ng/ml)			Sulpirida + E <sub>2</sub> -P (D)	Valor de p (*)
	Control (A)	E <sub>2</sub> -P (B)	Sulpirida (C)		
14	9,6±0,8 (6)	8,9±0,9 (6)	40,0±3,8 (6)	44,8±5,9 (7)	A vs C ; A vs D B vs C ; B vs D
22	13,3±1,8 (6)	21,3±5,6 (6)	81,4±3,7 (7)	138,0±26,0 (8)	A vs C ; A vs D B vs C ; B vs D
24	16,4±3,7 (7)	89,7±9,8 (6)	75,5±5,1 (13)	125,0±13,5 (9)	A vs B ; A vs C A vs D
28	13,6±2,8 (7)	138,0±26,0 (7)	112,0±14,0 (8)	236,0±24,0 (7)	A vs B ; A vs C A vs D ; C vs D
32	15,7±5,4 (8)	151,0±18,3 (8)	108,2±12,8 (7)	280,0±34,2 (8)	A vs B ; A vs C A vs D ; C vs D

Media ± error estandar.

\* De acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tuckey.

Número de determinaciones entre paréntesis.

normoprolactinémicos, en todas las edades estudiadas (Tabla X). Se puede observar una disminución significativa en los niveles de LH en ambos grupos de ratas a los 14 y 20 días de edad, y una acción estimulante a los 24, 28 y 32 días de vida.

No hay diferencias significativas en la concentración basal de LH en suero entre ratas control e hiperprolactinémicas en las distintas edades estudiadas (Tabla X).

### Discusión

Nuestros resultados muestran que la hiperprolactinemia inducida por administración de Sulpirida no modifica ni los niveles basales de LH ni la edad en la que es posible inducir el efecto estimulante de los esteroides sexuales sobre la secreción de LH en la rata. Por otro lado, como ya se ha demostrado previamente (203,204), los animales prepúberes presentaron niveles basales de LH más elevados en etapas tempranas de la etapa prepuberal que en momentos más avanzados, y este fenómeno también se lo observa en ratas hiperprolactinémicas (Tabla X). Esto parece indicar que el tipo de hiperprolactinemia inducida por Sulpirida no afecta el perfil de secreción basal de LH en la rata hembra prepúber.

Hay numerosas evidencias de que la hiperprolactinemia puede



TABLA X. Efecto de E<sub>2</sub>-P sobre la Liberación de LH en Ratas Prepúberes con Hiperprolactinemia inducida por Sulpirida.

Edad (días)	LH (ng/ml suero)				Valor de p (*)
	CONTROL (A)	E <sub>2</sub> -P (B)	Sulpirida (C)	Sulpirida + E <sub>2</sub> -P (D)	
14	85,2±7,3 (6)	17,7±3,4 (6)	85,5±10,4 (6)	24,5±7,3 (6)	A vs B ; A vs D B vs C ; C vs D <0.01
22	68,0±4,8 (6)	28,0±8,3 (6)	60,5±7,5 (7)	38,0±4,2 (8)	A vs B ; A vs D B vs C ; C vs D
24	35,0±3,5 (7)	562,0±80,0 (6)	35,3±7,5 (13)	545,0±52,2 (9)	A vs B ; A vs D B vs C ; C vs D
28	25,2±4,1 (7)	4400,3±489,2 (7)	32,1±3,9 (8)	5242,3±632,2 (7)	A vs B ; A vs D B vs C ; C vs D
32	20,3±3,2 (6)	3500,3±320,1 (6)	22,3±4,8 (6)	2930,2±320,3 (6)	A vs B ; A vs D B vs C ; C vs D

Media ± error estandard.

\* De acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tuckey.

Número de determinaciones entre paréntesis.

adelantar el inicio puberal de la rata hembra (71,72,73,74,200). Se ha sugerido la existencia de un efecto estimulante directo de la prolactina sobre la secreción de LRH, como uno de los mecanismos posibles por los que la hormona puede adelantar la pubertad (73,200). Sin embargo, también fue propuesto un efecto inhibitorio de la PRL sobre la secreción de LH (71).

Nuestros resultados parecen indicar que la pubertad precoz inducida por hiperprolactinemia, no está relacionada con cambios en la madurez de los mecanismos involucrados en el efecto positivo ejercido por los esteroides ováricos sobre la secreción de LH. Más aún, los niveles elevados de PRL no afectan el perfil de secreción basal de LH durante la etapa prepuberal de la rata hembra.

Sería importante estudiar la posibilidad de que la hiperprolactinemia induzca un adelanto puberal en la rata hembra, alterando mecanismos que no involucren la madurez del mecanismo positivo esteroideo. Por ejemplo, otros autores (72) mostraron que en ratas hiperprolactinémicas por Sulpirida, hay un aumento en la sensibilidad ovárica a las GR, pudiendo esto indicar la existencia de un sitio de acción ovárico de la PRL para la inducción de pubertad precoz.

Trabajos realizados por otros autores indican que la adminis

tración de estrógenos no es capaz de aumentar los niveles de PRL en ratas hembra menores de 24 días de edad, mientras que los antagonistas dopaminérgicos como la Pimozida, pueden provocar liberación de PRL a partir de los primeros días de vida (205). Nuestros resultados confirman aquellos, dado que la administración de E<sub>2</sub>-P no produjo elevación en los niveles de PRL sérica en ratas de 14 y 20 días, mientras que en estas edades la administración de Sulpirida estimuló dicha secreción.

Es interesante notar que la administración de esteroides ováricos elevó aún más los niveles altos de PRL inducidos por la inyección de Sulpirida en ratas de 24, 28 y 32 días de edad. Se piensa que tanto los estrógenos como la Sulpirida provocan liberación de PRL actuando a nivel hipofisario y del SNC (206,207,208,209). Sin embargo, nosotros demostramos que la administración de E<sub>2</sub>-P incrementó significativamente los niveles ya elevados de PRL por el tratamiento con Sulpirida, siendo ésto una evidencia de la existencia de diferentes mecanismos de acción para ambas sustancias. El hecho de que la liberación de PRL por acción esteroidea y por la administración de Sulpirida madure en momentos diferentes de la etapa prepuberal de la rata hembra (205), refuerza ese punto de vista. De todos modos no puede descartarse que la administración de E<sub>2</sub>-P provoque una estimulación adicional sobre el mecanismo



2.B. ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE RETROALIMENTACION POSITIVO  
EJERCIDO POR LOS ESTEROIDES SEXUALES SOBRE LA SECRECION DE  
GONADOTROFINAS EN LA RATA ADULTA.

2.B.1. ACCION DE LA MELATONINA

Introducción

Ya hemos descrito la acción de la glándula pineal y su principal hormona, la melatonina, sobre la secreción de LH en ratas hembra prepúberes (Capítulo 2.A.2.).

El presente trabajo tuvo por objeto estudiar el efecto ejercido por la administración de melatonina sobre la liberación de LH inducida por E<sub>2</sub>-P en ratas adultas castradas, siendo este mecanismo de fundamental importancia para que se produzca la ovulación.

Por otro lado, y teniendo en cuenta que la desnervación simpática de la glándula pineal produce una disminución drástica de la actividad metabólica de la glándula (101), estudiamos el efecto de la administración de E<sub>2</sub>-P sobre la secreción de LH en ratas hembra castradas sujetas a gangliectomía cervical superior (GCS).

Materiales y Método

Los animales utilizados fueron ratas hembra adultas de la cepa del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, mantenidas en viveros en las condiciones ya descritas.

Las castraciones se realizaron bajo anestesia con éter tres semanas antes del comienzo de los experimentos.

La melatonina fue administrada por vía s.c. disuelta en etanol: salina (5:95) dos veces por día a las 9 y 16 horas durante 6 días consecutivos en dos dosis diferentes: 125 µg y 250 µg/100 g de peso corporal.

El benzoato de estradiol se inyectó en una sola dosis de 20 µg/rata y 3 días después se administraron 2 mg de progesterona. Ambos esteroides se inyectaron por vía s.c. al mediodía.

Los grupos control fueron inyectados con el vehículo.

El tratamiento esteroideo se realizó simultáneamente con el de melatonina. Al tercer día de tratamiento con melatonina, se administró estradiol y al sexto día, la progesterona.

La GCS se realizó bajo anestesia etérea una semana antes de comenzar el tratamiento con melatonina. Se retrajeron las glándulas salivales y se identificó el ganglio cervical superior en la bifurcación de la arteria carótida común en sus ramas interna y externa, removiéndoselo de ambos lados.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación a las seis de la tarde, habiendo recibido tres horas antes progesterona y/o dos horas antes la última inyección de melatonina. Los grupos control se sacrificaron en ese mismo momento.

Se recogieron las muestras de sangre y se separó el suero luego de la retracción del coágulo, donde se realizaron las determinaciones hormonales de LH por RIA por doble anticuerpo, como ya fuera descrito en el Capítulo 2.A.1.b.

Las concentraciones de LH se expresaron en ng/ml de suero en base al estándar provisto (RP1).

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA luego de la transformación logarítmica de los datos (114) y el método de comparaciones múltiples de Tuckey (115).

## Resultados

En la Tabla XI-1, se puede observar el efecto del tratamiento con melatonina (125  $\mu$ g/100 g de peso corporal durante 6 días consecutivos, dos veces/día) sobre la liberación de LH inducida por esteroides. La melatonina no modificó los niveles basales de LH en las ratas hembra castradas, pero potenció la liberación de esa hormona inducida por el tratamiento con E<sub>2</sub>-P.

TABLEA XI. Efecto de la Melatonina sobre la Liberación de LH en Ratras  
Castradas.

EXPERIMENTO 1		EXPERIMENTO 2	
GRUPO	LH sérico (ng/ml)	GRUPO	LH sérico (ng/ml)
A Vehículo	703 ± 94 (9)	A Vehículo	843 ± 126 (10)
B Estradiol- Progesterona	2249 ± 269 (9)	B Estradiol- Progesterona	3250 ± 744 (8)
C Melatonina (250 µg/100 g)	518 ± 43 (10)	C Melatonina (500 µg/100 g)	1008 ± 233 (10)
D Melatonina + Estradiol- Progesterona	4222 ± 728 (9)	D Melatonina + Estradiol- Progesterona	471 ± 109 (10)

Análisis Estadístico:		Análisis Estadístico:	
p<0.05	B vs D	p<0.01	A vs B
	A vs B		B vs D
p<0.01	A vs D	p<0.05	B vs C
	B vs C		
	C vs D		

La melatonina se inyectó en dosis de 250 µg/100 g (Exp. 1) ó 500 µg/100 g/ día (Exp. 2), durante 6 días. Los resultados se presentan como la media ± error standard. Entre paréntesis, número de determinaciones.



En un segundo experimento, se estudió el efecto provocado por una dosis mayor de melatonina, 250 µg/100 g de peso corporal, dos veces/día durante 6 días consecutivos (Tabla XI-2). La melatonina en esta dosis, suprimió el incremento en los niveles de LH inducidos por la administración de esteroides sexuales. Nuevamente, los niveles de LH postcastración se mantuvieron inalterados a pesar del tratamiento con melatonina.

En un tercer experimento, se estudió el efecto de la GCS sobre la inhibición provocada por la dosis mayor de melatonina sobre el efecto de retroalimentación positivo ejercido por E<sub>2</sub>-P sobre la liberación de LH (Tabla XII). La administración de E<sub>2</sub>-P en ratas gangliectomizadas provocó un incremento en los niveles de LH de magnitud similar a la observada en los animales control de la Tabla XI. El tratamiento con melatonina en la dosis utilizada en el 2° experimento, no fue capaz de bloquear el aumento en los niveles de LH en respuesta a E<sub>2</sub>-P. Por el contrario, se produjo un incremento en los niveles de esa hormona significativamente superior al encontrado cuando se inyectaron los esteroides solamente, repitiéndose el efecto observado en el 1° experimento.

### Discusión

TABLA XII. Efecto de la Melatonina sobre la Liberación de LH en Ratas Gangliectomizadas.

GRUPO	LH sérico (ng/ml)
A Vehículo	600 ± 62 (9)
B Estradiol + Progesterona	1895 ± 364 (8)
C Melatonina	515 ± 83 (8)
D Melatonina + Estradiol- Progesterona	4467 ± 884 (8)

<u>Análisis Estadístico:</u>	
p<0.05	A vs B B vs C B vs D
p<0.01	A vs D C vs D

La melatonina se inyectó en dosis de 500 µg/100 g/día, en 2 inyecciones, durante 6 días. La gangliectomía se realizó 7 días antes de la inyección de melatonina. Media ± error estandar. Entre paréntesis, número de determinaciones.

Los resultados indican que en ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol y progesterona, la melatonina ejerce un efecto bifásico dosis-dependiente sobre la liberación de LH, siendo la dosis más baja estimulante y la más alta inhibitoria. La GCS que provoca la desnervación simpática de la glándula pineal y una reducción severa de su actividad metabólica, abolió el efecto inhibitorio de la dosis mayor de melatonina sobre la liberación de LH inducida por esteroides, de modo que en estos animales, la dosis alta de melatonina potenció la liberación de LH por acción de E<sub>2</sub>-P.

Se pueden postular distintas interpretaciones para tratar de explicar estos hallazgos. La melatonina exógena puede tener distintos efectos, dependiendo de si actúa directamente sobre la glándula pineal o sobre una estructura extrapineal. A dosis bajas, la melatonina podría facilitar el efecto positivo esteroideo sobre la secreción de LH a nivel extrapineal, con ausencia relativa de efectos pineales. A dosis altas, el indol podría estimular la liberación de otro producto pineal sirviendo éste de hormona antigonal. La GCS, al impedir la actividad metabólica pineal, eliminaría este segundo componente.

Varias observaciones dan sustento al concepto de que al menos algunos de los efectos de la melatonina se realizan mediante cambios en la actividad secretora de la glándula pineal. Se vio

que la melatonina es capaz de afectar el contenido de lípidos pineales (107), de los niveles de serotonina glandulares (108), etc., como también de provocar cambios ultraestructurales compatibles con activación pineal (109). Ha sido publicado que la administración intraventricular de melatonina, aumenta los niveles de arginina-vasotocina dentro del LCR, péptido que posee un potente efecto inhibitorio sobre la liberación de LH (210). Pudiera ser también, que la GCS afecte la actividad de la melatonina por otras rutas que no sean la glándula pineal.

Existe otra interpretación de los resultados aquí presentados. La melatonina administrada podría interferir con la melatonina endógena (u otro producto pineal) o tener una determinada relación temporal con la secreción endógena de melatonina, para causar cambios en el efecto positivo esteroideo en un sitio de acción extrapineal. La desnervación pineal, por impedimento de la actividad secretora de la glándula, puede provocar cambios en la actividad de la melatonina exógena. Al respecto, se puede mencionar que el tratamiento con melatonina, reduce la unión de estradiol marcado en hipófisis de ratas hembra castradas pinealectomizadas, sugiriendo que el indol puede afectar el mecanismo receptor a esteroideos en este tejido (99).

El hipotálamo es probablemente el principal sitio de acción

de la melatonina. La misma se concentra dentro de esa estructura luego de su administración, ya sea sistémica o dentro del LCR (211, 212), encontrándose sitios específicos de unión para melatonina en fracciones de membrana del HMB (213). La melatonina induce en el hipotálamo una variedad de cambios metabólicos, entre ellos, liberación de LRH. El efecto estimulante de la melatonina sobre la liberación de LH por acción de  $E_2$ -P en ausencia de inervación simpática de la glándula pineal observado en este trabajo, es compatible con el incremento de la liberación de LRH por perfusión "in vitro" del HMB de la rata con esa hormona (214).

Todos los efectos de la melatonina exógena sobre el efecto positivo esteroideo sobre la secreción de LH, pueden ser vistos de este modo, como resultado de una acción facilitadora del indol a nivel hipotálamo-hipofisario y de una acción inhibitoria que necesita la presencia de un sistema simpático cervical intacto, y que opera a dosis altas.

## 2.B.2. ACCION DEL SISTEMA SEROTONINERGICO

### Introducción

Ya hemos descripto la acción de la serotonina sobre la secre

ción de LH en la rata hembra prepúber (Capítulo 2.A.3.).

El objetivo de estos trabajos ha sido estudiar el efecto de la administración del precursor en la síntesis de serotonina, 5-HTP sobre la secreción de LH en la rata hembra adulta, como así también el efecto de la destrucción de las neuronas serotoninérgicas mediante el uso de PCA, neurotóxico serotoninérgico, sobre la liberación de LH en respuesta a la administración de LRH en estos animales.

#### Materiales y Método

Se utilizaron ratas hembra y macho adultas de la cepa del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, que crecieron en nuestro vivero, en las condiciones ya relacionadas.

Las ratas hembra fueron ovariectomizadas 30 días antes de comenzar las experiencias. En ellas se inyectó benzoato de estradiol en dosis de 20  $\mu$ g/rata, 76 horas previo al sacrificio, y 2 mg/rata de progesterona 5 horas previo al sacrificio, ambos por vía s.c.

El 5-HTP, precursor inmediato de la serotonina, se administró en dosis de 75 mg/kg de peso corporal, disuelto en solución sa

lina, por vía i.p., una hora previo al sacrificio.

PCA, neurotoxina serotoninérgica, capaz de reducir significativamente sus niveles luego de 2 ó 3 días de administración (145), se inyectó en dosis de 5 mg/kg de peso corporal disuelta en solución salina, por vía i.p., al mediodía, durante 3 días consecutivos.

Los animales control se inyectaron solamente con el vehículo.

En los experimentos en que se estudió el efecto de la administración de LRH sobre la liberación de LH, se utilizaron ratas macho enteras y hembras castradas adultas. Se colocó una cánula de Silastic en la vena yugular externa derecha de animales de 60-70 días de edad, de acuerdo a procedimientos ya descritos por otros autores (215). Esto se realizó 48 horas antes de la recolección de las muestras de sangre. Luego de tomar la muestra basal, se inyectó 100 ng de LRH sintético (Hoechst) dentro de la cánula y se colocó a continuación solución salina conteniendo 500 UI de heparina/ml para evitar la formación de coágulos dentro de la misma. Se cerró el extremo de la cánula con una punta metálica y se sujetó al dorso del animal hasta el comienzo de la recolección de sangre. Las muestras de sangre (300  $\mu$ l), se extrajeron a los 10, 20 y 60 minutos de la administración de LRH. Luego de cada extracción, se colocó igual volumen de solución salina heparinizada

para limpiar la cánula y reemplazar el volumen sanguíneo. Luego de la última extracción se lavó cuidadosamente la cánula con solución heparinizada, permaneciendo colocada para continuar los tratamientos.

Cuatro días después de la inyección de LRH se administró PCA por vía i.p., durante tres días consecutivos en dosis ya descritas. Al día siguiente de la última inyección, se administró nuevamente LRH dentro de la cánula y se extrajeron muestras de sangre según el esquema anterior.

Una vez recogidas todas las muestras de sangre, se separó el suero donde se determinaron los valores de LH por RIA por doble anticuerpo, según la metodología ya descrita (Capítulo 2.A.1.b.).

Los resultados fueron comparados estadísticamente utilizando ANOVA y el test de Tuckey, o en otros casos, el test "t" de Student para muestras apareadas.

### Resultados

La Tabla XIII muestra el efecto de la administración de E<sub>2</sub>-P y 5-HTP sobre la secreción de LH en ratas hembra adultas castradas. Los esteroides sexuales provocaron una liberación significativa de LH que fue totalmente bloqueada por la administración de



TABLA XIII. Efecto de 5-HTP sobre la Liberación de LH por E<sub>2</sub>-P en Ratas Hembra Adultas Ovariectomizadas.

LH (ng/ml)				
CONTROL (A)	5-HTP (B)	E <sub>2</sub> -P (C)	5-HTP +E <sub>2</sub> -P (D)	Valor de p <0.01
465,3±56 (9)	268±58 (9)	2080±470 (9)	613±120 (9)	A vs B A vs C C vs D

Número de determinaciones entre paréntesis.

5-HTP. El 5-HTP redujo significativamente los altos niveles de LH inducidos por la ovariectomía ( $p < 0.01$ ).

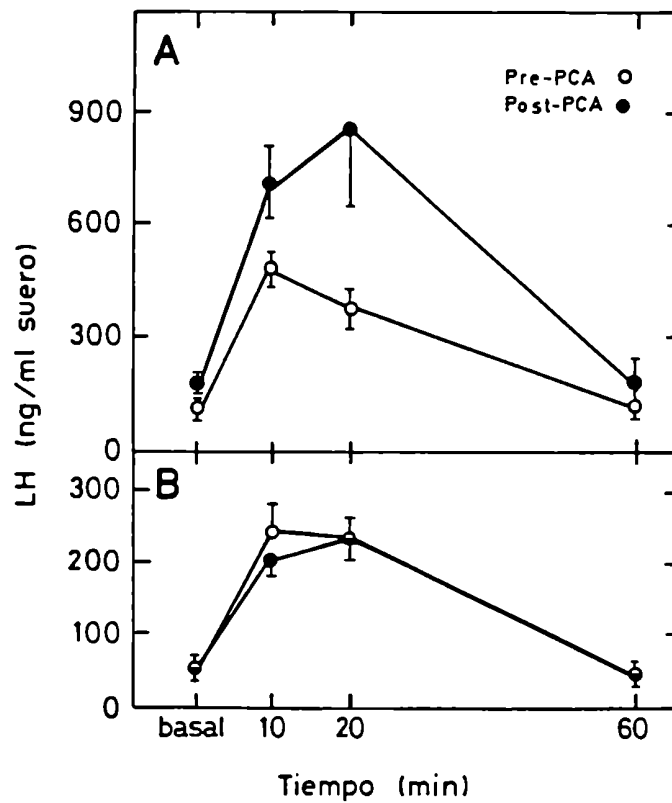
En la Figura 15, se pueden observar los efectos del tratamiento con PCA sobre la liberación de LH en respuesta a la administración de 100 ng de LRH por vía venosa, en ratas macho y hembra adultas. Como se puede observar en la Figura 15A, la administración de PCA provocó un aumento significativo de la liberación de LH en respuesta a LRH en ratas hembra en relación a los valores previos, a los 10 minutos ( $707 \pm 100$  versus  $458 \pm 43$  ng/ml suero, respectivamente) y 20 minutos ( $850 \pm 180$  versus  $335 \pm 45$  ng/ml suero respectivamente) de la administración de LRH.

Contrariamente, no se observan diferencias significativas en la liberación de LH por administración de LRH en ratas macho antes y después del tratamiento con PCA (Figura 15B).

### Discusión

Los resultados obtenidos muestran un efecto inhibitorio ejercido por la administración de 5-HTP en ratas hembra adultas en situaciones en las que existe un incremento significativo de la liberación de LH, como ser, luego de la castración y del tratamiento con esteroides ováricos. Estos hallazgos concuerdan con datos

FIGURA 15. Efecto de la PCA sobre la liberación de LH en respuesta a 100 ng de LRH en ratas hembra castradas (A) y macho normales (B).



Cada punto representa la media de 6 ó 7 determinaciones  $\pm$  error estandard. Las diferencias en A a los 10 y 20 minutos son significativas ( $p < 0.01$ ).

previos sobre el efecto inhibitorio ejercido por el precursor de la serotonina sobre el efecto positivo ejercido por los esteroides sexuales sobre la liberación de LH en hembras prepúberes (ver 2. A.3.), en las que además el tratamiento con PCA adelantó el desarrollo de dicho mecanismo. También se ha descrito un efecto inhibitorio de la serotonina sobre la liberación de LH inducida por la estimulación electroquímica del área POM (216) y sobre la secreción episódica de LH (125,126) en ratas hembra adultas ovariectomizadas.

Los experimentos realizados administrando LRH parecen indicar que el efecto inhibitorio ejercido por el precursor serotoninérgico sobre la liberación de LH inducida por  $E_2$ -P y por la ovariectomía en la rata, está al menos en parte conectado con un efecto inhibitorio del neurotransmisor sobre la respuesta liberadora de LH a la administración de LRH, dado que el pretratamiento con PCA incrementó significativamente la liberación de LH por administración de LRH en estos animales. Este efecto no se observa en las ratas macho, lo que guarda coherencia con aquellos resultados en los que se observó que el precursor serotoninérgico no modifica los niveles de LH en machos prepúberes y con la falta de respuesta liberadora de LH por administración de serotonina en ratas macho adultas (217).

### 2.B.3. ACCION DE LA HIPERPROLACTINEMIA

#### Introducción

En el Capítulo 2.A.5., hemos analizado el efecto de la hiperprolactinemia sobre la secreción de LH en ratas hembra prepúberes.

En este trabajo se estudió el efecto de la hiperprolactinemia inducida por administración de Sulpirida sobre el mecanismo hipotálamo-hipofisario involucrado en el efecto estimulante ejercido por E<sub>2</sub>-P sobre la secreción de LH en ratas hembra adultas ovariectomizadas.

#### Materiales y Método

Se utilizaron ratas hembra de la cepa del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, que crecieron en viveros en las condiciones ya descriptas.

Todos los animales fueron castrados bajo anestesia con éter a los 70 días de edad.

La hiperprolactinemia fue inducida por medio de la administración del antagonista de receptores dopaminérgicos Sulpirida en el agua de bebida, en dosis de 1 g cada 2 litros, comenzando 1 mes

después de la castración y 15 días antes del tratamiento con esteroides.

Tanto los animales control como los tratados con Sulpirida, fueron inyectados con 20 µg/rata de benzoato de estradiol por vía s.c., 76 horas previo al sacrificio y 2 mg/rata de progesterona, por la misma vía, 3 horas previo al sacrificio.

Una vez completados los tratamientos, se sacrificó a los animales por decapitación recogiendo la sangre del tronco, donde una vez retraído el coágulo se separó el suero y se determinaron los niveles de LH y PRL por RIA por doble anticuerpo, según ya se describió anteriormente (Capítulos 2.A.1.b. y 2.A.5.).

Los resultados (en ng/ml de suero) se compararon estadística mente utilizando ANOVA y el test de Tuckey (114,115).

### Resultados

Como puede observarse en la Tabla XIV, la administración de Sulpirida elevó significativamente los niveles de PRL en las ratas hembra castradas. Por otro lado, el tratamiento con esteroides indujo una liberación de PRL en ratas control e hiperprolactinémicas. Consecuentemente, los niveles de PRL en ratas tratadas con Sulpirida y esteroides fueron significativamente mayores que

TABLA XIV. Efecto de la Hiperprolactinemia Inducida  
 por Sulpirida sobre la Secreción de LH en  
 Ratas Hembra Adultas Castradas.

Grupo	LH(ng/ml suero)	PRL(ng/ml suero)
A CONTROL	538,3 ± 40,29 (9)	13,3 ± 2,8 (9)
B E <sub>2</sub> -P	3968,3 ± 653,2 (8)	772,3 ± 86,3 (8)
C SULPIRIDA	672,2 ± 63,2 (7)	286,3 ± 36,3 (7)
D SULPIRIDA + E <sub>2</sub> -P	3725,3 ± 538,2 (8)	3850,2 ± 148,3 (8)
Valor de p	<0.01	<0.01
	A vs B	A vs B
	A vs D	A vs C
	B vs C	A vs D
	C vs D	B vs C
		B vs D
		C vs D

Media ± error estandard. Número de determinaciones  
 entre paréntesis.

en aquellas tratadas solamente con Sulpirida.

La administración de E<sub>2</sub>-P indujo una liberación significativa de LH tanto en ratas control como hiperprolactinémicas, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos.

### Discusión

Estos resultados muestran que la hiperprolactinemia inducida por Sulpirida no modifica el mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides sexuales sobre la secreción de LH en ratas adultas ovariectomizadas.

Una variedad de evidencias indica la existencia de una relación inversa entre la liberación de PRL y de GR en los mamíferos. Por ejemplo, en ratas durante la lactancia post-parto, la PRL sérica se encuentra relativamente alta, mientras que la LH y FSH se hallan bajas (218,219). El estímulo de la lactancia eleva los niveles de PRL pero inhibe los de GR. Cuando se suspende la succión, se produce una caída en los niveles de PRL sérica, aumento de LH y FSH y reaparición de los ciclos estrales.

En mujeres con hiperprolactinemia inducida por Sulpirida, a sí como en pacientes con el síndrome de amenorrea-galactorrea con hiperprolactinemia, se encuentra inhibido o completamente abolido



el mecanismo positivo esteroideo sobre la secreción de LH (220). Teniendo en cuenta que dicho mecanismo opera a nivel hipotalámico, se ha propuesto que el efecto deletéreo de la PRL ocurre a ese nivel (197,220). Sin embargo, es importante tener en cuenta de que también hay evidencias de alteraciones de la función ovárica por acción de los niveles elevados de PRL (198,199).

Las experiencias aquí descritas fueron realizadas en ratas adultas ovariectomizadas, con el fin de determinar el efecto producido por los niveles supranormales de PRL inducidos por administración de Sulpirida, sobre el mecanismo hipotálamo-hipofisario involucrado en el efecto positivo ejercido por estradiol y progesterona sobre la secreción de LH. Nuestros resultados indican que la hiperprolactinemia por Sulpirida no modificó la secreción de LH estimulada por la administración de esteroides sexuales. Estos resultados sostienen el punto de vista de que en la rata, la hiperprolactinemia no afecta el mecanismo de retroalimentación positivo esteroideo.

Quedaría por determinarse si la posible inducción de una secreción ovárica anormal por los niveles elevados de PRL circulante, puede afectar posteriormente los mecanismos hipotalámicos involucrados en la liberación de LH por acción de los esteroides sexuales.



## RESUMEN Y CONCLUSIONES

El desarrollo del control cíclico ejercido por el hipotálamo sobre la secreción de GR hipofisarias (LH y FSH) es consecuencia, en el caso de la rata hembra, de la falta de andrógenos circulantes durante los primeros días de vida postnatal. Este control muestra como característica fundamental al mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por los esteroides gonadales sobre la secreción gonadotrófica, responsable de la ovulación y la conservación de los ciclos sexuales.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis se pueden resumir de la siguiente manera:

1) la administración de estradiol ya sea solo o combinado con progesterona induce una liberación de LH en ratas hembra a partir de los 22 días de edad, indicando que en este momento completan su desarrollo las estructuras nerviosas involucradas en el mecanismo positivo esteroideo sobre la secreción de GR.

Estudiando el efecto producido por la administración de estradiol sobre la incorporación de aminoácidos a proteínas en distintas áreas del hipotálamo de ratas hembra prepúberes, observamos que la hormona indujo un aumento significativo sobre dicho pa

rámetro en el área anterior del hipotálamo a partir de los 15 días de edad. Dada la naturaleza peptídica del factor liberador de LH y FSH, se puede inferir que el estradiol estaría estimulando su síntesis. Este hecho sería un reflejo del desarrollo del mecanismo de retroalimentación positivo ejercido por el estradiol sobre áreas rostrales del hipotálamo de la hembra, donde promovería la síntesis de LRH.

2) la administración de melatonina, principal hormona secretada por la glándula pineal, a ratas hembra adultas, ejerció un efecto bifásico dosis-dependiente sobre la secreción de LH inducida por  $E_2$ -P, siendo la dosis más baja estimulante y la más alta inhibitoria. También observamos que la ablación pineal en hembras prepúberes provocó un adelanto significativo en la madurez del mecanismo de retroalimentación positivo esteroideo. Por el contrario, la administración de melatonina tuvo un efecto inhibitorio sobre el mismo. Esto último indica que la glándula pineal estaría inhibiendo la madurez de los mecanismos nerviosos involucrados en la descarga ovulatoria de LH y por lo tanto el desarrollo puberal de la hembra, probablemente a través de la secreción de melatonina.

3) el estímulo de la vía serotoninérgica mediante la administra

ción del precursor de la serotonina, 5-hidroxitriptofano y su inhibición, mediante el uso de la neurotoxina serotoninérgica paracloroanfetamina, mostraron que existen diferencias sexuales en el efecto producido por el sistema serotoninérgico sobre la secreción de LH en ratas tanto prepúberes como adultas. La administración de 5-HTP estimuló la liberación basal de LH en ratas hembra prepúberes menores de 26 días de edad. La administración de PCA potenció la liberación de LH en respuesta a LRH en hembras adultas. Ninguno de estos efectos fueron observados en ratas macho. Por otro lado, observamos un efecto inhibitorio del precursor serotoninérgico en situaciones de gran incremento de la liberación de LH, como luego de la ovariectomía o la administración de esteroides sexuales. Aparentemente este efecto es ejercido, al menos en parte, a nivel hipofisario, dado que la destrucción de la vía serotoninérgica por administración de PCA potenció la liberación de LH en respuesta a LRH. Sobre esta base, se puede postular que la serotonina posee, en la rata hembra, un rol inhibitorio sobre la secreción de LH. Observamos que la inhibición del desarrollo del control cíclico en la rata hembra, anuló el efecto ejercido por el precursor serotoninérgico en este sexo. Este hecho permite suponer que tal desarrollo involucra a la vez, la aparición de un control de este mecanismo por parte de la serotonina.

4) con el objeto de determinar el efecto ejercido por los péptidos opioides endógenos sobre la madurez del mecanismo de retroalimentación positivo esteroideo sobre la secreción de LH, utilizamos un antagonista de receptores opioides, la Naloxona. Observamos que esa droga elevó significativamente los niveles basales de LH en ratas hembra de distintas edades dentro de la etapa prepube-ral (14, 20 y 25 días). La administración de E<sub>2</sub>-P bloqueó la liberación de LH por acción de la Naloxona a los 14 días de edad, indicando que el efecto de retroalimentación negativo no sería dependiente de la mediación opioide, tal como fuera propuesto por otros grupos. Por otro lado, la administración de Naloxona indujo una aparición precoz del efecto positivo ejercido por los esteroides sexuales sobre la secreción de LH y potenció la liberación de esta hormona por acción de E<sub>2</sub>-P una vez que dicho mecanismo hubo madurado. Ambos hechos muestran la probable existencia de un efecto inhibitorio ejercido por los péptidos opioides endógenos sobre el mecanismo central ovulatorio, que podría estar conectado con la acción regulatoria de estos péptidos sobre el inicio pube-ral de la rata hembra, sugerida por otros trabajos. Nuestros datos también muestran que la liberación de LH en respuesta a Naloxona fue disminuyendo entre los 14 y los 25 días de edad. Esta reducción representa probablemente, una disminución del tono inhibi

torio opioide sobre la secreción de LH que podría estar conectada con la madurez del mecanismo de retroalimentación positivo de los esteroides sexuales sobre la secreción de GR.

5) la hiperprolactinemia inducida por administración de Sulpirida, antagonista de receptores dopaminérgicos, no modificó ni la secreción basal de LH en la rata hembra prepúber ni la edad en la que normalmente se desarrolla el mecanismo positivo esteroideo. Sobre esta base, es probable que la alteración en el inicio puberal provocada por niveles altos de prolactina no esté conectada con modificaciones en el desarrollo de los centros hipotalámicos involucrados en dicho mecanismo. Los estudios realizados en ratas hembra adultas, para determinar el efecto de niveles elevados de prolactina circulantes sobre el mecanismo positivo esteroideo, indican que la hiperprolactinemia por Sulpirida no modificó la liberación de LH por acción de estradiol y progesterona. Por lo tanto, estas observaciones sostienen el punto de vista de que el eje hipotálamo-hipofisario no sería en principio el responsable de las alteraciones en el mecanismo de retroalimentación positivo observadas en estados de hiperprolactinemia en la rata hembra. No puede descartarse a partir de estos experimentos, que sea una secreción ovárica anormal inducida por los altos niveles de prolacti-

na, la que afecte los mecanismos hipotalámicos involucrados en la liberación de LH por acción de los esteroides sexuales.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. J. J.', written below a large black redaction mark.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'E. J. J.', written below a large black redaction mark.





**BIBLIOGRAFIA**

1. SCHALLY A, ARIMURA A and KASTIN A, Research in Reproduction 3: 6, 1971.
2. PALKOVITS M, ARIMURA A, BROWNSTEIN M and SAAVEDRA JM, Endocrinology 95: 554, 1974.
3. KITZER JS, PALKOVITS M and BROWNSTEIN M, Endocrinology 85: 926, 1976.
4. WITKIN J, PADEN C and SILVERMAN A, Neuroendocrinology 35: 429, 1982.
5. MARTINI L, FRASCHINI F and MOTTA M, Rec Prog Horm Res 24: 439, 1968.
6. BOGDANOVE EM, Endocrinology 73: 696, 1963.
7. DROUIN J and LABRIE F, Endocrinology 98: 1528, 1976.
8. MARKIS A and RYAN K, J Endocrinol 96: 694, 1975.
9. CHANNING C, LEWITZ P and RIGBY F, Meth Enzymol 39: 183, 1975.
10. LEE CY, Endocrinology 99: 42, 1976.

11. LEE CY, COULAM CB, JIANG N and RYAN JR, J Clin Endocrinol Metab 36: 148, 1973.
12. TSAFRIRI A, LIDNER HR, ZOR U and LAMPRECHT SA, J Reprod Fert 31: 39, 1972.
13. MOGUILEVSKY JA, FAIGON MR, SCACCHI P and SZWARCFARB B, Neuroendocrinology 29: 323, 1979.
14. YEN SS, LLERENA LA, PEARSON OH and LITTELL AS, J Clin Endocrinol Metab 30: 225, 1970.
15. DE JONG FH and SHARPE RM, Nature 263: 71, 1976.
16. CALIGARIS L, ASTRADA JJ and TALEISNIK S, J Endocrinol 55: 97, 1972.
17. CORBIN A and COHEN A, Endocrinology 78: 41, 1966.
18. DAVID M, FRASCHINI F and MARTINI L, Endocrinology 78: 55, 1966.
19. MOGUILEVSKY JA and CHRISTOT J, Proc Soc Exp Biol Med 143: 260, 1973.
20. GOODMAN R and KARSH F, Endocrinology 107: 1286, 1980.
21. CLARKE I and CUMMINS J, Endocrinology 111: 1737, 1982.

22. DROUVA SV and GALLO RV, *Endocrinology* 99: 651, 1976.
23. COCCHI DF, FRASCHINI F, JALANBO M and MULLER EE, *Endocrinology* 95: 1649, 1974.
24. POHL C and KNOBIL E, *Ann Rev Physiol* 44: 583, 1982.
25. LA BORDE N, CARRIL M, CHEVIAKOFF S, CROXATO HD, PEDROZA E and ROSNER J, *J Clin Endocrinol Metab* 43: 1175, 1976.
26. CARMEL DP, ARAKI S and FERIN M, *Endocrinology* 99: 243, 1976.
27. RAISMAN G and BROWN-GRANT K, *Proc R Soc (London) Ser B* 198: 297, 1977.
28. FLERKO B, "Neuroendocrinology", Martini L and Ganong W, eds, Academic Press, NY 1: 613, 1966.
29. GALLO RV, *Biol Reprod* 24: 771, 1981.
30. CHING M, *Neuroendocrinology* 34: 279, 1982.
31. SHIVERS B, HARLAN R, MORREL J and PFAFF D, *Nature* 304: 345, 1983.
32. BARRACLOUGH C and WISE P, *Endocr Rev* 3: 91, 1982.
33. FUXE K, HOHFELT T, AGNATI L and LOSTROMB J, *Anand Kumar T*

- ed , Karger, Basel p 124, 1976.
34. HERITAGE A, STUMPF W, SAR M and GRANT L, Science 207: 1377, 1980.
  35. SAR M, Science 223: 938, 1984.
  36. SELMANOFF MK, PRAMIK-HOLDAWAY MJ and WEINER RJ, Endocrinology 99: 326, 1976.
  37. HARMS P, OJEDA S and McCANN S, Endocrinology 98: 318, 1976.
  38. OJEDA S, WHEATON J and McCANN S, Neuroendocrinology 17: 283, 1975.
  39. OJEDA S, NEGRO-VILAR A and McCANN S, Endocrinology 104: 617, 1979.
  40. MOORE C and PRIECE D, Am J Anat 50: 13, 1932.
  41. MARTINEZ C and BITTNER J, Proc Soc Biol Med 91: 506, 1956.
  42. LILLIE FR, Science 43: 611, 1916.
  43. LILLIE FR, J Expl Zool 22: 371, 1917.
  44. PFEIFFER CA, Am J Anat 58: 195, 1936.

45. BARRACLOUGH CA, Rec Prog Horm Res 22: 503, 1966.
46. BARRACLOUGH CA, Endocrinology 78: 1053, 1966.
47. GORSKI RA and WAGNER JW, Endocrinology 76: 226, 1965.
48. CRITCHLOW BV, Am J Physiol 195: 171, 1958.
49. BARRACLOUGH CA and GORSKI R, Endocrinology 68: 68, 1961.
50. GORSKI R and BARRACLOUGH C, Endocrinology 73: 210, 1963.
51. TA KASUGI N and BERN H, Proc Soc Exp Biol Med 109: 622, 1962.
52. BARRACLOUGH CA, Am J Anat 97: 493, 1955.
53. HARRIS GW, Endocrinology 75: 627, 1964.
54. OJEDA SR, ANDREWS WW, ADVIS JP and SMITH WHITE S, Endocr Rev 1: 228, 1980.
55. DEBELJUK L, ARIMURA A and SCHALLY A, Endocrinology 90: 1499, 1972.
56. CRITCHLOW Y and BAR SELA M, "Neuroendocrinology", Martini L and Ganong W, eds, Academic Press, NY, p 101, 1967.

57. DÖHLER K and WUTTKE W, *Endocrinology* 94: 1003, 1974.
58. ANDREWS W and OJEDA S, *Endocrinology* 109: 2032, 1981.
59. GERMAIN B, CAMPBELL P and ANDERSON J, *Endocrinology* 103: 1401, 1978.
60. HONMA K, HÖHN K and WUTTKE W, *Brain Res* 77: 277, 1979.
61. WILDT L, MARSHALL G and KNOBIL E, *Science* 207: 1373, 1980.
62. WUTTKE W, HONMA K, LAMBERTS R and HÖHN K, *Fed Proc* 39: 2378, 1980.
63. BLANK M, PANERAI A and FRIESEN H, *Science* 203: 1129, 1979.
64. SARKAR D, SMITH G and FINK G, *Brain Res* 213: 335, 1981.
65. ADVIS J, SIMPKINS J, CHEN H and MEITES J, *Endocrinology* 103: 11, 1978.
66. NAFTOLIN F and BRAWER J, *J Ster Biochem* 8: 339, 1977.
67. KIM K and RAMIREZ V, *Endocrinology* 111: 750, 1982.
68. RAYNAUD J, MERCIER-BODARD C and BAULIEAU E, *Steroids* 18: 767, 1971.

69. ADVIS J, WEINER S and OJEDA S, *Endocrinology* 109: 223, 1981.
70. ANDREWS W, ADVIS J and OJEDA S, *Endocrinology* 109: 2022, 1981.
71. WUTTKE W, DOHLER KA and GELATO M, *J Endocrinol* 68: 391, 1976.
72. ADVIS JP and OJEDA SR, *Endocrinology* 103: 924, 1978.
73. VOOGT JL, CLEMENS JA and MEITES J, *Neuroendocrinology* 4: 157, 1969.
74. VOOGT JL and MEITES J, *Endocrinology* 88: 286, 1971.
75. ADVIS J, SMITH-WHITE S and OJEDA S, *Endocrinology* 108: 1343, 1981.
76. EVERET JW, *Physiol Rev* 44: 373, 1964.
77. EVERET JW, *Ann Rev Physiol* 31: 383, 1969.
78. MOGUILVSKY JA and SCACCHI P, *J Endocrinol* 51: 219, 1971.
79. LOWRY O, ROSEBROUGH N, FARR A and RANDALL R, *J Biol Chem* 193: 265, 1951.



80. MARTINI L and GANONG W, eds, "Neuroendocrinology", Academic Press, NY, 1966.
81. NISWENDER G, MIDGLEY A, MONROE S and REICHERT L, Proc Soc Exp Biol Med 128: 807, 1968.
82. GEENWOOD F, HUNTER W and GLOVER J, Biochem J 89: 114, 1963.
83. LERNER A, CASE J, TAKAHASHI Y, LEE T and MORI W, Am Chem Soc Biol 80: 2587, 1958.
84. CARDINALI D, NAGLE C and ROSNER J, Endocrinology 95: 179, 1974.
85. AXELROD J, Science 184: 1341, 1974.
86. CARDINALI D and WURTMAN R, Endocrinology 91: 247, 1972.
87. OZAKI Y and LYNCH H, Endocrinology 99: 641, 1977.
88. BUBENIK G, PURTILL R, BROWN G and GROTA L, "The Pineal gland", Reiter R and Wurtman R, eds, Springer Verlag, Viena, p 357, 1978.
89. CARDINALI D and WURTMAN R, "Methods in Enzymology", O'Malley B and Hardman J, eds, Academic Press, NY, 39: 136, 1975.

90. CARDINALI D, RITTA M, SPEZIALE N and GIMENO M,  
Prostaglandins 18: 577, 1979.
91. HELDUNG L, LISCHKO M, ROLLAG M and NISWENDER G, Science  
195: 686, 1977.
92. CARDINALI DP, "Progress in Animal Biometeorology",  
Amsterdam, p 676, 1976.
93. CARDINALI DP, Neuroendocrinology 24: 333, 1977.
94. CARDINALI D and VACAS M, J Neural Transm 42: 193, 1978.
95. PAVEL S, "The Pineal Gland", Nir I, Wurtman R and  
Reiter R, eds, Springer Verlag, Viena, p 135, 1978.
96. REITER RJ (ed), "The Pineal and Reproduction", Karger S,  
Basilea, 1978.
97. RELKIN R, Endocrinology 88: 415, 1971.
98. DUNAWAY JE, Neuroendocrinology 5: 218, 1969.
99. CARDINALI DP, "Current Topics in Experimental  
Endocrinology", James J and Martini L, eds, 2: 107, 1974.
100. COLLU R, FRASCHINI F and MARTINI L, J Endocrinol 50:  
679, 1971.

101. REITER RJ, "The Pineal", Eden Press, Montreal, 1977.
102. RELKIN R, "The Pineal", Eden Press, Montreal, 1976.
103. DEBELJUK L, FEDER V and PAOLUCCI O, J Reprod Fertil 21: 363, 1970.
104. FRASCHINI F, COLLU R and MARTINI L, "The Pineal Gland", Welstenholme and Knight eds, Churchill, London, p 259, 1971.
105. KAMBERI IA, Prog Brain Res 39: 261, 1973.
106. MARTIN JA, ENGEL JM and KLEIN DC, Endocrinology 100: 675, 1977.
107. EBELS I and PROP N, Acta Endocrinol 49: 567, 1965.
108. FISKE V and HUPPERT L, Science 162: 279, 1978.
109. FREIRE F and CARDINALI D, J Neurol Transm 37: 237, 1975.
110. TAMARKIN L, REPERT SM, ORLOFF DJ, KLEIN DC, YELLON SM and GOLDMAN BD, Endocrinology 107: 1061, 1980.
111. KINCL FA and BENANGIANO B, Acta Endocrinol 54: 189, 1974.
112. REITER RJ, BLASK DE, JOHNSON LY, RUDEEN PK, VAUGHAN MK

- and WARING PJ, *Neuroendocrinology* 22: 107, 1976.
113. REITER RJ, *Endocr Rev* 1: 105, 1980.
114. SNEDECOR GW and COCHRAN WG, *Iowa State University Press, Iowa*, p 593, 1967.
115. TUCKEY JW, *Biometrics* 5: 99, 1949.
116. MARTIN J and SATTIER C, *Endocrinology* 105: 1007, 1979.
117. BENSON B, *Neuroendocrinology* 24: 241, 1977.
118. PALKOVITS S, SAAVEDRA J, JACOBOBIWITZ D, KIZER J, ZABORSKY L and BROWNSTEIN M, *Brain Res* 130: 121, 1977.
119. SAAVEDRA J, PALKOVITS M, BROWNSTEIN M and AXELROD J, *Brain Res* 77: 157, 1974.
120. WEINER RI, *Prog Brain Res* 39: 165, 1973.
121. BROWNSTEIN M, PALKOVITS M, TAPEZ J, SAAVEDRA J and KIZER J, *Brain Res* 117: 287, 1976.
122. FUXE K and UNGERSTEDT U, *Histochemie* 13: 16, 1968.
123. PILOTTE N and PORTER J, *Endocrinology* 105: 875, 1979.
124. SCHNEIDER H and McCANN S, *Endocrinology* 86: 1127, 1970.

125. ARENDASH G and GALLO R, *Endocrinology* 102: 1199, 1978.
126. GALLO R and MOBERG G, *Endocrinology* 100: 945, 1977.
127. GALLO R and OSLAND R, *Endocrinology* 99: 659, 1976.
128. HERY M, LAPLANTE E and KORDON C, *Endocrinology* 99: 496, 1976.
129. LABHSETWAR A, *J Endocrinol* 99: 269, 1972.
130. O'STEEN W, *Endocrinology* 77: 937, 1965.
131. KORDON C and GLOWINSKI J, *Neuropharmacology* 11: 153, 1972.
132. VITALE M, PARISI M, CHIOCCHIO S and TRAMEZZANI J, *J Neuroendocrinol* 39: 136, 1984.
133. CALAS A and ALONSO G, *Nature* 250: 241, 1974.
134. JOHNS M, AZMITIA E and KRIEGER O, *Endocrinology* 110: 754, 1982.
135. WESTLUND K and CHILDS G, *Endocrinology* 111: 1761, 1982.
136. LADOSKY W and NORONHA J, *J Endocrinol* 62: 677, 1974.
137. QUAY W, *Am J Physiol* 214: 1448, 1968.

138. COEN C and MACHINNON P, J Endocrinol 84: 231, 1980.
139. WALKER FR, Neuroendocrinology 36: 468, 1983.
140. CARRER H and TALEISNIK S, J Endocrinol 48: 527, 1970.
141. WALOCH M, GILMAN D, WHITMOYER D and SAWYER C, Brain Res 217: 305, 1981.
142. HERY M, LAPLANTE E and KORDON C, Endocrinology 102: 1019, 1978.
143. BAROFSKY A, J Endocrinol 66: 285, 1975.
144. COEN C, COOMBS M, WILSON P, CLEMENTE E and MACKINNON P, Neuroscience 8: 583, 1983.
145. SANDERS-BUSH E and STERANKA L, Ann NY Acad Sci 305: 208, 1978.
146. CHEN H, SYLVESTER P, IEIRI T and MEITES J, Endocrinology 108: 948, 1981.
147. REINHARD J and ROTH R, J Pharmacol Exp Ther 221: 541, 1982.
148. MOGUILEVSKY J, TRIFARO J, FOGLIA V and SCHIAFFINI O, Am J Physiol 207: 733, 1964.

149. SCACCHI P and MOGUILEVSKY JA, *Experientia* 29: 876, 1973.
150. MOGUILEVSKY JA, SCACCHI P, DEIS R and SISELES NO, *Proc Soc Exp Biol Med* 151: 663, 1976.
151. GIULIAN D, POHORECKY L and Mc EWEN B, *Endocrinology* 93: 1329, 1973.
152. LADOSKY W and GAZIRI L, *Neuroendocrinology* 6: 168, 1970.
153. GORSKI RA, "Frontiers in Neuroendocrinology", Martini L and Ganong W, eds, Oxford Univ Press, NY, 2: 237, 1971.
154. BARRACLOUGH CA, "Neuroendocrinology", Martini L and Ganong W, eds, Academic Press, NY, 2: 61, 1967.
155. KALRA SP, "Opioid Peptides. Inhibitory Neuronal Systems in Regulation of GR Secretion. Role of Peptides and Proteins in Control of Reproduction", McCann S and Dhindsa D, eds, Elsevier Biomedical, NY, p 63, 1983.
156. WATSON S, AKILL H and WALKER J, *Peptides* 1: 11, 1980.
157. KATO Y, HIROTO S, KATAKAMI H, MATSUSHITA N, SHIMATSU A and IMURA H, *Proc Soc Exp Biol Med* 169: 95, 1982.
158. GOLDSTEIN A and GHAZAROSSIAN V, *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6207, 1980.

159. MAY P, MITTLER J and ERTEL N, Horm Res 10: 57, 1979.
160. MEITES J, BRUNI J, VAN VUGT D and SMITH A, Life Sci 24: 1325, 1979.
161. KALRA S and SIMPKINS J, Endocrinology 109: 776, 1981.
162. GABRIEL S, SIMPKINS J and KALRA S, Endocrinology 113: 1806, 1983.
163. KALRA SP, Endocrinology 109: 1805, 1981.
164. JOHNSON J, MAUGHAN G and ANDERHUB L, Life Sci 30: 1473, 1982.
165. SYLVESTER P, VAN VUGT D, AYLSWORTH C, HANSEN E and MEITES J, Neuroendocrinology 34: 269, 1982.
166. WILKES M and YEN S, Life Sci 28: 2355, 1981.
167. BARDEN N, MERAND Y, ROULEAU D, GARON M and DUPONT A, Brain Res 204: 441, 1981.
168. DUPONT A, BARDEN N, CUSAN L, MERAND Y, LABRIE F and VAUDRY H, Fed Proc 39: 2544, 1980.
169. CHING M, Endocrinology 112: 2209, 1983.
170. ADLER B and CROWLEY W, Neuroendocrinology 38: 248, 1984.



171. KALRA S and GALLO R, *Endocrinology* 113: 23, 1983.
172. SIMPKINS J, KALRA P and KALRA S, *Endocrinology* 107: 573, 1980.
173. SIRINATHSINGHJI D, MOTTA M and MARTINI L, *J Endocrinol* 104: 299, 1985.
174. RAMIREZ V and McCANN S, *Endocrinology* 72: 452, 1963.
175. BHANOT R and WILKINSON M, *Endocrinology* 113: 596, 1983 a.
176. BHANOT R and WILKINSON M, *Endocrinology* 112: 399, 1983.
177. SYLVESTER P, SARKAR D, BRISKI K and MEITES J, *Neuroendocrinology* 40: 165, 1985.
178. LEONG D, FRAWLEY L and NEILL J, *Ann Rev Physiol* 45: 109, 1983.
179. FUXE K and HÖKFELT T, *Acta Physiol Scand* 66: 245, 1966.
180. LEBLANC H, LACHELIN C, ABU-FADIL S and YEN S, *J Clin Endocrinol Metab* 113: 668, 1976.
181. CHEUNG C and WEINER R, *Endocrinology* 102: 1614, 1978.
182. CRONIN M, CHEUNG C, WILSON C, JAFFE R and WEINER R, *J*

Clin Endocrinol Metab 50: 387, 1980.

183. HÖKFELT T and FUXE K, Neuroendocrinology 9: 100, 1972.
184. CLEMENS J, SAWYER B and CERIMELE B, Endocrinology 100: 692, 1977.
185. VAN DE KAR L and BETHEA C, Neuroendocrinology 35: 225, 1982.
186. VAN VUGT D and MEITES J, Fed Proc 39: 2533, 1980.
187. LIBERTUN C and McCANN S, Neuroendocrinology 20: 110, 1976.
188. CARLSON H and IPPOLITI A, J Clin Endocrinol Metab 45: 367, 1977.
189. SASSIN J, FRANTZ A and WEITZMAN E, Science 177: 1205, 1972.
190. JAFFE R, HO YUEN B and KEYE W, Am J Obstet Gynecol 117: 757, 1971.
191. NEILL J, FREEMAN M and TILLSON S, Endocrinology 89: 1448, 1971.
192. CHEN C, Endocrinology 86: 503, 1970.

193. RAYNAUD V, BEAULIEU M, LABRIE F and BOISSIER J, Science 200: 1173, 1978.
194. RAKOFF J and YEN S, J Clin Endocrinol Metab 47: 918, 1978.
195. MEITES J, LU KH, GRANDISON L and SIMPKINS J, "Development in Endocrinology", Robin C and Harter M, eds, Elsevier North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, p 149, 1978.
196. BOHNET HG, DAHLEN HG, WUTTKE W and SCHNEIDER HP, J clin Endocrinol Metab 42: 132, 1975.
197. AONO T, MIYAKE A, KIMUGASA T, ONISHI T and KURACHI K, J Clin Endocrinol Metab 42: 696, 1976.
198. ZARATE E, CANALES E, SORIA J, RUIZ F and Mac GREGOR C, Am J Obstet Gynecol 112: 1130, 1972.
199. DEL POZO E, SCHULZ K, WYSS H, LANCRAJAN I and BRAUN P, "Progress in Prolactin Physiology and Pathology", Dobey C and Harter M, eds, Elsevier North Holland, Amsterdam, p 281, 1978.
200. CLEMENS JA, MINAGUCHI H, VOOGT JL and MEITES J, Neuroendocrinology 4: 150, 1969.
201. DELVOYE P, TAUBERT HD, JURGENSEN O, L'HERMITE M, DELOGNE

- J and ROBYN C, CR Acad Sci (D) Paris 279: 1463, 1974.
202. HOROWSKI R and GRAFF KJ, Neuroendocrinology 22: 273, 1976.
203. DOHLER KA and WUTTKE W, Endocrinology 97: 898, 1975.
204. MOGUILLEVSKY JA, SCACCHI P, EPSTEIN Y and LUNENFELD B, Neuroendocrinology 26: 65, 1978.
205. OJEDA SR and McCANN SM, Endocrinology 95: 1499, 1974.
206. NICOLL CS and MEITES J, Endocrinology 70: 272, 1962.
207. LABRIE F, BEALIEU M, CARON MG and RAYNOND V, "Progress in Prolactin Physiology and Pathology", Robyn C and Harter M, eds, Elsevier North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, 2: 121, 1978.
208. Mc LEOD RM and ROBYN C, J Endocrinol 72: 273, 1977.
209. LAVILLE C, Lille Med 17 (Suppl) 1: 4, 1972.
210. CHEESMAN D, OSLAND R and FORSHMAN P, Endocrinology 101: 1194, 1977.
211. ANTON-TAY F and WURTMAN R, Nature 221: 474, 1969.
212. CARDINALI D, HYYPA M and WURTMAN R, Neuroendocrinology

12: 30, 1973.

213. CARDINALI D, VACAS M and BOYER E, *Endocrinology* 105: 437, 1979.
214. KAO L and WEISZ J, *Endocrinology* 100: 1723, 1977.
215. HARMS P and OJEDA S, *J Appl Physiol* 36: 391, 1974.
216. CRAMER O and BARRACLOUGH C, *Endocrinology* 103: 694, 1978.
217. BECU D and LIBERTUN C, *Endocrinology* 113: 1083, 1983.
218. MEITES J, "Neuroendocrinology", Martini L and Ganong W, eds, Academic Press, NY, 2: 66, 1966.
219. MEITES J, *J Invest Reumatol* 63: 119, 1974.
220. GLASS M, SHAW R, BUTT R, LOGAN-EDWARDS R and LONDON D, *Br Med J* 3: 274, 1975.