

Tesis de Posgrado

Secreción de tirotrófina : Participación de los estrógenos y del factor de crecimiento epidérmico

Altschuler, Laura Ruth.

1990

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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Altschuler, Laura Ruth.. (1990). Secreción de tirotrófina : Participación de los estrógenos y del factor de crecimiento epidérmico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2365_Altschuler.pdf

Cita tipo Chicago:

Altschuler, Laura Ruth.. "Secreción de tirotrófina : Participación de los estrógenos y del factor de crecimiento epidérmico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2365_Altschuler.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

SECRECION DE TIROTROFINA:
PARTICIPACION DE LOS ESTROGENOS
Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO

LAURA RUTH ALTSCHULER

DIRECTOR:

DR. ANGEL ZANINOVICH

CO-DIRECTOR:

DR. OSVALDO FRIDMAN

LUGAR DE TRABAJO:

HOSPITAL DE CLINICAS

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

1990

- 2365 -
y.2

INDICE

| | | |
|----|--|-----|
| 1. | CONOCIMIENTOS PRELIMINARES | 5 |
| 2. | OBJETIVOS | 34 |
| 3. | MATERIALES Y METODOS | 36 |
| 4. | MODIFICACION DE LOS PARAMETROS TIROIDEOS POR LOS ESTROGENOS | 54 |
| 5. | MODIFICACION DE LOS PARAMETROS TIROIDEOS POR EL EGF | 76 |
| 6. | CONCLUSION | 91 |
| 7. | ABREVIATURAS | 93 |
| 8. | BIBLIOGRAFIA | 95 |
| 9. | INDICE GENERAL | 122 |

AGRADECIMIENTOS

- Al Doctor Angel Zaminovich por su desinteresado apoyo al desarrollo de las investigaciones.
- A "Los Angeles de Zanino"; Silvana, Olga, Laura y Mary, por estar.
- A las autoridades del Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas, por brindarme un lugar para investigar.
- Al Doctor Osvaldo Fridman por su asesoramiento.
- Al CONICET por otorgarme las becas.
- A todos los que, sin querer o queriendo, influyeron en mi vida personal o profesional.
- A los viejos por contar casi incondicionalmente con ellos, a Sergi, a Nanu, a Caru porque los amo.

1. CONOCIMIENTOS PRELIMINARES

La tirotrófina (TSH) es una hormona glicoproteica con un peso molecular estimado en 28000. Su función fundamental es regular la secreción de las hormonas tiroideas, si bien también tiene un importante rol en el control de una gran variedad de procesos metabólicos incluyendo síntesis proteica, metabolismo de carbohidratos, termogénesis y crecimiento celular. La TSH es tá compuesta por dos subunidades glicosiladas unidas en forma no covalente (1): la subunidad α y la β . Ambas subunidades libres son biológicamente inactivas (2 y 3); aunque hoy sabemos que es la subunidad β la que confiere la especificidad biológica e inmunológica a la molécula de TSH.

1.1. SINTESIS DE TSH:

La TSH es sintetizada y secretada por las células basófilas (tirotropos) de la hipófisis anterior. En la Figura 1 se esquematiza la síntesis de TSH en tirotropo. ARN mensajeros separados traducen las subunidades α y β . Luego son agregados oligosacáridos preformados a los residuos de asparagina. Las subunidades α y β son entonces unidas constituyendo un complejo lábil y por último se origina el dímero activo estable el cual es almacenado en el gránulo secretorio.

En cuanto a su mecanismo de acción en su fase inicial la TSH se comporta como las demás hormonas proteicas uniéndose a un receptor específico en la membrana celular (4-6). Se ha su-

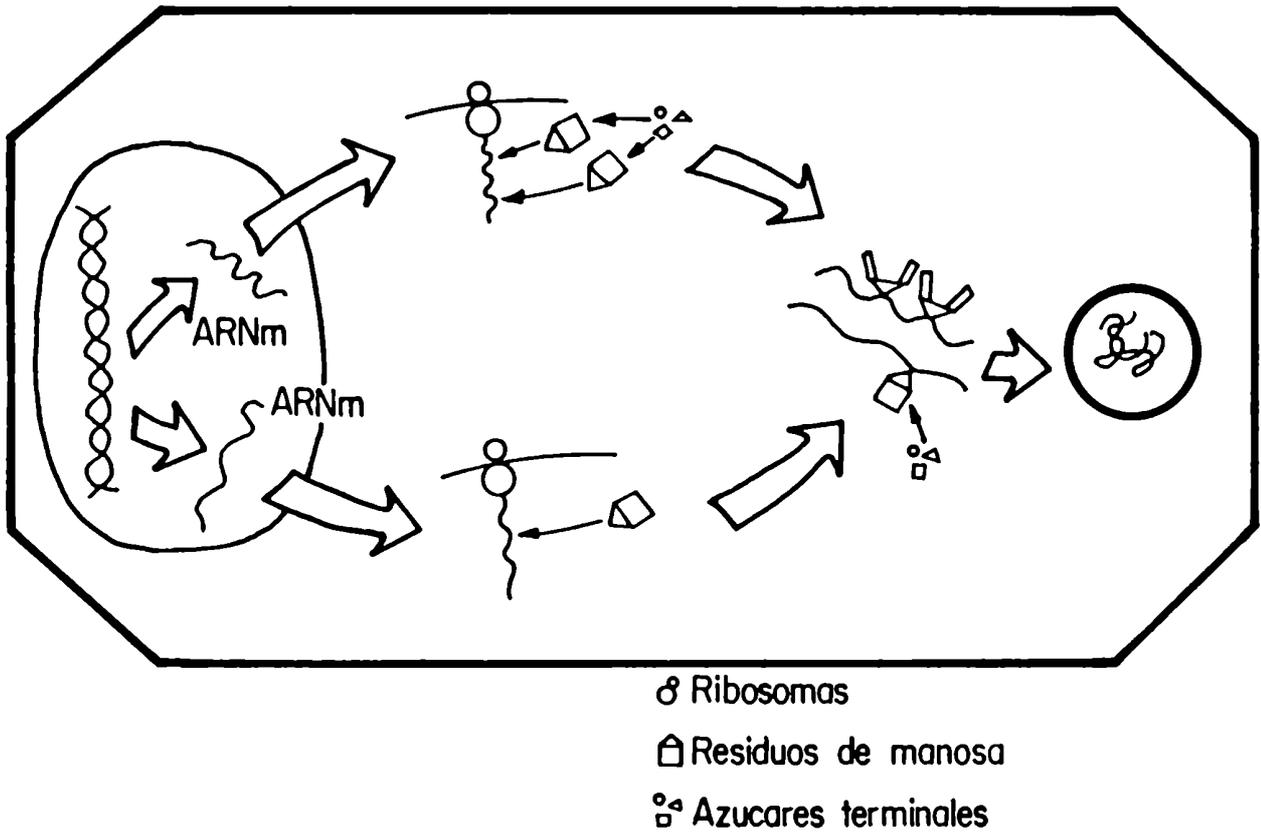


Figura 1. Síntesis de TSH

gerido que existen dos tipos de sitios de unión de alta afinidad y baja capacidad con una constante de asociación (K_a) del orden de 10^{10} - 10^8 M^{-1} y de baja afinidad y de alta capacidad, del orden de 10^7 - 10^6 M^{-1} (7 y 8). En 1961 De Robertis (9) demostró por primera vez que la TSH puede entrar a la célula tiroídea. La demostración nos permite pensar en la existencia de otros receptores para la TSH además de los observados a nivel de membrana.

Como consecuencia de la interacción con su receptor, la tirotrofina estimula la adnilatociclasa que cataliza la formación de AMP a partir de ATP (10) implica que el primer mensajero es la hormona (TSH) que actúa sobre determinado tipo de células (tiroideas). Dicha célula "reconoce" a la molécula hormonal a través de receptores específicos existentes en su periferia. Una vez que la hormona se une a esos receptores, estimula la síntesis del AMP cíclico. Este compuesto actúa a su vez, como segundo mensajero entre la cara interna de la membrana celular y el resto de las estructuras celulares. En estas últimas determina cambios drásticos en la actividad de enzimas claves de diferentes caminos metabólicos.

1.2. REGULACION

El lóbulo anterior de la hipófisis a través de la TSH estimula la función tiroidea. La tiroides a su vez, por medio

de sus hormonas triiodotironina (T3) y tiroxina (T4) frena la síntesis y secreción de TSH. La función de la TSH también es regulada por el hipotálamo a través de la hormona liberadora de TSH (Figura 2).

Además, aunque con resultados controvertidos, existen evidencias que indican que las hormonas tiroideas no sólo afectan la fisiología pituitaria, sino también pueden modificar directamente la secreción de TRH a nivel hipotalámico.

TRH (piroglutamil-histirilil-prolinamida) es sintetizado por neuronas peptidérgicas en los núcleos supraópticos y paraventricular del hipotálamo. Luego el TRH entra al sistema porta-hipofisario y es llevado a las células de la hipófisis anterior. Tanto mamotropos (secretoras de PRL) como tirotropos (secretoras de TSH) contienen receptores específicos para TRH, el cual una vez unido a su receptor hipofisario provoca la estimulación de la adenilatoclasa, dando como resultado un aumento del TRH, la secreción de TSH es rápidamente estimulada, seguida de una síntesis tirotrófica incrementada.

1.3. ACCIONES DE LA TSH:

Las acciones de la TSH se podrían clasificar en efectos rápidos que requieren pocos minutos para su manifestación: estimulación de la secreción, organificación del yodo, acoplamiento de yodotirosinas, respiración mitocondrial, etc.

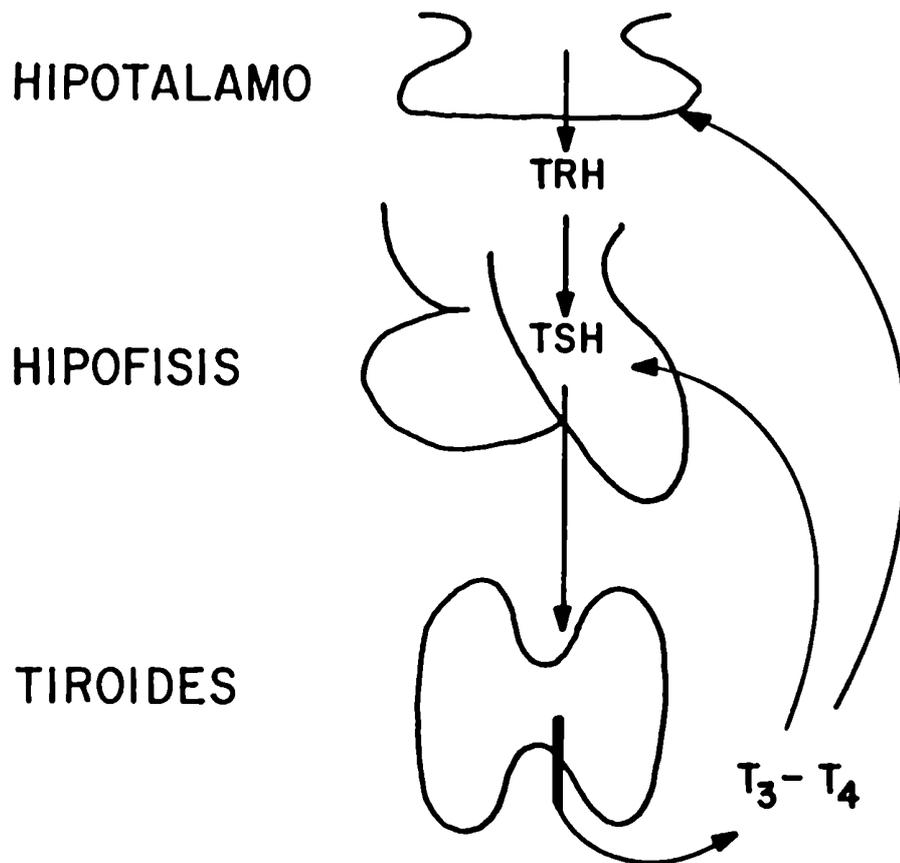


Figura 2. Regulación de la síntesis y secreción de TSH por retroalimentación.

y efectos lentos que evidencian a las horas e incluso días, relacionados principalmente con el crecimiento celular y diferenciación celular.

La TSH regula prácticamente todos los metabolismos tiroideos (11 y 12).

a) METABOLISMO DEL YODO:

Uno de los efectos agudos de la TSH sobre el metabolismo del yodo es la estimulación de la relación I tiroides/I suero, debido a un aumento del flujo del yodo desde la célula tiroidea, como consecuencia de un aumento en la permeabilidad de la membrana (13 y 14).

Luego de algunas horas, el efecto se revierte observándose una estimulación sobre el transporte de yodo (15 y 16).

b) METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

El aporte de la adenosintrifosfato en la célula tiroidea proviene de la fosforilación oxidativa mitocondrial y de la glicólisis aeróbica.

Debido a que el contenido de glucógeno en la tiroides es escaso, necesita el aporte exógeno de glucosa (17). La TSH aumenta la captación de glucosa, no estando aclarado si aumenta su oxidación (18).

Un porcentaje de la glucosa captada, es incorporado a proteínas (6%), debiéndose probablemente a que la proteína, que es sintetizada en mayor proporción es la tiroglobulina, la cual contiene un 10% de carbohidratos.

La TSH disminuye la incorporación de glucosa a proteínas probablemente debido a una degradación de la tiroglobina y aumenta la actividad del ciclo de las pentosas. Este último paso aporta NADPH que estaría involucrado en la generación de $H_2 O_2$ necesaria para la yodinación de la tiroglobulina (19).

c) METABOLISMO DE LIPIDOS:

La TSH estimula la incorporación de precursores a fosfolípidos, no dependiendo estos efectos de la síntesis proteica (20).

Esta estimulación se debe a dos efectos: a un aumento en el recambio y a una síntesis neta (21).

Estos efectos se pueden observar a los pocos minutos de agregar la TSH, y no estarían mediados por AMPc.

El agregado de bloqueantes adrenérgicos que inhiben la estimulación de la adenilatociclasa por parte de la TSH, no abuelen los efectos de la hormona sobre la síntesis de fosfolípidos; más aún estos efectos no son reproducidos por la PGE_1 y la teofilina que aumentan los niveles de AMPc Gerard y col., 1982 (22) trabajando con células de tiroides porci-

nas en cultivo, encontraron que el AMPc podría ser el mediador de los efectos crónicos de la TSH.

La síntesis de prostaglandinas también está aumentada por el agregado de TSH (23 y 24) acción que estaría dada por un aumento de los niveles del ácido araquidónico proveniente del fosfatidilinositol, por un mecanismo independiente de AMPc o proveniente de triglicéridos, efecto éste diado por AMPc (25).

Trabajos recientes cuestionan la participación de la TSH en la síntesis de prostaglandinas (26).

d) METABOLISMO DE LAS PROTEINAS:

Si bien existe una síntesis de aminácidos, a partir de intermediarios del metabolismo de la glucosa y del ciclo de Krebs, el mayor aporte es a través del "pool" exógeno de aminoácidos, siendo estimulada esta entrada por la TSH (27).

Entre otros parámetros, la TSH estimula la hidrólisis de tiroglobulina y la incorporación de ^{14}C -leucina y ^{14}C -tirosina a tiroglobulina y proteínas no yodadas.(28).

La TSH aumenta también la agregación de polisomas durante la traducción. Algunos de estos efectos son independientes de una acción de la TSH sobre la síntesis de ARN (28).

El AMPc sería el mediador de estas acciones. Este nucleótido reproduce los efectos de la TSH en la estimulación de la síntesis proteica (29 y 30).

e) METABOLISMO DE ACIDOS NUCLEICOS:

La TSH estimula la incorporación de precursores a ARN, aunque esto sería como consecuencia de un aumento en el "pool" de ribonucleótidos (31). Sin embargo existen evidencias de un efecto directo de la TSH sobre la transcripción. En núcleos de tejidos pretratados con TSH, se encontró un aumento en la actividad de la ARN polimerasa (32) así como la incorporación de UTP a ARN (33).

El AMPc reproduce los efectos de la TSH sobre la incorporación de precursores a ARN (34 y 35); y sobre la ARN polimerasa (32).

Si bien se está de acuerdo que el AMPc sería el mediador de la TSH en la inducción de fenómenos de diferenciación, no está claro aún su posible rol en los diferentes procesos de crecimiento celular. El db AMPc no reproduce los efectos mitogénicos de la TSH, ni aumenta la síntesis de ARN en cultivos celulares (36).

La célula tiroidea posee un mecanismo de tipo "autorregulatorio" para modular la respuesta de la tirotrófina.

Se ha demostrado que la exposición a la TSH hace a la glándula refractaria a una segunda estimulación por parte de TSH (37). Se han encontrado dos tipos de mecanismos de desensibilización.

Uno involucra el sistema AC-AMPC y es específico por cuanto la preincubación con TSH no modifica la estimulación en la formación del AMPC producido por prostaglandinas E_1 , ni por la toxina del cólera (37 y 38). El otro sistema sería distal a la formación del AMPC y es no específico, pues durante el período de refractoriedad inducido por la TSH disminuyen los efectos estimulatorios del AMPC, PGE_1 y acetilcolina sobre diferentes parámetros, como por ejemplo: oxidación de glucosa, organificación del yoduro, incorporación de ^{32}P a fosfolípidos (39 y 40).

El mecanismo por el cual las hormonas tiroideas inhiben la producción de TSH y por tanto antagonizan la acción del TRH aún no está bien establecido. El punto crítico de esta incertidumbre sería tal vez cómo las hormonas tiroideas regulan por retroalimentación la glándula hipófisis y cuál de éstas es más importante en este sentido. Observaciones en pacientes (41) marcan una relación más estrecha entre los niveles séricos de TSH y la concentración sérica de T_4 más que la de T_3 (42). Una presumible respuesta a esta cuestión está dada por la demostración que el tejido hipofisario convierte activamente T_4 a T_3 (43) y, por el hecho que la T_3 proveniente de esta fuente juega un rol más importante junto con la T_3 plasmática, en la regulación de la liberación de TSH (44). Esta conclusión está sostenida empíricamente ya que Sterling, 1979 (45) y Obregon y col. 1980 (46) demostraron un agudo aumento en la secreción de TSH por PTU, y IOP, ambos componentes inhiben la neogénesis de T_3 .

Es decir que sumado al efecto del TRH, tres factores pueden garantizar un determinado nivel de secreción de TSH: a) la tasa de secreción de T_4 por la glándula tiroidea; b) el nivel circulatorio de T_3 generado por conversión periférica de T_4 a T_3 , y c) la tasa de conversión de T_4 a T_3 dentro de la misma hipófisis.

1.4. FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA REGULACION DE LA SECRECION DE TSH

1.4.1. ESTROGENOS

Una de las características de un órgano efector para esteroides es su capacidad para retener específicamente la hormona. Originalmente, este concepto se derivó del grupo de la Universidad de Chicago quien inyectando 3H estradiol a ratas, comprobó, que el cabo de dos horas, la radioactividad quedaba circunscripta principalmente al útero y la vagina.

La presencia de receptores citoplasmático y nuclear para E_2 se ha descripto en varios tejidos, además de útero y vagina, como mama, hipotálamo, hipófisis, testículos, epidídimo, etc.

El estrógeno que se liga más efectivamente es el $17-\beta-E_2$, aunque también se ha demostrado que la estrona y el estriol son capaces de unir de manera específica y sin convertirse a E_2 (47).

Las hormonas esteroideas, cualquiera sea su origen, una vez secretadas por las diversas glándulas actuarán en determinados tejidos donde ejercerán su influencia de manera altamente selectiva. Para que esta acción tenga lugar los esteroides deben como primer requisito, penetrar la membrana celular y alcanzar el citoplasma de las células de los órganos efectores (48) donde un muy reducido número de moléculas de la hormona, o compuestos derivados de la misma, interactuarán con ciertos componentes de estos, los receptores, los cuales poseen la característica de presentar una afinidad muy elevada para la hormona en cuestión y muy baja afinidad para otros esteroides con diferente actividad biológica (49). Jensen y col(*) han hecho una gran contribución al estudio de la acción hormonal cuando sintetizaron estradiol-(³H) con una muy alta radioactividad específica. Gracias a ello, se hizo posible observar la acumulación y retención diferencial del estradiol-(³H) por el útero, vagina, hipófisis y otros órganos "blanco" (51-53).

a.1. UNION DE LOS ESTEROIDES EN SANGRE:

Los esteroides sexuales unen muchas de las macromoléculas que se encuentran en la sangre, la afinidad de estas moléculas para esteroides varía de muy débil ($K_d = 10^{-3}$ M) a muy fuerte ($K_d = 10^{-10} - 10^{-8}$ M) y están frecuentemente presentes en altas concentraciones (54). De manera que estas proteínas pueden restringir la cantidad de hormona libre aprovechable para su unión al receptor y ser importante en el con-

(*) 1962 (50)

trol de la acción de la hormona esteroidea.

b.1. METABOLISMO E INTERACCIONES DEL ESTEROIDE CON EL TEJIDO:

La cantidad de esteroide capaz de unirse al receptor in vivo depende no sólo de las relaciones de "binding" en circulación sino además, de la tasa metabólica y de excreción de la hormona. Como por ejemplo, una rápida tasa de clearance metabólico MER , reducirá el tiempo de exposición de la hormona a su receptor, mientras que un MCR lento aumentará el tiempo de exposición.

En el caso de los estrógenos y progesterona, su actividad biológica no dependerá de la conversión metabólica (50 y 55). Los complejos esteroide-receptor son teóricamente formados después que el esteroide entra a la célula. Sin embargo no podemos asumir en todos los casos que el metabolismo no es importante, ya que se ha observado que la conversión de testosterona a dihidrotestosterona es un requisito para la acción del animal macho (56 y 57).

c.1. CAPTACION DEL ESTEROIDE POR LAS CELULAS:

La entrada del esteroide dentro de las células del espacio extracelular, parece ocurrir por difusión. Gurpide y col, 1969 (58) han demostrado que gran número de esteroides entran a la célula "blanco" y a la célula "no blanco, con igual faci-

lidad a una velocidad directamente proporcional a la concentración del esteroide por encima de un rango entre 0,2 y 5 ng/ml. Si bien estos resultados no eliminan la posibilidad de un proceso mediado por "carrier", estos autores lo han interpretado en términos de una difusión simple.

d.1. UNION DEL ESTEROIDE-RECEPTOR EN EL CITOPLASMA:

Una vez que el esteroide entra a la célula "blanco", puede unirse al receptor citoplasmático, Rc, para formar un complejo hormona - receptor o asociarse con varios sitios de unión de baja afinidad, dentro de los compartimientos citoplasmáticos.

Este complejo Rc-estrógeno parece moverse desde el citoplasma hacia el núcleo. Esta conclusión fue derivada de los trabajos de Jensen y col, 1968 (59) y Shyamalo y Gorski, 1967 (60) quienes han demostrado que conjuntamente con la acumulación del estrógeno unido, hay una concomitante depleción del receptor citoplasmático. La disminución del Rc y la acumulación concomitante del Rn presentan una relación temporal y estequiométrica la cual confirma el concepto de traslocación del citoplasma al núcleo (61-64).

Tal concepto de traslocación del citoplasma al núcleo, tiene un sustento adicional y es la observación que ambos complejos, RcE y RnE comparten las constantes de disociación, especificidad hormonal (65) y coeficientes de sedimentación (66).

e.1. ACUMULACION Y RETENCION COMPLEJO HORMONA-RECEPTOR:

La retención del complejo RnE parece ser una función importante en el mecanismo por el cual los estrógenos inducen crecimiento uterino. Aquellos compuestos estrogénicos que causan acumulación a nivel nuclear del complejo receptor nuclear-estrógeno pero no promueven la retención nuclear por 6 horas o más, no causan un verdadero crecimiento del útero. En conclusión, no sólo la acumulación del complejo RnE debe ser medido, sino también, el tiempo de retención, debe ser evaluado (67).

1.4.2. DOPAMINA (DA)

La infusión de dopamina disminuye los niveles séricos de TSH en sujetos-normales e hipotiroideos y reduce la respuesta de TSH al TRH (68 y 69).

Varios estudios confirman estos datos, ya que antagonistas dopaminérgicos (70-73) fueron capaces de incrementar los niveles circulantes de TSH. En concordancia con esta idea, Foord (*) han demostrado que la dopamina inhibe la secreción basal de TSH y la estimulada por el TRH de una manera dosis dependiente en células hipofisarias cultivadas expuestas a la DA en un rango de concentración de 10^{-7} a 10^{-5} M.

En este tipo de experimentos estudiando el efecto de la DA también se observó que bajó la concentración de Prl una diez veces más respecto a la disminución en la concentración de TSH.

(*) 1980, (74)

Considerando estos resultados en forma conjunta, estarían sugiriendo que la TSH está bajo un control tónico inhibitorio de la DA, ejercido probablemente en forma directa sobre la glándula pituitaria.

1.4.3. NOREPINEFRINA:

Inyecciones vía intramuscular de norepinefrina y del agonista - clonidina aumentan la secreción de TSH (75 y 76), mientras que inhibidores de la síntesis de norepinefrina o el tratamiento con bloqueantes del receptor -adrenérgico disminuyen la TSH (77-79). Además la norepinefrina estimula la liberación de TRH de cultivos de hipotálamo (80-81). Si bien existe controversia (83-84), se acepta en general, que la estimulación adrenérgica de TSH, estaría mediada por la liberación hipotálamica de TRH.

1.4.4. HISTAMINA:

La posibilidad que la histamina pudiera influenciar la secreción de TSH, está basado en los trabajos de Snyder(*) y Brownstein(*) en que detectaron la mayor concentración de esta amina en la aminencia media del hipotálamo. En cuanto a los animales de experimentación, se observó que la hitamina estimula la liberación de hormona de crecimiento (87) de PRL (88 y 89), gonadotrofinas (90 y 91) y vasopresina (92 y 93) y posteriormente en este laboratorio (94) se estudió la participación de la histamina en la con

(*) Snyder y col.(85)

(*) Brownstein y col.(86)

centración plasmática de TSH y Prl, así como en el contenido hipofisario de ambas hormonas. Estos datos fueron obtenidos al tratar ratas Wistar adultas con antagonistas histamínicos, ranitidina y cimetidina. Mientras que la acción de la cimetidina fue disminuir la secreción basal de TSH, simultáneamente, este antagonista potenció el efecto estimulador del TRH sobre la secreción de TSH. Una explicación podría ser que la cimetidina pueda disminuir la liberación de TRH a nivel hipotalámico, (95), el cual por "down-regulation" pueda aumentar la concentración o la afinidad de los receptores hipofisarios de TRH (96-99) y así finalmente potenciar la acción del TRH sobre la secreción de TSH. La acción de ranitidina fue similar a la de cimetidina en cuanto a los niveles plasmáticos de TSH. Sin embargo, sólo la cimetidina fue capaz de descender la concentración plasmática de Prl; ésto hace pensar que la histamina podría regular fisiológicamente la secreción de TSH y Prl en la pituitaria.

1.4.5. ACIDO γ AMINOBUTIRICO (GABA)

Los trabajos de Grandinson y Guidotti, 1979 (100) y otros (101-103) sugieren un control GABA érgico de la secreción de TSH, resultados confirmados particularmente por Tapia-Aran-cibia y col., 1987 (104), quienes observaron que la secreción de TSH estimulada por TRH, podía ser modulada por GABA ejerciendo un efecto dual: a bajas concentraciones nanomolares, el GABA induce una potenciación de la respuesta de TSH al TRH; a altas concentraciones de 100 nm o más, el GABA inhibe la res-

puesta de TSH. Estos autores proponen que el control GABA érgico podría involucrar dos clases diferentes de receptores GABA: un tipo, de alta afinidad, responsable de la acción estimuladora, y otro de baja afinidad, responsable del efecto inhibidor del GABA.

Además varios estudios han demostrado que el GABA inhibe la secreción basal (105-107) de Prl y la estimulada por el TRH (108-110) y más recientemente que el GABA causa un pronunciado efecto bifásico con una estimulación inicial transitoria de Prl seguido de una inhibición sostenida. (111)

1.4.6. SOMATOSTATINA

La infusión de somatostatina en el humano, suprime el pico nocturno de TSH (112-113), los altos niveles basales de TSH en el hipotiroidismo (114) , los aumentos en la TSH sérica inducido por el TRH (115-116) y previene la liberación de TSH, que ocurre normalmente luego de la desinhibición de DA por un antagonista, metoclopramida, en pacientes hipotiroideos (117) . También in vitro, la somatostatina inhibe la secreción de TSH (118-120). La evidencia más fuerte que indica que la somatostatina tendría un rol como un inhibidor fisiológico de la TSH, se deriva de los estudios de inmunización pasiva, en los cuales la administración de antisomatostatina a ratas, in vivo, produce un aumento de la secreción basal de TSH y la estimulada por el TRH (121 y 122). El rol de la so-

matotastina como un inhibidor fisiológico aporta una posible explicación a las observaciones en que niños con deficiencia en GH, presentan una respuesta de TSH al TRH mayor y más prolongada (123-125) y al contrario, en pacientes acromegálicos las respuesta de TSH es anormalmente baja (126). Aún no se sabe si es la GH "per se" la que estimula la liberación de somatostatina o si el efecto supresivo de la GH sobre la TSH está mediado via la somatomdina.

1.4.7. ESTEROIDES

Los glucocorticoides, en particular el cortisol en dosis farmacológicas (127 y 128) inhiben la secreción basal de TSH, la fuente nocturna de TSH y la respuesta de TSH al TRH.

En la rata, Wilbery y Utiger (127), demostraron que la dexametasona no tenía efecto sobre la producción de TSH mediada por TRH sino que la información acerca de la reducción de TSH por dexametasona, ocurriría a nivel suprahipofisario. Sin embargo, estudios posteriores , (129 y 130) han sugerido una heterogeneidad en cuanto a los receptores glucocorticoides intracraneanos e hipofisarios, con una gran evidencia de la existencia de un receptor para glucocorticoides con baja afinidad para dexametasona en la glándula hipofisaria.

Pamenter y Hedge, 1980 (131) encontraron que infusiones fisiológicas de corticosterona inhiben la secreción de TSH inducida por TRH pero no la basal, en ratas adrenalectomizadas in vivo.

In vitro los corticosteroides aumentan el número de receptores de TRH en células hipofisarias (132). Analizando estos resultados, son compatibles con un efecto directo de los glucocorticoides en un rango fisiológico, en la rata, adjudicándoles un rol en la regulación de la secreción de TSH tanto a nivel hipofisario como hipotalámico.

Morley y col., 1981 (133), en cuanto a los esteroides gonadales, (133) han demostrado que los andrógenos producen una marcada disminución en la respuesta de TSH al TRH en el hipogonadismo primario. Este hallazgo es compatible con el concepto que el andrógeno en el hombre, es un inhibidor fisiológico de la secreción de TSH. En la rata, los esteroides sexuales parecen tener efectos opuestos: la concentración sérica de TSH es mayor en ratas macho (134-136) y dosis de reemplazo de testosterona en animales castrados aumentan y restauran a valores normales la secreción basal de TSH y la respuesta de TSH a TRH (137) (Figura 3).

1.4.8. SEROTONINA

Existe evidencia a favor de la interacción de neurotransmisores con el eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo a múltiples niveles. A nivel hipotalámico, existe un control catecolaminérgico y serotoninérgico de la función tiroidea (138 y 139) tanto las catecolaminas como la serotonina actúan directamente sobre la glándula tiroidea (140).

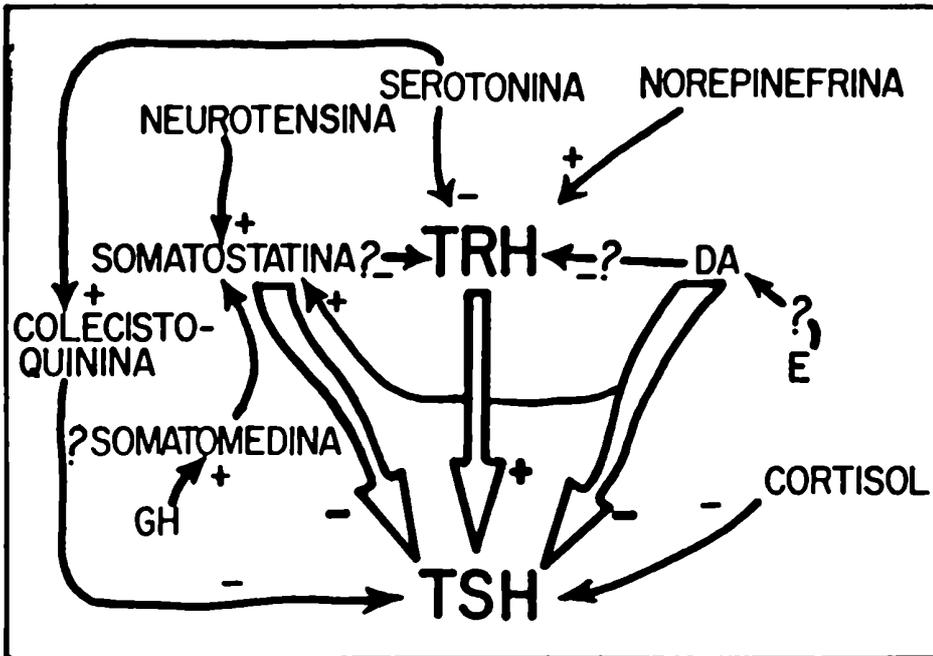


Figura 3. Factores que controlarían la respuesta de TSH al TRH

1.4.9. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF)

Existen otros factores diferentes de las hormonas que han sido postulados como reguladores de ciertas funciones endocrinas. Entre estos se encuentra el EGF.

EGF DE RATON: Se conoce bien la estructura del EGF de ratón. Es una cadena polipeptídica de 53 residuos de aminoácidos desprovista de tres de ellos: alanina, fenilalanina y lisina. Los puentes disulfuro en el EGF de ratón son necesarios para la actividad biológica (141).

EGH HUMANO (UROGASTRONA)

Si bien el EGF humano no ha sido tan bien caracterizado como el polipéptido de ratón, los datos disponibles indican que ambos polipéptidos son muy similares aunque no idénticos respecto a sus propiedades físicas y químicas (142). Como el EGF de ratón y el humano exhiben idéntica actividad biológica y poseen algunos sitios antigénicos en común, se ha sugerido que el EGF humano es una forma evolucionada del polipéptido de ratón.

EGF DE RATA:

Moore (143) ha aislado y caracterizado el factor de crecimiento epidérmico proveniente de glándulas submaxilares de la rata. La composición de aminoácidos se parece a la de ambos polipéptidos, EGF de ratón y EGF humano, pero no es idéntica a

ninguno.

RECEPTORES PARA EGF:

Han sido demostrado receptores específicos y saturables de EGF usando EGF de ratón marcado con ^{125}I o EGF humano y una gran variedad de células cultivadas incluyendo células de córnea (144-146), fibroblastos humanos (147-148), células gliales de humano (149) células de carcinoma epidermoide humano (150), células 3T₃ (151), células de la granulosa (152), células del endotelio vascular humano, células de coriocarcinoma de humano (154) y un importante número de otros tipos celulares (155 y 156).

Se ha estimado para diferentes tipos de fibroblastos humanos, que cada célula contiene 40.000 a 100.000 sitios de unión para EGF, y una constante de disociación (kd) aparente de $2-4 \times 10^{-10}$ M (157).

O'Keefe y col. (158) han detectado receptores de EGF en fracciones crudas de membrana preparada de una gran diversidad de tejidos de mamíferos. Estos autores han encontrado por ejemplo, que membranas de placenta e hígado poseen una gran capacidad para unir EGF. Además, han detectado sitios de unión específicos para EGF en fracciones de membrana de hígado pero de organismos evolutivamente muy distantes (159).

INTERNALIZACION Y DEGRADACION DEL EGF

Carpenter y Cohen (160 y 161) han postulado que luego de la unión inicial de EGF - ^{125}I a sus receptores específicos en la membrana plasmática, el complejo EGF-receptor es internalizado y la hormona es finalmente degradada en los lisosomas. Estas conclusiones se basaron en la siguiente serie de observaciones: 1- A 37°C la célula unida al EGF ^{125}I es rápidamente degradada a mono-iodotirosina ^{125}I . 2- A 0°C el EGF ^{125}I unido a la célula no es degradado sino disociado lentamente de la célula. 3- Cuando la unión del EGF ^{125}I se lleva a cabo a 37°C y luego las células son incubadas a 0°C , prácticamente no se detecta la liberación de la radioactividad unida a la célula. 4- La degradación, pero no la asociación, requiere energía metabólica. 5- La degradación es inhibida por drogas que inhiben la función lisosomal, tales como cloroquina y cloruro de amonio. 6- Cuando el EGF ^{125}I es unido a las células a 0°C , la hormona está mucho más accesible a agentes reactivos de superficie, tales como tripsina y anticuerpos a EGF, más que si la hormona es unida a 37°C . La exposición de fibroblastos de EGF da como resultado la pérdida aparente de receptores de membrana para EGF, lo que sugiere que el receptor también es internalizado. La internalización y degradación del EGF ^{125}I ha sido confirmada con células de la granulosa (152) y otros tipos celulares (162), utilizando metodologías similares.

El paso inicial en el mecanismo de acción del EGF es su unión al receptor específico a nivel de la superficie celular (163). En forma similar a otros receptores, el receptor para el EGF funciona como un transductor de señal y origina una serie de eventos intracelulares, los cuales finalmente permiten la iniciación de la síntesis del ADN y la división celular (163).

El mecanismo de acción de EGF comienza a ser dilucidado. Numerosos estudios han demostrado la existencia de dos clases de receptores para EGF de alta y baja afinidad, en diversas líneas celulares (164-166). Ciertas evidencias, indican que los sitios de alta afinidad serían los responsables de la respuesta mitogénica.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DEL EGF:

Ha sido demostrado que el EGF presenta importantes respuestas biológicas en animales intactos, en cultivos de órgano y recientemente, en cultivo de células. Estas respuestas están resumidas en la TABLA 1

TABLA 1 EFECTOS BIOLÓGICOS DEL EGF

IN VIVO

Diferenciación/proliferación acelerada

de la epidermis

del epitelio de la córnea

del epitelio del pulmón

Actividad incrementada de ornitina descarboxilasa
mayor contenido de grupos disulfuros en piel.

CULTIVOS DE ORGANOS

Diferenciación/proliferación acelerada
de la epidermis
del epitelio de la córnea
del epitelio mamario

Inducción de ornitina descarboxilasa
Síntesis de proteína y ARN aumentada

CULTIVO DE CELULAS

Estimulación de la síntesis de macromoléculas
Ácido hialurónico
ARN
Proteína
ADN

Multiplicación celular incrementada
Alteración de las propiedades de membrana
Estimulación de la biosíntesis de prostaglandinas
Alteración del crecimiento viral.

1.5. EL PAPEL DE LOS ESTROGENOS EN LA ECONOMIA TIROIDEA

Está bien establecido con el descubrimiento de la proteína transportadora de T_4 (TBG) en 1952 por varios grupos de investigadores y la demostración que su capacidad para ligar a la T_4 podía ser aumentada por la administración de estrógenos (167 y 168), se aporta una nueva evidencia de la influencia de los estrógenos sobre el metabolismo de las hormonas tiroideas.

Además, el tratamiento con estrógenos puede estar seguido de una degradación disminuida de T_4 (169 - 171).

Algunos autores (172 y 173) sugieren que en el hombre, el tratamiento con estrógenos puede deprimir la liberación del yodo por la glándula tiroidea, con un aumento en la secreción por la pronunciada disminución tiroidea inducida por estrógenos en pacientes hipertiroideos, en los cuales los niveles séricos de TSH fueron indetectables (174), así como en pacientes a los cuales se les ha reemplazado la secreción endógena de TSH por una constante administración de TSH exógena (175). De manera similar, la utilización de dosis fisiológicas de estrógenos en el hombre resultó de un aumento de la TSH sérica (176-178) luego del tratamiento con esteroides anticonceptivos y durante el embarazo (179).

Es decir, la acción de los estrógenos estaría dada provocando una depresión general de la economía tiroidea. Tal efecto podría ser en forma directa sobre la función de la glándula tiroidea, seguidamente sobre la liberación glandular, o indirectamente, a través de la regulación de los niveles séricos de TBG. Ambos mecanismos son compatibles con el aumento ob-

servado en los niveles circulantes de TSH (180).

1.6. ROL DEL EGF SOBRE LA ECONOMIA TIROIDEA

Si bien los efectos del EGF sobre el eje hipófiso-tiroideo aún no ha sido aclarado, (181-182). Se han descrito receptores específicos para EGF en la célula tiroidea porcina.

Además, el EGF posee una pronunciada actividad trófica sobre la glándula tiroides de varias especies (183), efecto potenciado por TSH, a través de un aumento de los receptores de EGF en las células tiroideas.

En forma similar, ambas hormonas tiroideas aumentan la unión del EGF a sus respectivos receptores en diversos tejidos de ratón, así como en líneas celulares secretoras de GH y Prl de rata, dando como resultado un incremento en la síntesis de Prl y una disminución en la síntesis de GH, inducida por T_3 (184)

Hinkle y col., (185), han demostrado que el EGF deprime la concentración de receptores nucleares de T_3 y por consiguiente, disminuye la acción de las hormonas tiroideas en células tumorales de hipófisis de rata.

La infusión por 24 horas de cantidades suprafisiológicas de EGF a la oveja, induce una brusca caída en los niveles plasmáticos de T_3 y T_4 sin afectar los niveles circulantes de TSH durante las primeras 8 horas de infusión (186).

Por lo tanto, se podría pensar en la participación activa del EGF sobre la fisiología tiroidea, tomando en cuenta

otros tantos factores que hoy sabemos, que son capaces de regular la producción hipófiso-tiroidea (187 - 189).

2.OBJETIVOS

Es nuestro propósito en este trabajo de Tesis, profundizar el conocimiento que se tiene sobre la regulación del eje hipófiso-tiroideo en la rata.

Para ello tomamos un aspecto no convencional de la secreción hipofisaria de TSH que es la participación de dicha secreción, de los estrógenos y del factor de crecimiento epidérmico.

Dividimos el estudio en dos etapas que corresponden a responder los siguientes interrogantes:

- a) Dado que Delean y col.(219) han demostrado que la administración de estrógenos en la rata modifica el número de receptores hipofisarios de TRH, ¿Cuál es el rol de los estrógenos sobre la respuesta de la TSH al TRH, sobre los niveles circulantes de TSH y sobre el contenido intrapituitario de TSH?.
- b) Si es que los estrógenos participan en dichas variables, ¿Cuál es el grado de alteración de los receptores para estrógenos localizados en la glándula hipofisaria en relación al estado tiroideo, ejemplo el hipotiroidismo.
- c) Ya que las hormonas tiroideas tendrían un efecto directo a nivel hipotalámico, ¿Cuál es el grado de alte

ración de los receptores hipotalámicos para estrógenos en relación el estado tiroideo, ejemplo en el hipotiroidismo?

ESTUDIOS CON EGF:

- a) Ya que se ha propuesto una participación del EGF en la liberación de T_3 y T_4 por la glándula tiroides, ¿Cuál sería el posible rol del EGF en la economía tiroidea en general, y en la producción de TSH en particular?
- b) Si es que el EGF modifica la secreción de TSH, ¿A través de qué mecanismo ejerce su acción?.

3. MATERIALES Y OBJETIVOS

3.1. TECNICAS UTILIZADAS

3.1.1. RADIOINMUNOENSAYO

En radioinmunoensayo, una concentración fija del antígeno marcado es incubado con una dilución constante de antisuero, tal que la concentración de sitios de unión del antígeno, respecto al anticuerpo está en exceso, es decir, sólo un 50% de la concentración total del trazador puede ser unido por el anticuerpo. Si se agrega el antígeno no marcado al sistema, se establece una competencia entre el antígeno marcado y el no marcado por el número limitado y constante de sitios de unión del anticuerpo y así, la cantidad de trazador unido al anticuerpo disminuirá mientras que la concentración del antígeno frío aumentará. Este puede ser medido después de separar la fracción antigénica libre de la unida al anticuerpo. Existen diversos sistemas de separación; en este trabajo hemos utilizado la precipitación por doble anticuerpo, ya que es un método eficiente y de aplicación general.

Una desventaja podría ser las prolongadas incubaciones para que el complejo antígeno-segundo anticuerpo sea precipitable, aunque se puede acelerar la precipitación agregando PEG (4%) luego de la incubación con el segundo anticuerpo, o bien, absorber las globulinas del segundo anticuerpo a una fase sólida. El método de separación consiste en añadir un segundo anticuerpo de manera que interactúe con el complejo antígeno-anti-

cuerpo, dando como resultado una elevada concentración de globulinas que permite una precipitación específica. Así, el segundo anticuerpo es una globulina que reacciona específicamente con la globulina del primer anticuerpo.

3.1.1.1. TSH Y Prl

Las determinaciones de TSH y Prl se realizaron con métodos inmunológicos (RIA). En el dosaje de estas hormonas se siguió la técnica descrita en las instrucciones del Rat Pituitary Distribution Program del NIAMDD.

El buffer que se utiliza en las diferentes etapas del RIA es PBS (buffer fosfato de sodio 0,01 M pH 7,5).

Las preparaciones de hormonas purificadas para marcar con iodo fueron provistas por el NIAMMD.

La introducción de un átomo de I^{125} en las moléculas hormonales se realizó con el método de la cloramina T (190).

Es el método más utilizado para la radioiodinación de masas pequeñas de proteínas (en nuestro caso, TSH y Prl) para obtener altas actividades específicas.

La ventaja de este método es que no utiliza iodo carrier y prácticamente aprovecha todo el I^{125} .

El pH óptimo utilizado fue 7,5 comprobando que el rendimiento se reduce por debajo de pH 6,5 y por arriba de pH 8,5.

La reacción se detiene por el agregado de metabisulfito de so dio utilizando como "carrier" IK y albúmina.

La hormona marcada se purifica pasándola por una columna de Bio Gel P-60.

Para ambas hormonas se utilizó 1 mCi de I^{125} Na.

En ambos casos, la dilución del primer anticuerpo se pre paró en una solución de suero normal de conejo al 3% (SNC-PBS 0.05 M EDTA).

Los anticuerpos dirigidos contra las moléculas de TSH y prl de rata se obtuvieron en conejos y fueron provistos por el NIAMDD. Las diluciones iniciales utilizadas en cada caso fueron:

anti-_r TSH: 1:1200 y anti-_r Prl: 1:1400

La separación de la hormona libre de la unida al anti-cuerpo se efectuó con un segundo anticuerpo dirigido contra las inmunoglobulinas de conejo (hecho en cabra) (origen:NIAMDD), co mo ya fué mencionado.

Con las dos hormonas se utilizó como preaparaciones de re ferencia las provistas por el programa del NIAMDD TSH: RP₂ y Prl: RP₃.

El protocolo de ensayo es el siguiente:

- a) buffer (PBS-BSA 1%)
- b) muestra o estándar (las cuales junto con el buffer, deben ocupar un volumen máximo de 200 μ l).

- c) 100 μ l de hormona marcada (que corresponden aproximadamente a 20.000 cpm).
- d) 100 μ l del anticuerpo. La mezcla se incubó durante 48-72 horas.

En ese momento se agregan 100 μ l del segundo anticuerpo (1:15) y se continúa la incubación por 24 horas más. Mediante una centrifugación (3000 rpm \times 30 min) se precipita el complejo "segundo anticuerpo-primer anticuerpo-hormona", y luego se procede a aspirar el sobrenadante. La radioactividad del precipitado se cuenta en un contador gamma (Picker).

Se expresa en ng/ml. Las curvas (% de unión vs longitud de la masa total de hormona) son lineales entre: 0,03 y 20 ng de RP₂ (TSH) y 0,04 y 5 ng de RP₃ (Prl).

3.1.2. MEDICION DE RECEPTORES

3.1.2.1. RECEPTORES DE ESTROGENOS

Los tejidos (anterohipófisis e hipotálamo) una vez disecados, fueron lavados en buffer de homogenización y homogenizados en buffer A (Tris ClH 0,01 M pH. 7,4 conteniendo EDTA 1,5 mM Cl₂ Mg 1 mM y sacarosa 0,25 M) en una relación 1:8 volúmenes tejido.

El homogenato se centrifugó a 2500 rpm \times 10 min a 0-4°C, seguido de dos centrifugaciones sucesivas. El precipitado se procesa luego para obtener la fracción nuclear. El sobrenadan-

te inicial fue centrifugado a 40.000 rpm, por 60 min a 0-4°C obteniéndose la fracción citosólica. El "pellet" nuclear se extrajo con el agregado de buffer B (buffer A + ClK 0,4 M, pH 7,4) durante 60 min, centrifugándose las muestras a 3000 rpm x 20 min. Este sobrenadante se usa para determinar los sitios nucleares de estrógenos.

Alícuotas de citosol o extracto nuclear (100 μ l) son incubadas con $^3\text{H-E}_2$ (0,5-15nM) durante 16 horas a temperatura ambiente en presencia o ausencia de H (hormona) fría (500 exeso). La separación de las fracciones libres de la unida al receptor se realiza con el agregado de carbón (2%) dextrano (0,2%)

3.1.2.2. RECEPTORES DE P (PROGESTERONA)

Los animales fueron inyectados con benzoato de estradiol (2,5 mg/día/rata), sc, 48 y 24 hs antes del experimento para inducir, un mayor número de receptores citosólicos de progesterona.

La determinación de receptores se realizó tal como fue descrito en 3.1.2.1., según métodos publicados anteriormente y adaptaciones para dichos tejidos según técnica original de Roy y Mc Even y Camp y colaboradores (191 y 192).

El esteroide unido del libre se separaron por el método de carbón dextrano.

Las concentraciones de proteínas y ADN se determinaron por el método de Lowry y colaboradores y Burton respectivamente (193 y 194).

3.2. MODELOS EXPERIMENTALES Y OBTENCION DE LAS MUESTRAS

ESTUDIOS CON ESTRADIOL

3.2.1. EXPERIMENTOS "IN VIVO": MODIFICACION DE LOS PARAMETROS TIROIDEOS POR LOS ESTROGENOS

La administracion de estrógenos induce cambios en el metabolismo periférico de T_4 y T_3 (195-198) o en la secreción glandular en la rata (199 y 200). Recíprocamente, las hormonas tiroideas alteran diversos aspectos de la fisiología reproductora en la rata (201-203).

SECRECION DE TSH

Se ha demostrado claramente que los niveles plasmáticos de TSH en el hombre presentan una típica variación circadiana (204-206). Tal variación se pierde en pacientes con hipotiroidismo severo (207). El mecanismo responsable de generar el ritmo circadiano de TSH, no se conoce.

La respuesta al TRH, así como la TSH basal está aumentada a las 23 horas (206) sugiriendo que el incremento en la TSH

se debe a la liberación de una sustancia inhibitoria más que a un aumento en la producción de TRH.

El ritmo circadiano de TSH en la rata está bien caracterizado con un pico de TSH sérica que ocurre entre las 11 y 15 horas (208 y 209).

PRUEBA DE TRH

La TRH aumenta la liberación de TSH vía iv e im (210) sc (211) o en forma oral (212).

La TSH presenta una relación dosis-respuesta dentro de un rango de dosis del TRH de 15-500 μ g. en el hombre y 1-50 ng en la rata, sobrepasando dichas concentraciones, no se obtiene una respuesta adicional (213)

La infusión continua de TRH por un período mínimo de 4 horas induce un aumento de TSH en dos fases, la primera aparece dentro de los 5 minutos de comenzada la infusión, llegando a un "plateau" a los 50-90 minutos, y la segunda fase se registra a los 90 minutos y se mantiene hasta los 120-150 minutos (214). Este "pattern" bifásico de la liberación de TSH es compatible con la existencia de dos "pooles" hipofisarios de TSH, uno de los cuales requiere una estimulación mayor para ser secretado.

3.2.1.1. PARTE EXPERIMENTAL

En el bioterio las condiciones ambientales en las que se encuentran los animales son las siguientes:

Los períodos de luz-oscuridad son de 12 horas, las luces se encienden automáticamente. Los animales reciben comida y agua "ad libitum".

Se colocan como promedio 10 ratas por jaula.

En el desarrollo de estos experimentos se utilizaron ratas hembras de aproximadamente 200 g de la cepa Wistar. Para la identificación de cada animal, se realizaron marcas en las orejas. A un grupo de ratas se les indujo hipotiroidismo por la administración ip de 0,5 mCi de ^{131}I .

Estas fueron estudiadas una vez que los niveles séricos de T_4 y T_3 fueron indetectables, lo que ocurre en el orden de 1 mes luego del tratamiento con ^{131}I .

PRUEBA DEL TRH

Los animales fueron levemente anestesiados con éter. Se recolectaron muestras de sangre heparinizada 10 minutos antes y 10 minutos después de la inyección ic de $10\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso de TRH. Esta dosis y el tiempo empleado en el test de TRH permitieron una respuesta máxima de TSH. Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente y luego de centrifugarlas

se guardó el suero a -20°C hasta el dosaje de la hormona.

Un grupo de animales recibió diariamente $25\ \mu\text{g}$ de BE (benzoato de Estradiol Schering, Argentina)/100 g de peso disueltos en $100\ \mu\text{l}$, de aceite, sc, durante 9 días, para el estudio de estrógenos sobre la respuesta de la TSH al TRH.

RIA

Las TSH plasmática e hipofisaria fueron medidas según el método anteriormente descripto.

A un grupo de animales se les indujo hipotiroidismo (M y M). El tratamiento hormonal previo a la determinación de las concentraciones plasmática e hipofisaria de TSH, fue el siguiente: T_4 (Lab. Glaxo, Bs. As, $4\ \mu\text{g}/\text{día}$) durante 10 días; benzoato de estradiol (Schering Argentina $10\ \mu\text{g}$ en $10\ \mu\text{l}$ de aceite) durante 10 días, o ambos, T_4 + benzoato de estradiol en las dosis arriba mencionadas.

Los animales, tanto eutiroides como hipotiroides fueron ovariectomizados; los controles recibieron sólo el vehículo. Las muestras de sangre fueron conservadas a -20°C hasta la medición de TSH en plasma, mientras que para determinar el pool intrapituitario de TSH, una vez sacrificados los animales por decapitación, inmediatamente se extrajo las glándulas hipofisarias.

Los tejidos fueron homogeneizados individualmente en 200 μ l de buffer fosfato (pH 7,6) a 4°C. Luego se procedió al dosaje de TSH según el método anteriormente explicitado.

La evaluación estadística de los datos experimentales se realizó mediante el test "t" de Student, cuando el número fue superior a dos se empleó el análisis de la varianza. El test múltiple de Duncan fue usado para comparar el grupo eutiroideo con los grupos hipotiroideos sometidos al tratamiento hormonal. La significancia entre los animales hipotiroideos no tratados y tratados con las hormonas mencionadas, se obtuvo con el test de Dunnett.

3.2.2. EXPERIMENTOS "IN VITRO" - EFECTOS DE LA T₄ SOBRE LA CONCENTRACION DE RECEPTORES PARA ESTEROIDES SEXUALES

Para poder actuar sobre una célula, las hormonas, deben en primer lugar, unirse a ésta a través de una macromolécula-receptor. Como consecuencia de la interacción hormona-receptor, se produce una determinada respuesta fisiológica.

En base a este concepto y siguiendo la tendencia bibliográfica en cuanto a la relación entre las hormonas esteroideas sexuales y el eje hipófiso-tiroideo pareció razonable especular que si los estrógenos son capaces de modular ciertas variables tiroideas, sería al menos en parte, debido a una probable modificación de los receptores para estrógenos localizados en la hi-

pófisis. Para ello, utilizamos como modelo la rata hipotiroidea.

Paralelamente con el ensayo de receptores para esteroides sexuales, se obtuvo información acerca de los cambios cíclicos que ocurren en el aparato reproductor de la rata hembra, que son el resultado de la interacción de fenómenos nerviosos, ambientales y endócrinos (215).

En la rata, el ciclo estral dura 4 ó 5 días. En las diferentes etapas de su desarrollo se producen eventos fisiológicos característicos e interrelacionados: secreción de hormonas hipofisarias (LH FSH y ováricas, P , E_2 , alteraciones morfológicas del tracto genital y del ovario, modificaciones de la conducta sexual. Los estadios del ciclo estral de la rata se denominan diestro proestro y estro según la nomenclatura del ciclo vaginal. En el hipotiroidismo se alteran los estadios del ciclo estral. Además, el hipotiroidismo origina una disminución en la secreción de hormonas lutemizante y folículo-estimulante

y determina alteraciones en la ovulación (202). Bruni y colab., (201) observaron un aumento en la secreción de ambas gonadotrofinas en animales hipotiroideos-ovariectomizados.

En la glándula hipofisaria, el hipotiroidismo neonatal (203) induce un descenso en la concentración de receptores de estradiol, aunque se debe mencionar que la tiroidectomía se acompaña de un aumento en el peso hipofisario y en el número de células hipofisarias totales (215).

En el desarrollo de los experimentos se tomaron varios grupos de ratas eutiroideas y hipotiroideas para la determinación de los estadios del ciclo estral.

Luego de analizar un gran número de animales, se observó que el 90% de las ratas hipotiroideas tenían detenido el ciclo en el proestro. Una vez confirmado este hecho en forma sistemática, se decidió entonces estudiar la cinética de receptores para esteroides sexuales utilizando como modelo la rata hipotiroidea-ovariectomizada (M y M).

RE₂

Los receptores para el estradiol en el citoplasma de la célula hipofisaria o hipotalámica se encuentran libres o unidos al estradiol; el complejo estradiol-receptor entra al núcleo e inicia las respuestas nucleares a través de su unión a la cromatina (216).

Tal como fue descrito de acuerdo con la técnica original de Roy y Mc Ewen (191) una vez aislados las fracciones citosólica y nuclear de ambos tejidos (anterohipófisis e hipotálamo) se evaluó la influencia que estados experimentales de insuficiencia o exceso de hormonas tiroideas pueden ejercer sobre los receptores para estradiol y en consecuencia sobre la fisiología del eje hipotalámico-hipofisario.

RP

Los estrógenos y progestógenos actuando en los tejidos "blanco" parecen estar íntimamente ligados en cuanto a su mecanismo de acción (217).

En la rata, la progesterona inhibe la síntesis de novo de los receptores, para E_2 , mientras que los estrógenos inducen la síntesis de receptores para progesterona. Se estudiaron los sitios de unión para progesterona por considerarlos como marcadores potenciales de las respuestas estrogénicas.

De hecho, en la rata normal se observan cantidades sustanciales de receptores de progesterona de alta afinidad tanto en la hipófisis como en el hipotálamo. En los animales ovariectomizados no se ha podido confirmar los sitios de unión para progesterona (P), aunque el tratamiento con estrógenos permitió demostrar la existencia de dichos sitios (218).

3.2.2.1. PARTE EXPERIMENTAL

Se evaluó el efecto de la T_4 sobre receptores para esteroides sexuales (E_2 y P). Con tal sentido se estudió un grupo de animales hipotiroideos - ovariectomizados. El tratamiento hormonal previo a la determinación de receptores citosólico y nuclear de E_2 y citosólico de P, fue el siguiente: T_4 , E_2 y T_4 + E_2 .

Ratas hembras adultas (aproximadamente 200 g) fueron decapitadas 24 horas después que el tratamiento hormonal hubiese sido completado.

El lóbulo hipofisario anterior se disecó utilizando pinzas finas y evitando la contaminación con la zona neurointermedia. El fragmento hipotalámico fue aislado como un bloque extendiéndose 1 mm frente al quiasma óptico y lateralmente al sulco hipotalámico. Se utilizó la técnica de intercambio (M y M). Los fragmentos se recolectaron e homogeneizaron rápidamente en hielo empleando el orden de 5 glándulas /ml de buffer, dependiendo del peso de cada tejido.

Para analizar los datos estadísticos, se utilizó el test de Dunnett o Duncan.

ESTUDIOS CON EGF

3.2.3. EXPERIMENTOS "IN VIVO": MODIFICACION DE LOS PARAMETROS TIROIDEOS POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF)

Poco puede decirse aún acerca de la importancia fisiológica de la participación del EGF en la regulación de la economía tiroidea.

Los datos experimentales descritos en la bibliografía sólo se refieren a las modificaciones que produce el EGF y otros factores de crecimiento sobre la actividad trófica de la tiroides, la descripción de receptores para EGF en la célula

tiroidea y la cinética hormonal de dicha glándula. De todas maneras, en estos casos ha sido posible postular un sistema de regulación por retroalimentación entre el EGF y la glándula tiroidea. La correlación que pudiera existir entre el factor de crecimiento y los estrógenos en cuanto a la mitogenicidad de ambos compuestos y la influencia sobre las hormonas hipotalámica y tiroidea nos llevó a pensar que el EGF podría ejercer alguna acción sobre la TSH hipofisaria.

3.2.3.1. PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 200 g.

i. Prueba del TRH

Idem i (Sección "ESTUDIOS CON ESTRADIOL")

. Prueba del EGF.

Tomando como patrón el TRH (tiempo post-inyección, dosis, etc.) se mimetizó el test, inyectando en este caso dosis crecientes de EGF (5,10,20 μ g), ic y se recolectaron muestras de sangre 10 minutos antes y 10 minutos después del estímulo, las cuales fueron mantenidas a -20 hasta la medición de TSH.

Las comparaciones estadísticas entre los dos grupos experimentales (TRH respecto al valor basal y EGF respecto a la TSH basal) se hicieron mediante el test "t" de Student.

3.2.4. EXPERIMENTOS "IN VITRO" EFECTO DEL EGF SOBRE LA SECRECIÓN DEL TSH

Para estudiar el sitio de acción del EGF sobre la secreción de TSH se eligió una metodología "in vitro". Estas técnicas permiten evaluar directamente la acción de una sustancia sobre un tejido sin tener que recurrir a manipulaciones farmacológicas o quirúrgicas para aislarlo. Los argumentos sostenidos en contra de los métodos "in vitro" se refieren, en general, a una posible incompleta o incorrecta difusión en los tejidos de las sustancias agregadas, a la degradación de estas sustancias y otras secretadas al medio, a la acumulación de sustancias que pudieran modificar las respuestas en estudio y fundamentalmente, a la pérdida de control que pueden ejercer otros tejidos sobre el que se encuentra en estudio.

El uso de la incubación dinámica o perfusión representa una alternativa para disminuir las desventajas enumeradas en primer término. Esta técnica ha sido bien utilizada en neuroendocrinología y se basa fundamentalmente en la circulación constante del medio de incubación que se recoge en fracciones en las cuales se puede determinar la concentración de la sustancia deseada.

3.2.4.1. PARTE EXPERIMENTAL

Se evaluó el efecto de EGF sobre la secreción hipofisaria de TSH. En tal sentido, se incubó (perfusión) anterohipó-

fisis con un dispositivo compuesto por camaritas conteniendo las glándulas, con un volumen de 600 μ l (1 glándula/camarita) (Figura 4).

Como medio de incubación se utilizó el medio 199 (Gibco, sales de Hank adicionado con l-glutamina, pH 7,3) El fluido es bombeado mediante una bomba peristáltica de flujo constante (Gilson modelo HP 4).

Se utilizaron ratas macho adultas. La autopsia de los animales se realizó aproximadamente a las 11 horas, sacrificándolos por decapitación. Después de la disección, las anterohipófisis se mantuvieron en frío sobre lana de vidrio embebida en medio de incubación. Una vez finalizada la toma de muestra, se colocó en la camarita correspondiente.

Las incubaciones se realizaron en un baño termostático tipo Dubunoff a 37°C con agitación constante.

El sistema se preincubó durante dos horas hasta que se estabilizó la secreción de TSH; después de tal preincubación se comenzó a recoger el líquido de perifusión en fracciones de 10 minutos (1 ml). Estas fracciones inmediatamente fueron congeladas a -20° c hasta el dosaje hormonal.

Las diluciones de TRH o EGF (Collab. Research, MA) se prepararon en el medio de incubación y 10 veces más concentradas que la concentración final deseada. La inyección de uno u otro péptido se realizó en la forma de un pulso y después de una hora de incubación (cuando ya se habían recolectado 6 fracciones).

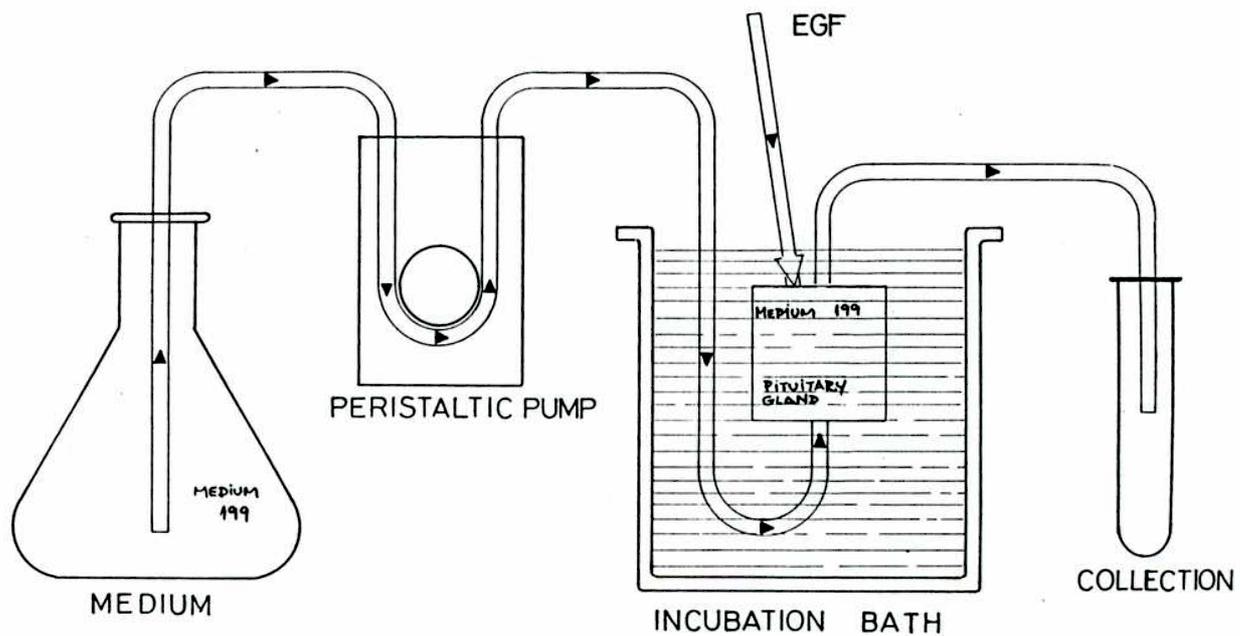


Figura 4. Sistema de Perifusión.

Los valores de TSH se expresan como porcentaje del valor basal, considerado éste como el 100% y calculado como el promedio de los valores correspondientes a las 6 primeras fracciones recogidas.

Los datos experimentales se analizaron mediante el test "t" de Student comparando el promedio de los valores anteriores al agregado de TRH o EGF con los posteriores al mismo.

4. MODIFICACION DE LOS PARAMETROS TIROIDEOS POR LOS ESTROGENOS

4.1 RESULTADOS Y DISCUSION - EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS

Como hemos mencionado anteriormente uno de los objetivos de esta Tesis es demostrar una relación entre los estrógenos y el eje hipófiso - tiroideo.

El primer aspecto que consideramos fue el efecto del tratamiento con benzoato de estradiol (BE) sobre los niveles séricos de TSH en ratas hembra ovariectomizadas, tanto eutiroideas como hipotiroideas (Tabla 2). Como se observa en esta tabla, el mismo esquema fue utilizado para determinar también la concentración hipofisaria de TSH (los valores son el promedio \pm desviación estándar para ocho animales).

La concentración sérica de TSH, en el animal hipotiroideo se encuentra marcadamente aumentada mientras que el "pool" intrapituitario de TSH presenta bajos valores normales. La administración de estrógenos a estos animales hipotiroideos inclu-

TSH suero ($\mu\text{U}/\text{ml}$)

| | EUTIROIDEA |
|--------------------------------|--------------------|
| — | 90,3 \pm 17 |
| | HIPOTIROIDEA |
| — | 1336,2 \pm 192 * |
| E ₂ | 1728,7 \pm 321 |
| T ₄ | ND |
| E ₂ +T ₄ | ND |

TSH Hipofisaria (mU/mg proteínas)

| | EUTIROIDEA |
|--------------------------------|------------------|
| — | 244,5 \pm 64,3 |
| | HIPOTIROIDEA |
| | 177,7 \pm 30 |
| E ₂ | 239,3 \pm 32 |
| T ₄ | 269,4 \pm 59 |
| E ₂ +T ₄ | 221,0 \pm 20 |

Tabla 2. Concentración de TSH sérica (expresada en uU/ml) y TSH hipofisaria (expresada en mU/mg proteínas) en ratas eutiroideas e hipotiroideas control y post-tratamiento hormonal.

yendo benzoato de estradiol, usado en este estudio, no modificó significativamente estos parámetros, si bien en ambos se observó una tendencia a ser aumentados. Esta tendencia podría ser de interés ya que se observó reiteradamente. Es razonable especular que en ausencia de los efectos supresivos de las hormonas tiroideas en las ratas hipotiroideas, el aumento de los receptores hipofisarios de TRH inducido por los estrógenos (219) puede contribuir a acelerar la liberación de TSH, ya incrementada.

El tratamiento con T_4 solo o en combinación con estradiol bajó los niveles plasmáticos de TSH a valores no detectables sin afectar el contenido hipofisario de esta hormona. Esto se explica ya que el "pool" circulatorio de TSH es aproximadamente 5% del "pool" intrapituitario de TSH, por lo tanto un pequeño cambio a nivel hipofisario va a ser reflejado en grandes cambios de la hormona en circulación.

Independientemente de sus efectos mitogénicos, los estrógenos parecen estar involucrados en la economía hipófiso-tiroidea en forma específica-. Para poder confirmar esta hipótesis, se determinó la concentración hipofisaria de receptores de estradiol en diversos estados tiroideos.

En animales eutiroideos o hipotiroideos, los estrógenos aumentan el peso de la hipófisis, las proteínas hipofisarias y el peso de la glándula tiroidea (220 y 221). En la Figura 5 se grafican los incrementos en la TSH plasmática 10 minutos después de la administración por vía endovenosa de TRH. Las

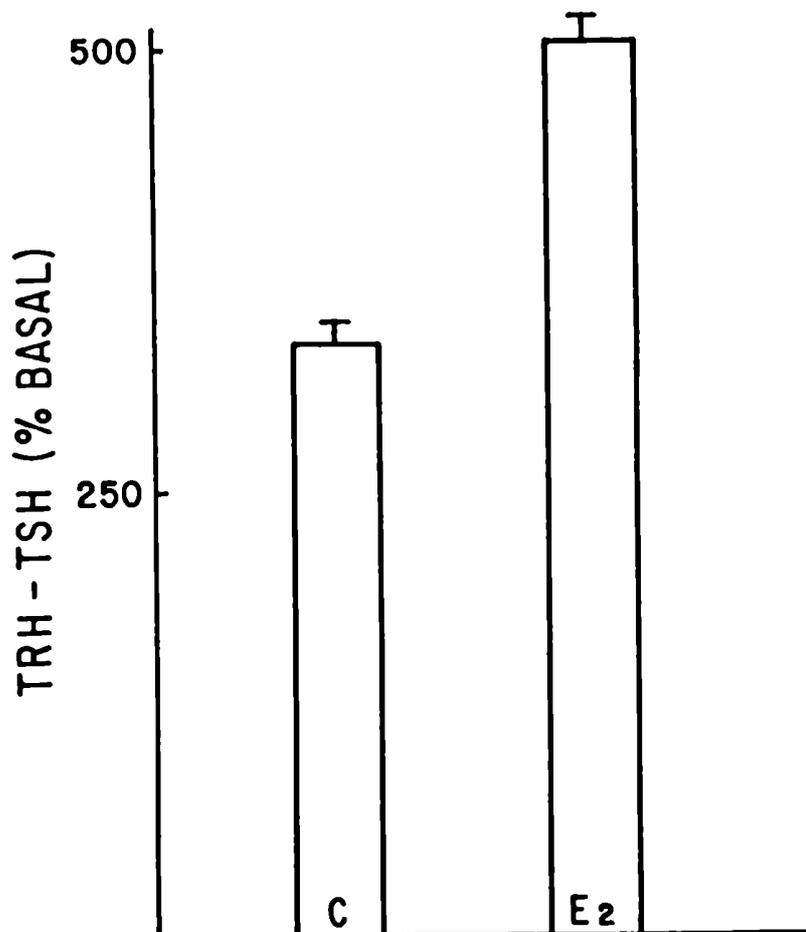


Figura 5. Incremento de la TSH plasmática 10 minutos después de la administración por vía endovenosa de TRH . La acción de los estrógenos aumenta la respuesta de la TSH (p 0,05).

ratas tratadas con estrógenos tienen una mayor respuesta al TRH que los animales control.

EFEECTO DE LA T₄ SOBRE LA CONCENTRACION DE RE₂

La estabilidad del receptor anterohipofisario de estradiol puede ser alterado bajo diferentes condiciones experimentales (tiempo y temperatura de incubación, concentración de proteínas, concentración óptima de carbón-dextrano) las que se han esquematizado en las siguientes figuras.

RATA NORMAL

En la Figura 6, se observa la asociación de E₂ (³H) a los receptores totales en citosol de hipófisis de rata normal en función de la temperatura de incubación. La máxima unión se llevó a cabo a 22°C.

En la figura 7, se grafica la concentración de sitios receptores totales de animales normales en función del tiempo de incubación a las 4 horas.

Considerando entonces como condiciones óptimas de incubación 22°C/3 hs. se analizó la asociación de estradiol (³H) como una función de la concentración de proteínas citosólicas, demostrándose la linealidad de la unión específica (Figura 8).

Se determinó la concentración óptima de carbón dextrano (Figura 9). A bajas concentraciones de carbón, permanecen en el

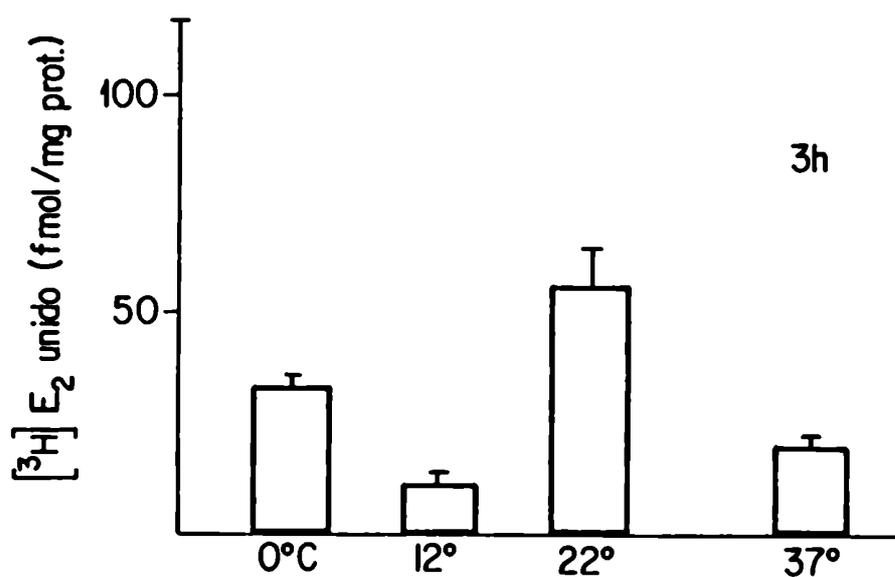


Figura 6. Asociación de ^3H -E₂ a receptores hipofisarios en función de la temperatura de incubación. Se realizó incubando una concentración saturante de ^3H -E₂ a diferentes temperaturas.

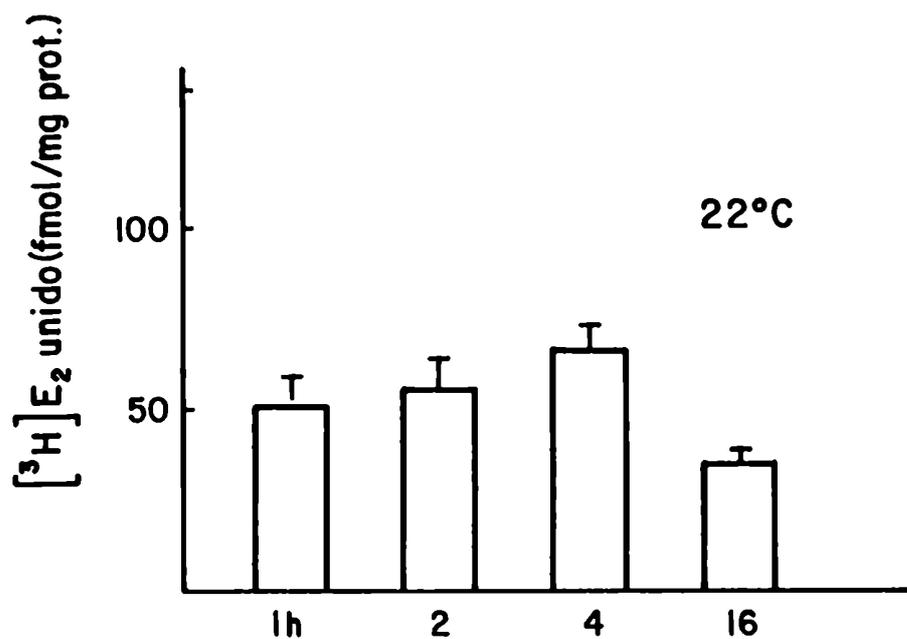


Figura 7. Asociación de ³H-E₂ a receptores hipofisarios en función del tiempo de incubación. Se realizó incubando con un único punto de saturación a distintos tiempos.

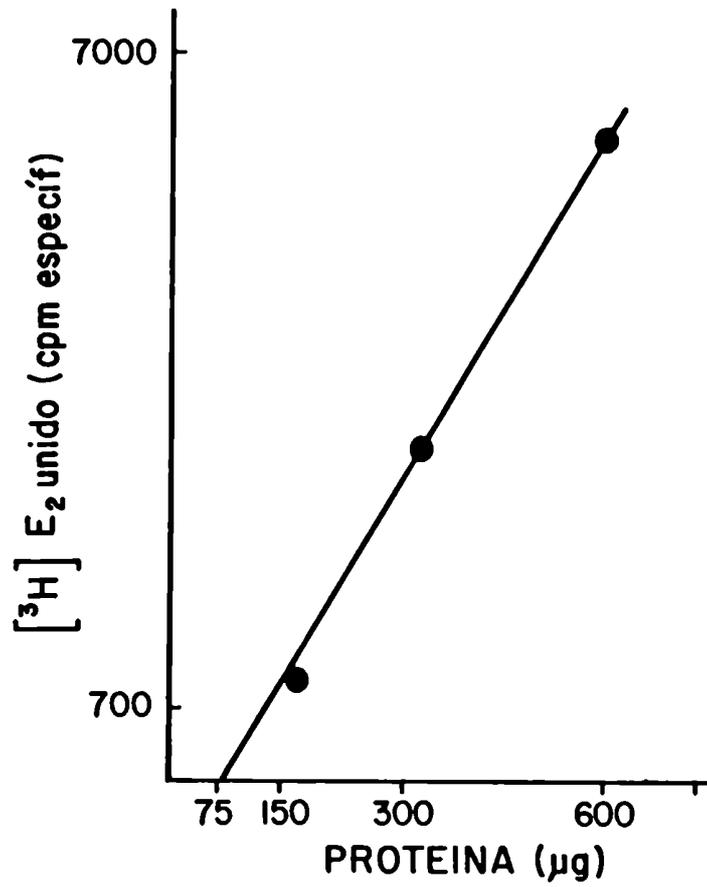


Figura 8. Unión de $^3\text{H-E}_2$ a receptores hipofisarios en función de la concentración proteica en distintas diluciones del tejido. La resultante es una recta de coeficiente de correlación $r = 0,98$.

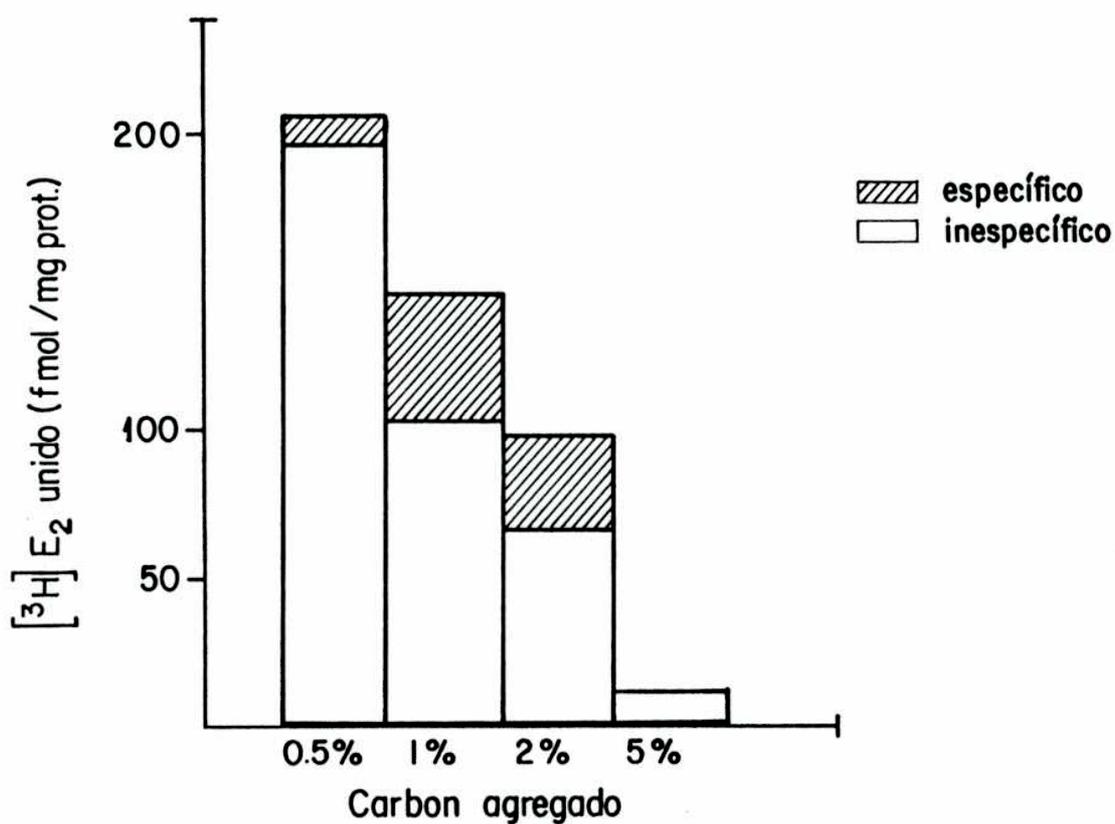


Figura 9. Unión de $^3\text{H-E}_2$ a receptores de hipófisis en función de distintas concentraciones de carbón-dextrano.

sobrenadante esteroide libre sin absorber derivando en valores elevados de unión inespecífica.

A concentraciones demasiado altas el carbón compite con el receptor por el esteroide disminuyendo la unión específica (^3H)-estradiol a distintas concentraciones de carbón y una concentración de proteínas.

Aunque la unión específica es lo que se desea determinar es conveniente que el porcentaje de unión no específica sea lo mejor posible. Esto se obtuvo entre 1% y 4% de carbon, por lo tanto, se eligió trabajar en lo sucesivo con una concentración 2% de carbón y 0,2% de dextrano.

Ya que los estrógenos interactúan también en forma directa a nivel hipotalámico, seguramente a través de un mecanismo de retroalimentación, y, como cambios en la concentración hipofisaria de TSH pueden ser reflejo de alteraciones de TRH en los núcleos hipotalámicos, se consideró oportuno determinar los sitios de unión del esteroide ^3H en las fracciones citosólicas y nuclear de hipotálamo de estos animales. En forma similar a lo que se realizó con el tejido hipofisario se incubaron muestras de citosol y núcleo (200 μl) de hipotálamo en presencia o ausencia de $^3\text{H} - \text{E}_2$ 10 nM (Figura 10 y 11).

Para el receptor anterohipofisario de estradiol se obtuvo una típica curva de saturación (Figura 12) (a)

La saturación del receptor a una concentración de $\text{E}_2 - (^3\text{H})$ correspondiente a 9 nM indica su limitada capacidad. Al

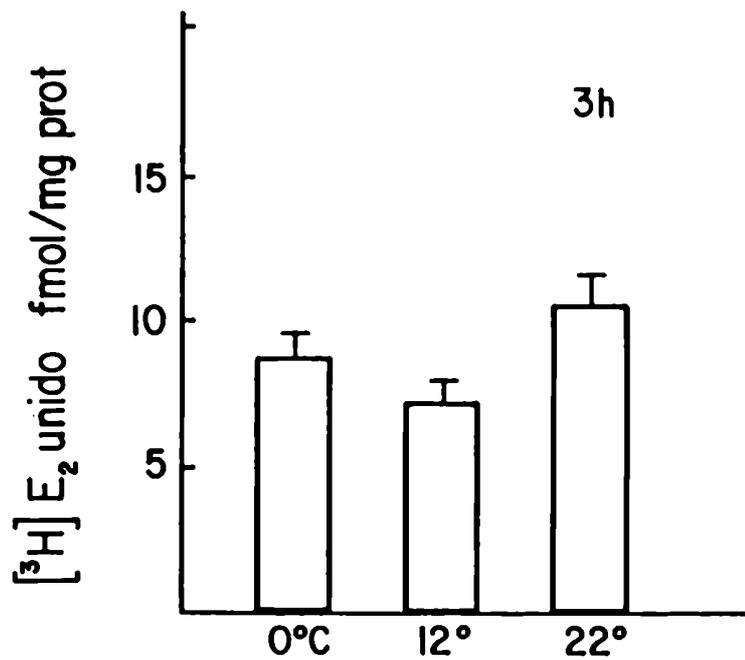


Figura 10. Asociación de $^3\text{H-E}_2$ a receptores hipotalámicos en función de la temperatura. Se realizó incubando una concentración saturante de $^3\text{H-E}_2$ a diferentes temperaturas.

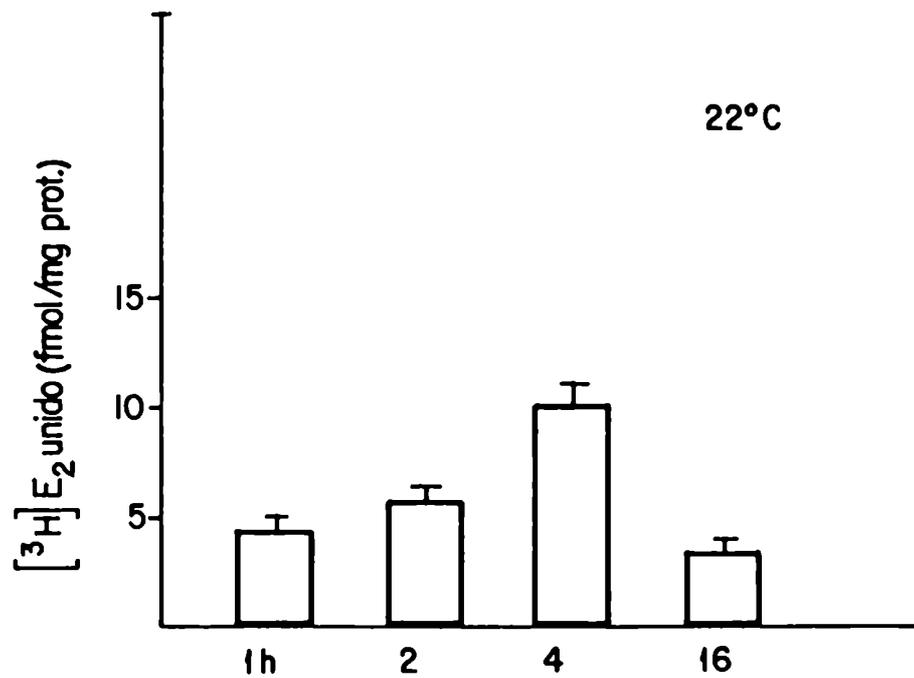


Figura 11. Asociación de ³H-E₂ a receptores de hipotálamo en función del tiempo de incubación. Se realizó incubando con un único punto de saturación a distintos tiempos.

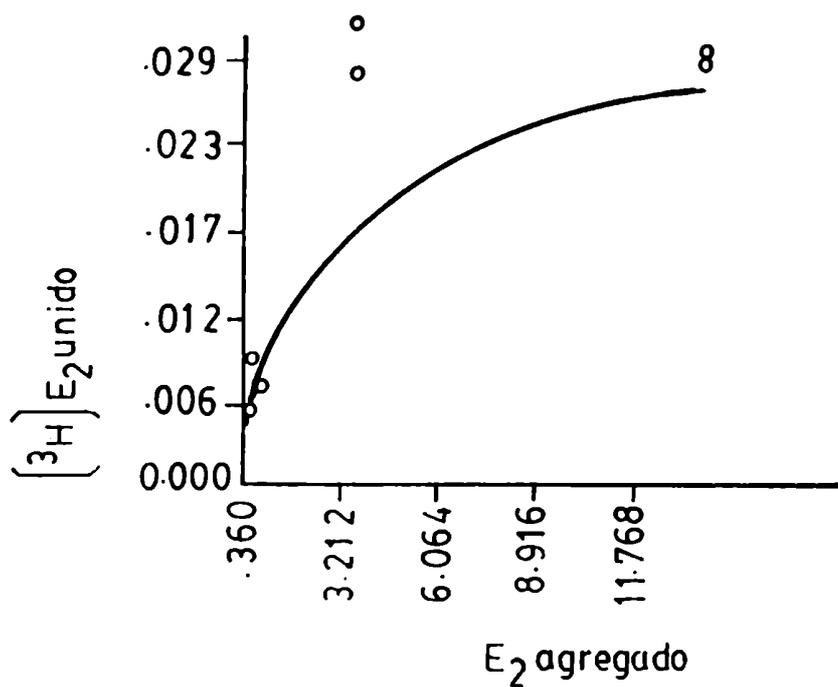


Figura 12 a. Curva de saturación de la unión de ³H-E₂ a receptores hipofisarios. la unión específica se calculó restando la unión no específica a la total.

analizar estos datos mediante la linealización de Scatchard (Figura 12) (b), se obtuvo una constante de disociación K_d de 0,17 nM y un número de sitios de unión de 126 fmol/mg. de proteínas.

RECEPTORES DE ESTROGENOS EN EL CITOSOL DE HIPOFISIS

HIPOTIROIDISMO

Considerando como control la rata eutiroidea, en una primera etapa decidimos investigar si la privación de hormonas tiroideas, es decir, si la rata hipotiroidea mostraba diferencias en la concentración de receptores para estradiol en la glándula hipofisaria. Se incubó una alícuota (200 μ l) de citosol con una concentración saturante (10 nmol/l) de estradiol-(3 H). Se llevaron a cabo incubaciones paralelas con la hormona tritiada diluída con un exceso de 500 veces de estradiol no radioactivo, para obtener la unión hormona-receptor no-específica.

Este valor fue rutinariamente restado a la unión total para alcanzar la unión específica.

Se describen los sitios específicos de unión para estradiol en citosol de hipófisis de la rata normal (eutiroidea). En la rata hipotiroidea la concentración del receptor para E_2 fue significativamente menor ($P < 0,01$) respecto a los controles eutiroideos.

El tratamiento con estrógenos, en todos los casos utilizamos el benzoato de E_2 , causó una leve disminución en los sitios de unión ($P < 0,05$); mientras que el tratamiento con T_4 in

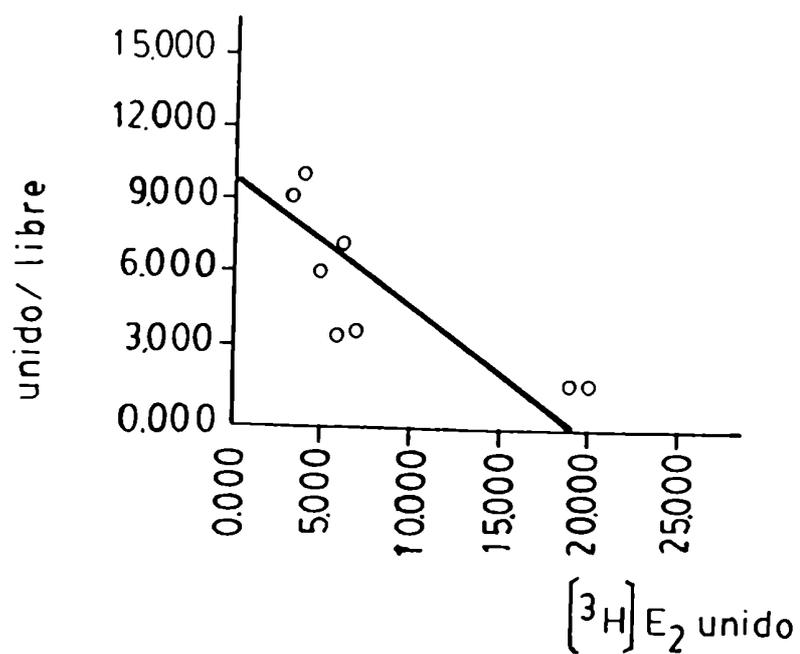


Figura 12 b. Análisis de Scatchard del receptor de estradiol. Este gráfico proviene del análisis de los datos de la curva de saturación mostrada en la Figura 12 a.

dujo un aumento significativo ($P < 0.01$) en los niveles del receptor de estradiol (Figura 13)

El análisis de Scatchard reveló una constante de afinidad (K_d) de $0,11 \pm 0,06$ nmol/l en el grupo hipotiroideo sin tratar, que se mantuvo dentro del rango encontrado en los controles eutiroides (K_d) de $0,17 \pm 0,05$ nmol/l.

RECEPTORES DE ESTROGENOS EN EL NUCLEO DE HIPOFISIS

Como en el caso de los receptores citosólicos, la concentración del receptor en el núcleo de la hipófisis del animal hipotiroideo se encuentra significativamente disminuido ($P < 0,01$) en comparación con las ratas eutiroides (Figura 14). La administración de T_4 , estradiol o ambas hormonas simultáneas fue seguido de un aumento en los niveles del receptor nuclear ($P < 0,01$) vs el animal hipotiroideo sin tratar. La K_d en las ratas hipotiroideas sin tratar ($1,87 \pm 0,22$) no modificó significativamente la respuesta de la rata control ($2,87 \pm 0,097$).

RECEPTORES DE PROGESTERONA EN EL CITOSOL DE HIPOFISIS

Como es sabido, los estrógenos inducen la síntesis de receptores de progesterona en los órganos blanco.

De manera que se determina el receptor hipofisario de progesterona ya que se considera como un marcador potencial para las respuestas estrogénicas. En nuestros estudios se intentó

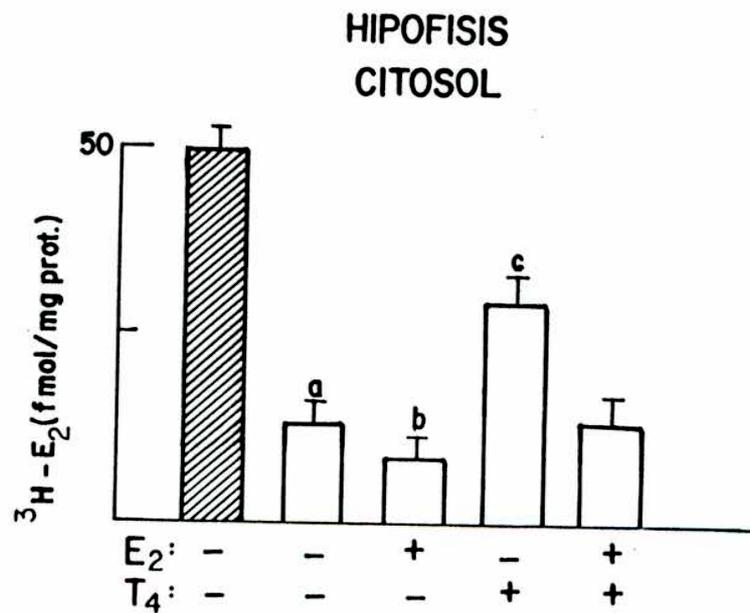


Figura 13. Efectos de T₄ estradiol o ambas hormonas sobre la concentración de receptores para estrógenos en el citosol de hipófisis. Los valores son el promedio \pm DS de 12 ratas, ^aP < 0,01 comparadas con las ratas eutiroides (test de Duncan). ^bP < 0,05, ^cP < 0,01 comparadas con las ratas hipotiroides sin tratar (test de Dunnett).

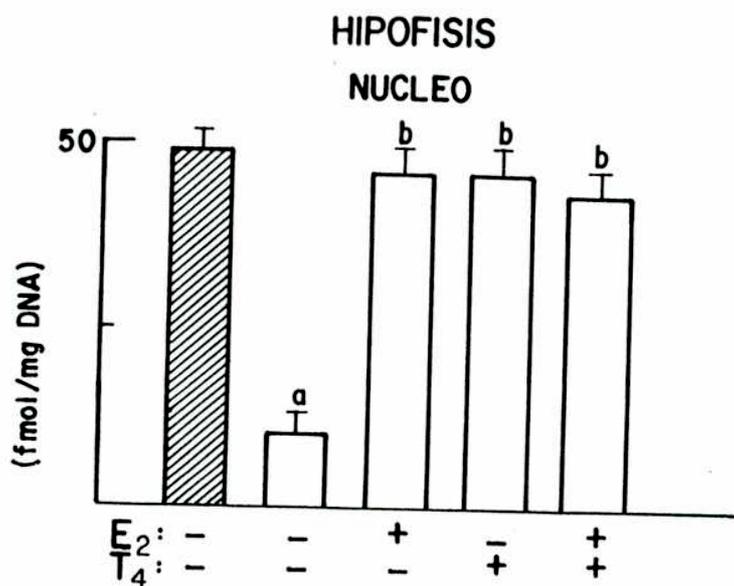


Figura 14. Efectos de T₄ estradiol o ambas hormonas sobre los receptores para estrógenos en la fracción nuclear de hipófisis. Los valores son el promedio \pm DS de 12 ratas. ^aP < 0,01 comparadas con las ratas eutiroides; ^bP < 0,05 comparadas con los animales hipotiroideos sin tratar.

correlacionar los receptores de progesterona en el citosol de hipófisis con los receptores de estrógenos en el núcleo de hipófisis, tomando como modelo la rata tiroidea. En la Figura 15 se observa una marcada disminución del receptor de progesterona en la rata hipotiroidea en comparación con la rata eutiroides control ($P < 0,05$). El tratamiento con T_4 o $T_4 + E_2$ no fue eficiente en revertir el nivel del receptor de progesterona.

RECEPTOR DE ESTRADIOL CITOSOLICO Y NUCLEAR DE HIPOTALAMO

Como se observa en la Figura 16 el hipotiroidismo no modificó la concentración de receptores estrogénicos en el citosol del tejido hipotalámico, aunque la concentración nuclear fue significativamente menor ($P < 0,01$) que en las ratas eutiroides. Sólo el tratamiento con T_4 causó un moderado incremento ($P < 0,05$) de los receptores de estrógenos citosólicos de las ratas hipotiroideas. La T_4 , estradiol o ambas hormonas no tuvieron efecto sobre el receptor nuclear del tejido hipotalámico.

Las constantes de disociación no fueron afectadas por el hipotiroidismo, ni en la fracción citosólica ($K_d = 0,096 \pm 0,013$ vs $0,10 \pm 0,08$ nmol/l, en el grupo eutiroides) ni en la fracción nuclear ($K_d = 0,21 \pm 0,05$ vs $0,19 \pm 0,03$ nmol/l).

Las ratas hipotiroideas tienen un mayor número de receptores hipofisarios de TRH, los cuales aumentan aún más luego de la administración de estrógenos (219). Es razonable especular que en ausencia de hormonas tiroideas, la administración de estrógenos pueda haber aumentado los receptores de TRH en

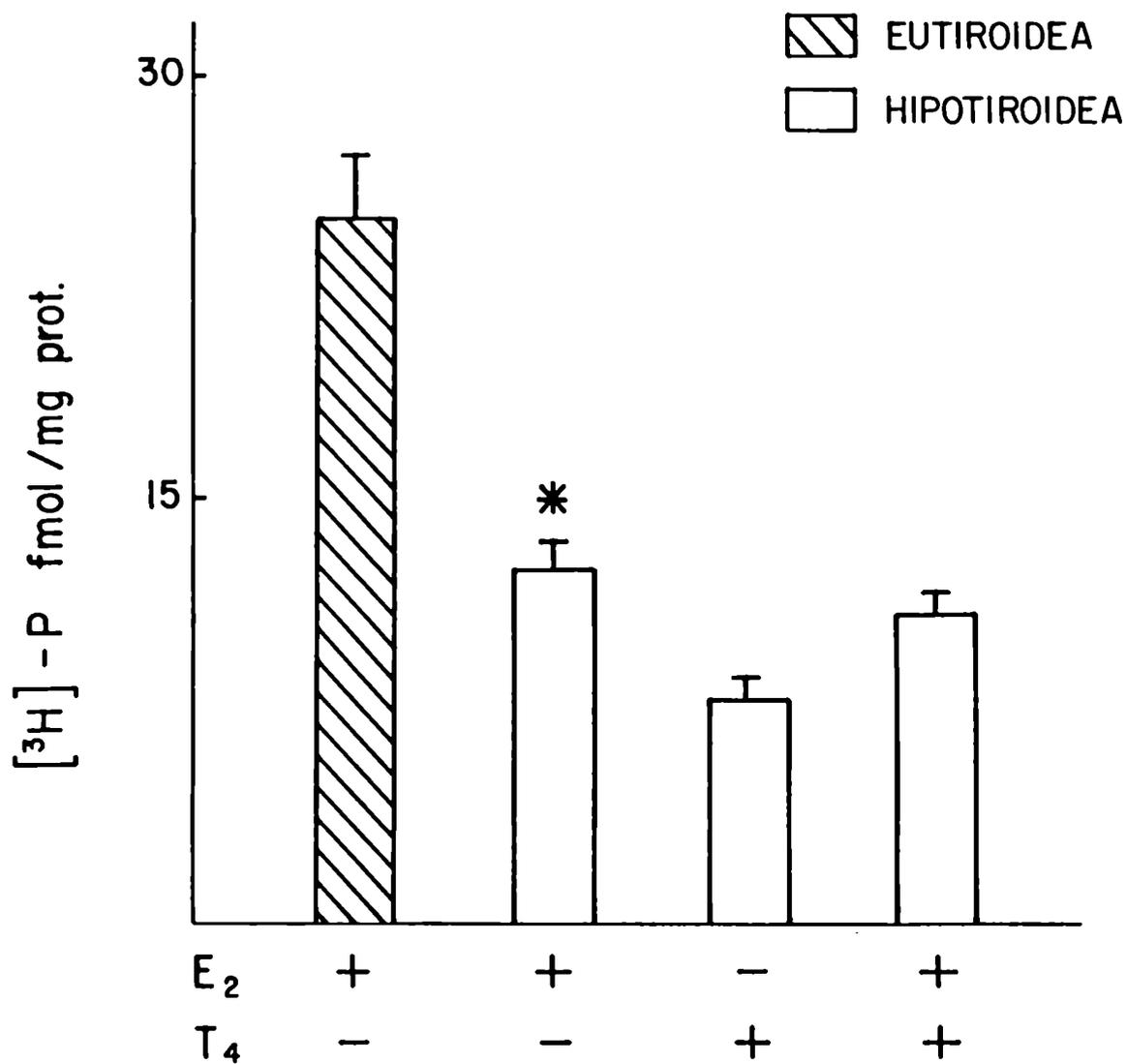


Figura 15. Efectos de T₄, E₂ o ambas hormonas sobre los receptores para progesterona (P) en citosol de hipófisis. Los valores son el promedio ⁺ - DS de 10 ratas. * P < 0,05 respecto a los animales control.

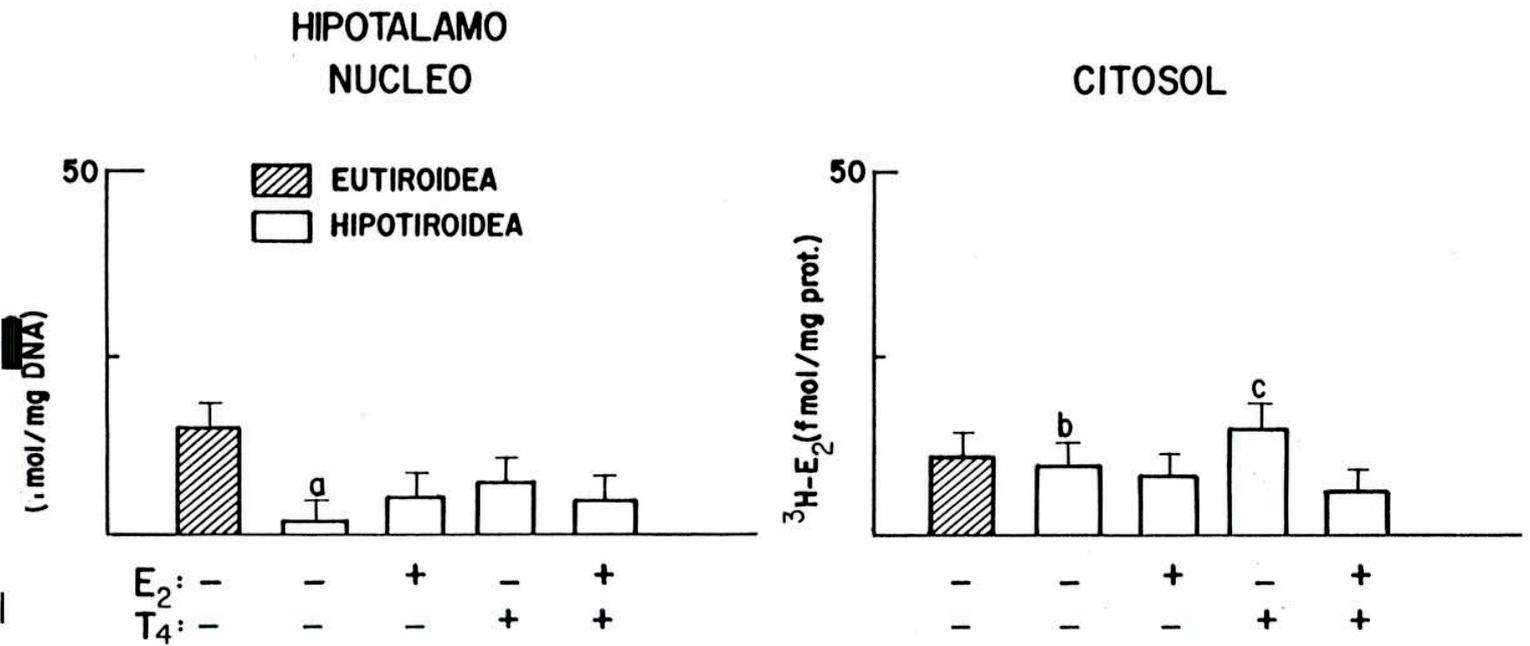


Figura 16. Efectos de T₄ estradiol o ambas hormonas sobre la concentración de receptores para estrógenos en citosol y núcleo de hipotálamo. Los valores son el promedio \pm DS de 10 ratas. ^aP < 0,01 comparados con las ratas eutiroideas (fracción nuclear). ^bP < 0,05, ^cP < 0,01 comparados con las ratas hipotiroideas sin tratar.

la hipófisis y pueda haber contribuido a la liberación ya incrementada de TSH.

Esta interpretación parece consistente con los resultados descriptos, en que hemos mostrado que, en ausencia de hormonas tiroideas, los receptores para E_2 en los núcleos de la hipófisis se encuentran aumentados luego de la administración de estrógenos. Sin embargo, esta hipótesis no explicaría la secreción acelerada de TSH en ratas hipotiroideas sin tratar, en las cuales el nivel basal de los receptores nucleares de pituitaria, están marcadamente disminuidos.

Además, la administración de estrógenos (incluyendo benzoato de estradiol) es seguido de una caída en los receptores dopaminérgicos en la anterohipófisis (222) y éso altera la velocidad de recambio de la dopamina en el hipotálamo (223) así como la secreción de dopamina dentro del sistema porta-hipofisario (224). En forma similar, los receptores de dopamina durante el hipotiroidismo se encuentran aparentemente disminuidos quizás como resultado de la deficiencia de hormonas tiroideas. Tales cambios en la concentración del receptor de DA se correlacionan con la producción acelerada de TSH en el hipotiroidismo durante la administración de estrógenos.

Si bien se hace difícil sacar conclusiones sobre estos datos, consideramos que la falta de hormonas tiroideas contribuyen a deprimir los receptores de estrógenos en la glándula hipofisaria durante el hipotiroidismo, ya que la administración de T_4 a ratas hipotiroideas aumentan significativamente la concentración de receptores de estrógenos en

el citosol y núcleo de la glándula hipofisaria y en el citosol de células hipotalámicas.

5. MODIFICACION DE LOS PARAMETROS TIROIDEOS POR EL EGF

5.1. RESULTADOS Y DISCUSION - EFECTO DEL EGF SOBRE LA SECRECION IN VIVO DE TSH

Como es sabido la infusión continua de TSH induce una estimulación bifásica de TSH:

La primera se lleva a cabo dentro de los primeros 5 minutos del comienzo de la infusión, llegando a un punto de saturación aproximadamente a los 50-90 minutos, y la segunda fase, se registra a partir de los 90 minutos, manteniéndose alta hasta los 150 minutos (214). Este perfil de secreción de TSH estaría asociado a la presencia de dos "pooles" hipofisarios de TSH, quizás el primero responsable de la secreción y el segundo de la síntesis hormonal.

Como el rol de EGF sobre el eje hipófiso-tiroideo, y en particular sobre la secrecion de TSH, aún no se conoce, tomamos como patrón al TRH para los estudios con EGF. Incluso por analogía, bautizamos "prueba de EGF", que consiste en tomar muestras de sagnre 10 minutos antes y 10 minutos después de inyectar a la rata, por vía endovenosa EGF, y determinar así el efecto de este factor sobre la secreción plasmática de TSH (Figura 17 a).

Como puede apreciarse en la figura, utilizamos una úni-

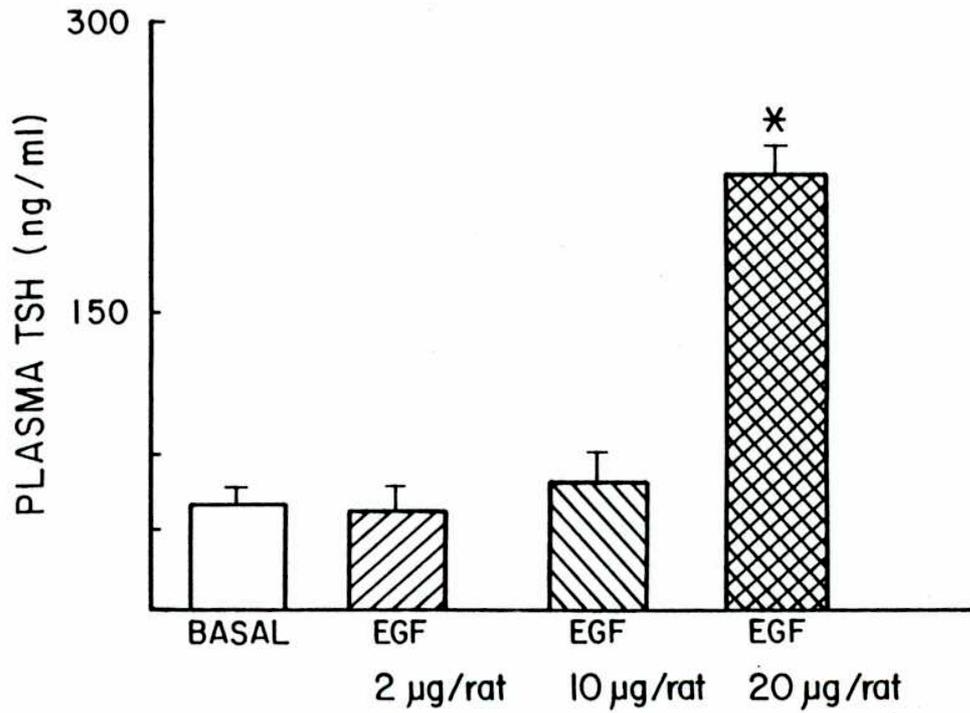


Figura 17 a. Curva dosis-respuesta del EGF sobre la concentración plasmática in vivo. Se utilizaron tres dosis de EGF: 2 µg, 10 µg y 20 µg/rata. Los valores son el promedio \pm DS de 10 animales * $P < 0,05$ respecto a los niveles basales de TSH.

ca concentración de TRH ($2 \mu\text{g}/\text{rata}$) que ya lo habíamos utilizado anteriormente y 3 dosis diferentes de EGF ($2 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$ y $20 \mu\text{g}/\text{rata}$). La concentración plasmática de TSH aumentó significativamente ($P < 0,05$) luego de la inyección del TRH. La menor concentración de EGF ($2 \mu\text{g}/\text{rata}$) no produjo cambios en la respuesta de TSH respecto al basal; $10 \mu\text{g}/\text{rata}$ de EGF indujo un aumento si bien reproducible, no fue significativo.

La concentración plasmática de TSH aumentó significativamente ($P < 0,05$) luego de la inyección de $20 \mu\text{g}/\text{rata}$ de EGF. Tal concentración de EGF representa con exactitud la dosis equimolar a la del TRH (10^{-5}M) (Figura 17 b).

INHIBICIÓN "IN VIVO" DEL EFECTO DEL EGF POR T_4

Se confirmó la acción del factor de crecimiento al tratar con $100 \mu\text{g}/\text{rata}$ de T_4 durante 1 hora a estos animales para suprimir la secreción de TSH.

Se tomaron muestras de sangre 10 minutos antes y 10 minutos después de la inyección endovenosa de TRH o EGF a estas ratas tratadas con T_4 (tabla 3). La acción de la T_4 se hizo presente al inhibir no sólo la secreción basal de TSH, sino la estimulada tanto por TRH como por EGF.

EFECTO DEL EGF SOBRE LA SECRECIÓN IN VITRO DE TSH

Colocadas las hipófisis en el medio de incubación, alcanzan el estado estacionario de secreción después de 2 horas de perfusión.

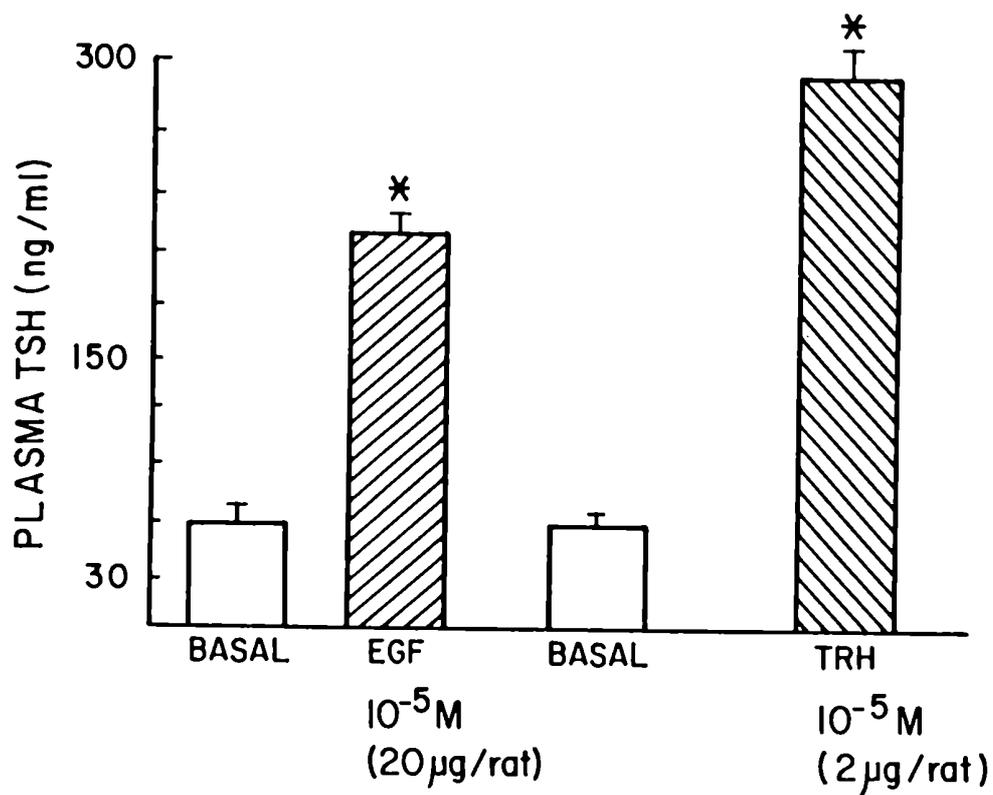


Figura 17 b. Dosis equimolares de EGF y TRH sobre la concentración plasmática de TSH . * P < 0,05 en comparación con los respectivos basales.

| | TRH | EGF |
|--------------|-----|-----|
| (%) BASAL | 100 | 100 |
| (%) ESTIMULO | 128 | 149 |
| | 108 | 121 |
| | 130 | 139 |
| | 137 | 158 |
| | 108 | 126 |

Tabla 3. Inhibición "in vivo" por T_4 de la acción del EGF y del TRH.

Luego de realizar los controles metodológicos (estimulación por TRH o inhibición por T_4), estudiamos el efecto de diferentes concentraciones de EGF sobre la secreción hipofisaria de TSH. Este factor se inyecta en la camarita que contiene la glándula pituitaria en forma de un pulso, de manera tal de alcanzar las siguientes concentraciones finales instantáneas: 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} y 10^{-8} M. (Figura 18).

En la figura 19 se muestra como ejemplo un experimento tipo.

La concentración de 10^{-8} M es la que produce una mayor estimulación en la liberación de TSH y la que garantiza el "plateau", en consecuencia se eligió esta concentración para realizar nuevos experimentos.

El valor basal de TSH fue aproximadamente 30-33 ng/ml, el cual fue expresado como el 100% y calculado como el promedio de los valores correspondientes a las 6 primeras fracciones recogidas.

La estimulación ocasionada por el factor de crecimiento epidérmico en la secreción de TSH es dosis dependiente. 10^{-11} M de EGF no afectó los niveles basales de tirotrófina; 10^{-10} M causó un aumento, aunque no fue significativo, 10^{-9} M de EGF produjo un pico aproximadamente 4 veces superior al valor basal de TSH.

Con la finalidad de estudiar la acción conjunta de TRH

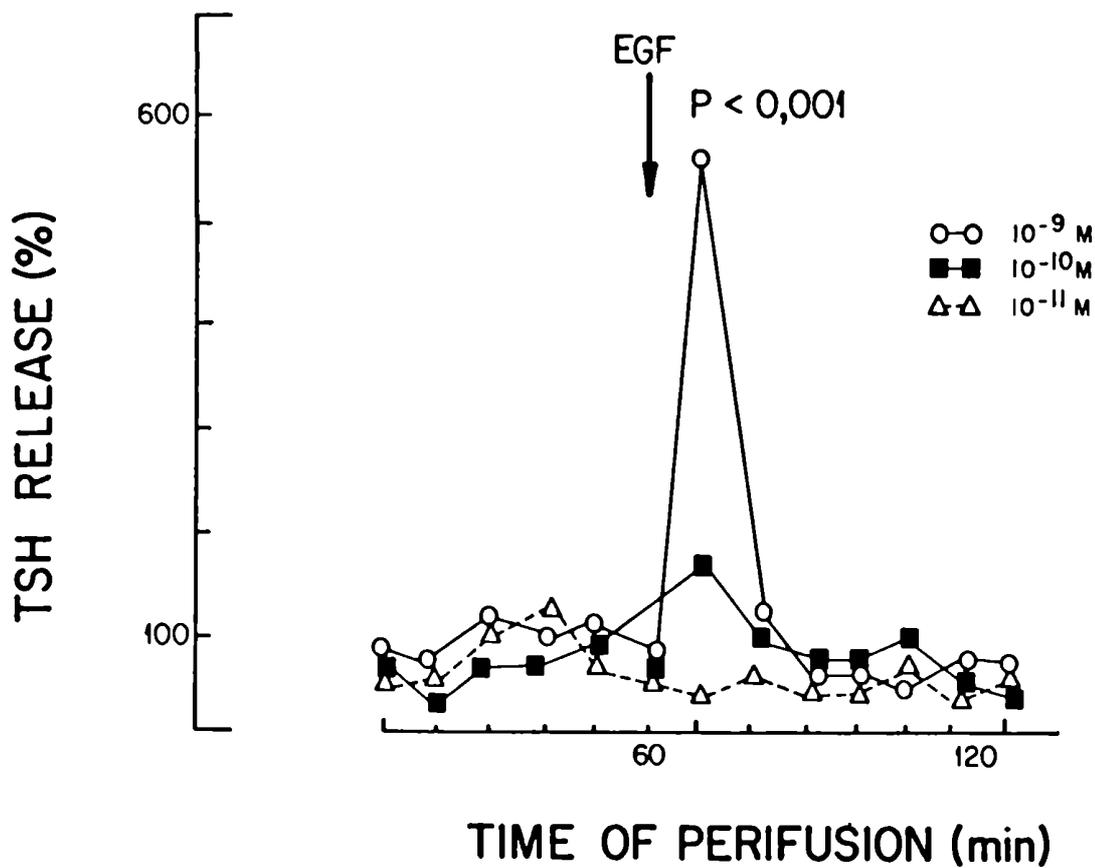


Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones de EGF sobre la secreción de TSH en hipófisis perifundidas.

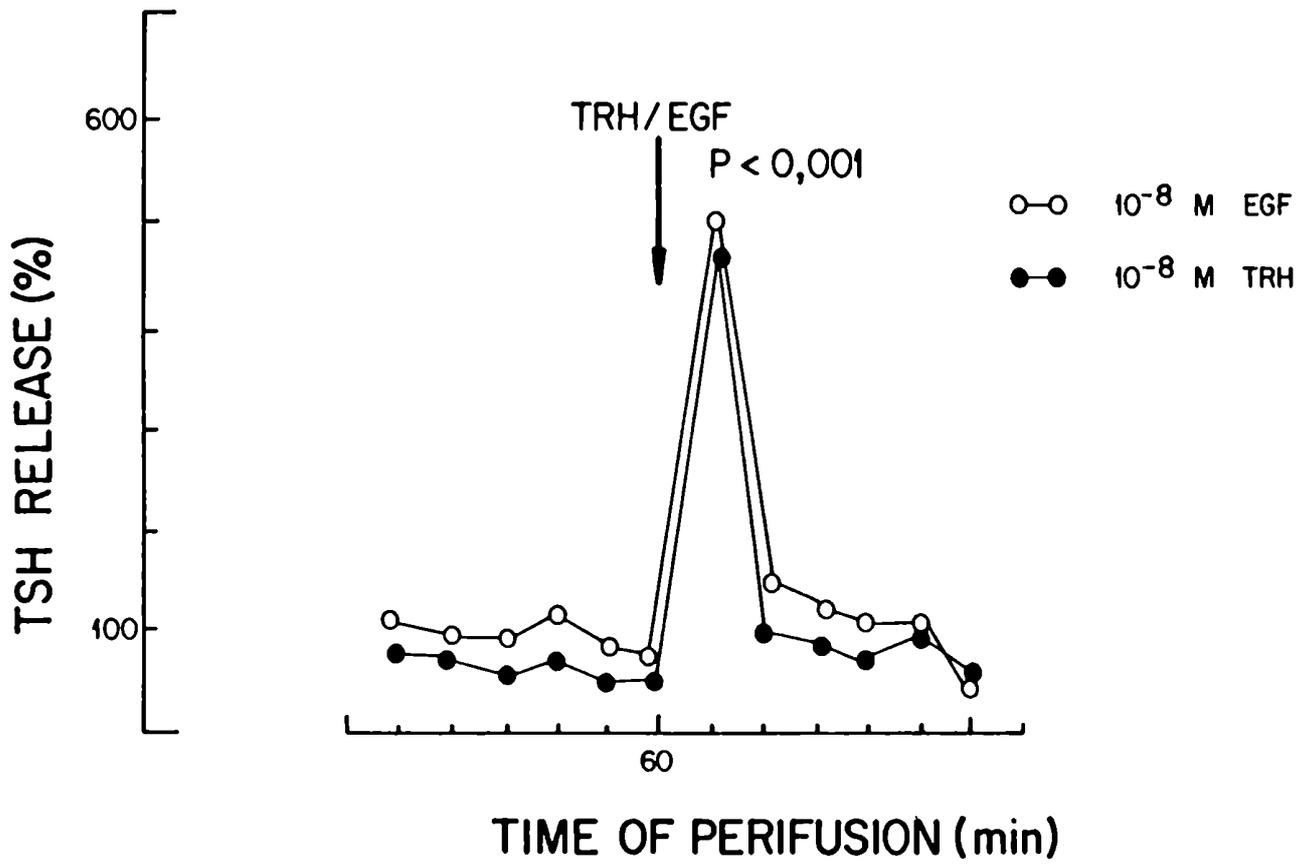


Figura 19. Acción "in vitro" de EGF (10^{-8} M) ó TRH (10^{-8} M) sobre la secreción hipofisaria de TSH.

(10^{-8} M) y de EGF (10^{-8} M), se incubaron individualmente las glándulas anterohipofisarias en presencia de ambos pépticos (Figura 20). El EGF inyectado en combinación con el TRH no modifica el efecto estimulador de la neurohormona.

Por otra parte, sabemos que el TRH es un agente de estimulación fisiológica no sólo de la tirotrófina, sino también de la prolactina.

Decidimos entonces, estudiar si el EGF es capaz de afectar la liberación de Prl como lo hace con la TSH. En la Figura 21 confirmamos el efecto estimulador del TRH (10^{-8} M) tanto sobre la secreción de TSH como de Prl. Sin embargo, el EGF (10^{-8} M), dosis suficiente como para estimular la liberación de tirotrófina, no alteró el perfil de secreción de prolactina. (Figura 22).

INHIBICION IN VITRO DEL EFECTO DE EGF POR T_4

Se confirmó la acción del factor de crecimiento al tratar con $100 \mu\text{g.}/\text{rata}$ de T_4 durante 1 hora a estos animales, para suprimir la secreción de TSH.

Se colocaron los tejidos en el sistema de perfusión (materiales y métodos), y se examinó la respuesta de las hipófisis suprimidas a la concentración de EGF que causa una máxima respuesta de TSH (Tabla 4). La acción de la T_4 se hizo presente al inhibir no sólo la secreción basal de TSH, sino la estimulada por TRH como por EGF. Estos datos completan, en parte, lo

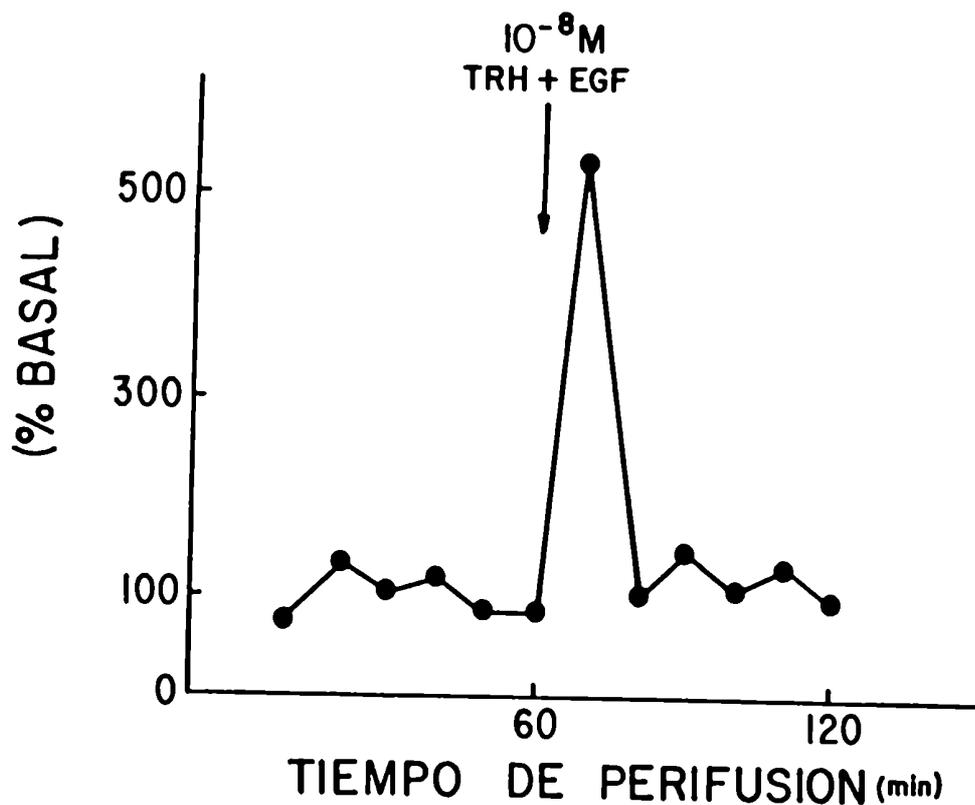


Figura 20. Acción conjunta de TRH y de EGF sobre la secreción de TSH. Se incubaron individualmente las glándulas hipofisarias a igual dosis de ambos péptidos.

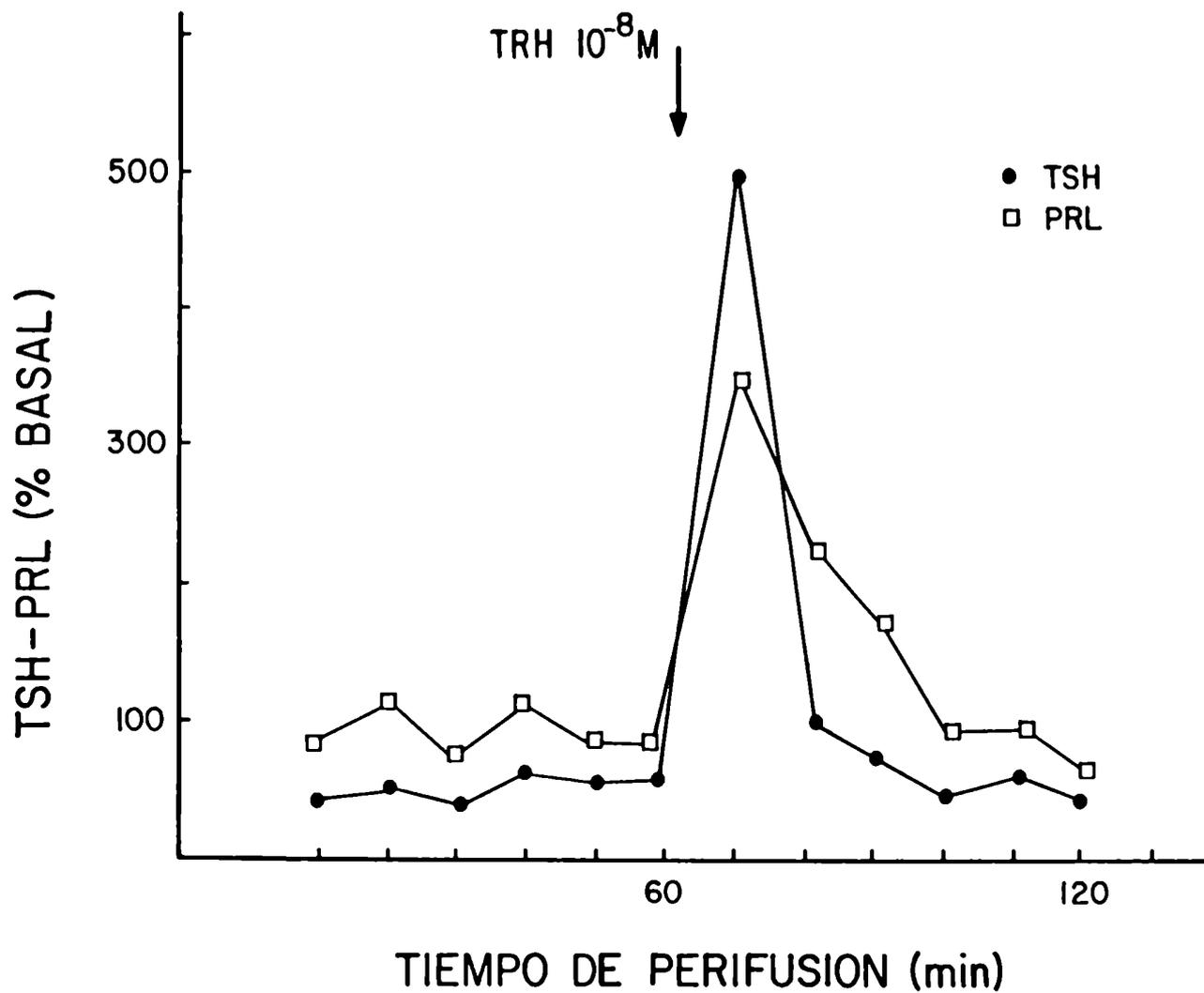


Figura 21. Efecto del TRH (10^{-8} M) sobre la secreción de TSH y Prl en hipófisis perifundidas.

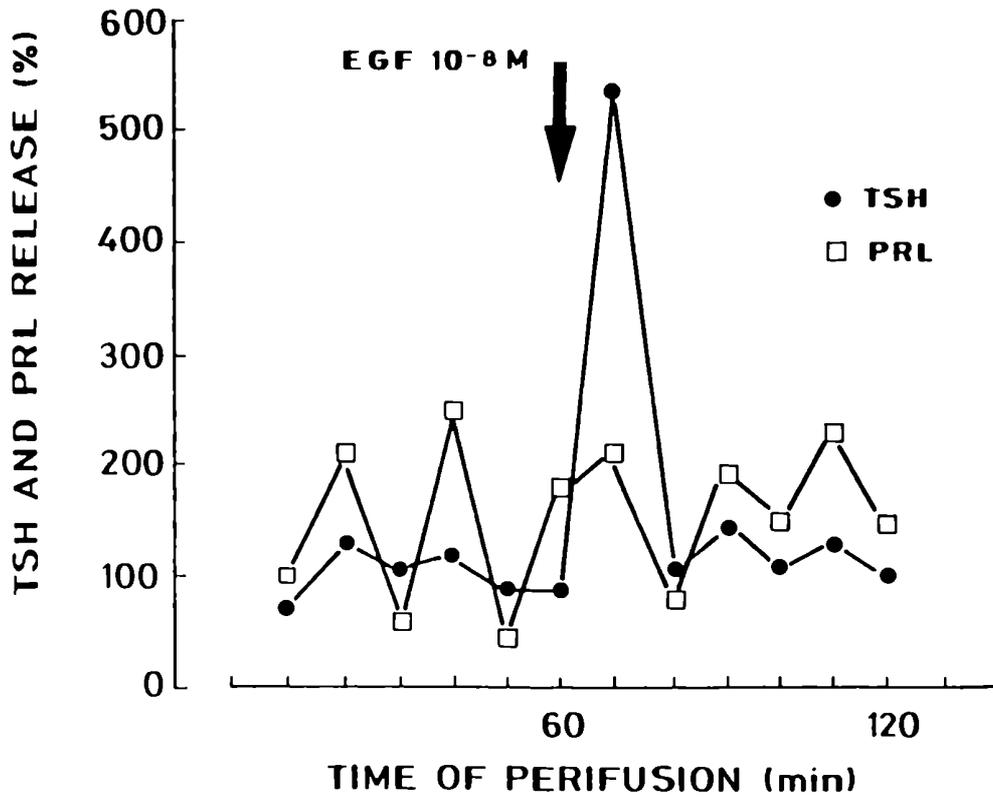


Figura 22. Perfil de secreción de TSH y Prl luego de un pulso de 10^{-8} M de EGF.

| | TRH | EGF |
|--------------|-----|-----|
| (%) BASAL | 100 | 100 |
| (%) ESTIMULO | 144 | 108 |
| | 127 | 163 |
| | 94 | 91 |
| | 103 | 102 |
| | 116 | 129 |
| | 105 | 118 |

Tabla 4. Inhibición "in vitro" de la acción del EGF y del TRH por la T_4 .

observado en experimentos anteriores, acerca de un cierto grado de especificidad en cuanto a la acción del EGF sobre la secreción hipofisaria de TSH.

- 1) Estimulación del EGF sobre la secreción de TSH in vivo e in vitro.
- 2) Inhibición por T_4 de la activación del EGF sobre la secreción de TSH.
- 3) Estimulación por EGF de la secreción de TSH y no de Prl.

Estos datos constituyen una fuerte evidencia en favor de postular al factor de crecimiento epidérmico (EGF) como un posible regulador de ciertas funciones endócrinas.

Una posible explicación a la estimulación de la liberación de tirotrófina por el factor de crecimiento podría ser, en parte, la sugerencia de Kaji y Hinkle (185) respecto a la inhibición de la producción de hormona de crecimiento por el EGF.

Estos autores demostraron que el EGF deprime los receptores hipofisarios de T_3 , indicando una relación temporal consistente con la idea que la reducción de la producción de GH - inducida por T_3 , es causada por la reducción en los receptores de T_3 . En forma similar, podría ser que si el EGF disminuye los receptores hipofisarios de T_3 , se frene el mecanismo de retroalimentación y como consecuencia, aumente la salida de TSH a la circulación.

Sin embargo, consideramos que el tiempo necesario para que el EGF module los receptores de T_3 y luego incremente la liberación de TSH es mayor que el tiempo en que observamos en este estudio, que el EGF estimuló la secreción de tirotrófina (10 minutos); otra alternativa sería que el EGF "comparta" los sitios de acción con el TRH. Queda descartada en principio esta posibilidad ya que cuando se inyectaron ambos péptidos en las camaritas conteniendo las hipófisis, la respuesta del EGF no se comportó en forma sinérgica con la del TRH es decir, no afecta la estimulación de la neurohormona (Figura 20). La interpretación que más nos satisface es que el EGF actuaría a nivel de un secretagogo. Dado el tiempo rápido en que actúa el EGF a nivel de la secreción de TSH, nos inclinamos a pensar que el calcio estaría involucrado facilitando tal acción.

6. CONCLUSION

La información obtenida durante el desarrollo de esta Tesis nos permite postular al estradiol y al factor de crecimiento epidérmico como moduladores de la regulación de la liberación de la hormona tirotrófica.

Como se ha visto en la introducción, además del TRH y las hormonas tiroideas, existen otros factores de regulación de la secreción hipofisaria de TSH, ya sea que actúan directamente sobre la pituitaria o indirectamente, modulando la acción del TRH a nivel hipotalámico o el efecto de las hormonas tiroideas a nivel de la glándula tiroides.

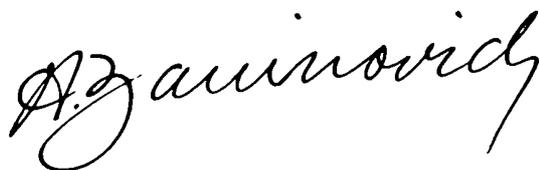
Se ha podido responder a los interrogantes planteados como objetivos de esta manera:

En la primera etapa, en cuanto a la acción del estradiol, confirmamos el rol de esta hormona sobre los niveles circulantes de TSH hallando que los receptores para E_2 localizados en la hipófisis estaban disminuidos en el hipotiroidismo, y que las hormonas tiroideas (T_4) podían restablecer el nivel de dichos receptores.

Así como el estradiol aumenta los receptores hipofisarios de TRH en el hipotiroidismo, de manera proporcional, el estradiol aumenta sus propios receptores en el núcleo de la hipófisis del animal hipotiroideo.

En la segunda etapa, en cuanto a la acción del factor de crecimiento epidérmico, demostramos en forma original, que el EGF aumenta la secreción de TSH, tanto in vivo como in vitro mientras que, fue incapaz de modificar la secreción de Prl, al menos en las condiciones experimentales en que realizamos este estudio.

En síntesis, los datos volcados en esta tesis apoyan la idea de una interrelacion molecular dirigida a regular la economía tiroidea, ya sean moléculas de estructura proteica (EGF) o bien esteroideas (E).



ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| AC | Adenilato ciclasa |
| ADN | Acido desosiribonucleico |
| AMP | Adenosin monofosfato |
| AMP _c | Adenosin monofosfato cíclico |
| db AMP _c | Dibutiril-adenosin monofosfato cí- clico. |
| ARN | Acido ribonucleico |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| DA | Dopamina |
| E | Estrógenos |
| E ₂ | Estradiol |
| 17 - E ₂ | 17 - estradiol |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| GABA | Acido - aminobutírico. |
| GH | Hormona de crecimiento |
| H ₂ O ₂ | Agua osigenada |
| IOPA | Acido iopanoico |
| I | Yodo |
| Ka | Constante de asociación |
| Kd | Constante de disociación |
| MCR | Tasa de depuración Metabólica |
| PGE | Prostaglandina E ₁ |
| PTU | Propil tiouracilo |

| | |
|----------------|-----------------------------------|
| Prl | Prolactina |
| Rc | Receptor citosólico |
| RN | Receptor nuclear |
| RcE | Receptor citosólico de estrógenos |
| RnE | Receptor nuclear de estrógenos |
| T ₃ | Triodotironina |
| T ₄ | Tiroxina |
| TBG | Globulina ligadora de tiroxina |
| TRH | Hormona liberadora de TSH |
| TSH | Tirotrofina |

BIBLIOGRAFIA

- 1: Pierce, J.G. Liao, T. Howard S.M., Shome B., Cornell J.S.
Studies on the structure of Thyrotropin: its relationship
to luteinizing hormone. Recent Prog Horm Res. 27:165, 1971.
- 2: Catt, K.J. Dufau M.L., Tsuruhara T. Absence of intrinsic
biological activity in LH and hCG subunits. I. Clin. Endo-
crinol. Metab. 36:73, 1973.
- 3: Liao, TH, Pierce JG. The presence of a common type of subu-
nit in bovine thyroid-stimulating and luteinizing hormones.
J. Biol.Chem. 245:4327, 1970.
- 4: Amir, S., Carraway T, Kohn L. The binding of thyrotropin to
isolated bovine thyroid plasma membranes. J. Biol. Chem.
248:4092, 1973.
- 5: Lissitzky S., Fayet G., Giraud A. Thyroid stimulating hormone
binding to cultured thyroid cells. FEBS Letters 29:20, 1973.
- 6: Monley, S, Bourke J, Hawker R. Reversible binding of labelled
and non labelled thyrotropin by intact thyroid tissue in vi-
tro. I. Endocrinol. 54:337, 1972.
- 7: Kotani, M. Kariya, T. Field, J. Studies of thyroid stimulating
hormone binding to bovine thyroid plasma membranes. Metabolism.
24, 959, 1975.
- 8: Moore, E., Wolff, J Thyroid-stimulating hormone binding to
beef thyroid membranes. J. Biol. Chem. 249: 6255, 1974.
- 9: De Robertis E, Mancini, R. Ultraestructure and localization
of labelled in the thyroid gland Proceed. Colloquium on the
thyroid, 149, Univ. Brasil, 1961.

- 10: Pochet, R. Boeynaems J, Dumont J Stimulation by TSH of horse thyroid plasma membranes adenylate cyclase: evidence of cooperativity.
B.C. Rcs. Commun. 58: 445, 1974.
- 11: Tesis de Juvenal.
- 12: Field, J. Pituitary thyrotropin: mechanism of action.
The thyroid, 185: Harper y Row NY, 1978.
- 13: Dumont J. The action of thyrotropin in thyroid metabolism Vitam. Horm. 29: 287, 1971.
- 14: Halm N., Granner D., Doughman D, Peters B, Müller G
Biphasic effect of TSH on thyroidal iodide concentrations in rats. Endocrinology 67:70, 1960.
- 15: Knopp, J. Stole V, Tong W. Evidence for the induction of iodide transport in bovine thyroid cells treated with thyroid stimulating hormone or dibutyryl cyclic adenosine 3' , 5' monophosphate. J. Biol. Chem. 245: 4403, 1970.
- 16: Williams I, Malayans. Effects of TSH on iodide transport by mouse thyroid lobes in vitro. Endocrinology. 97: 162, 1975.
- 17: Ahn C., Glycogen metabolism of the thyroid. Endocrinology 88: 1341, 1971.
- 18: Field, J. Pastan I, Johnson P, Herring B. Stimulation in vitro of pathways of glucose oxidation in thyroid stimulating hormone. I Biol. Chem. 235: 1863, 1960.
- 19: De Groot L. Current views on formation of thyroid hormone, N. Engl. J. Med. 272:243, 1965.

- 20: Altman, M. Oka H, Field, J. Effect of TSH, acetylcholine, epinephrine, serotonin and synbavite on ³²P incorporation into phospholipids in dog thyroid slices. BB. Acta. 116: 586, 1966.
- 21: Scott, T. Freinkel N., Klein, J., Nitzan M. Metabolism of phospholipids, neutral lipids and carbohydrates in dispersed porcine thyroid cells; comparative effects of pituitary thyrotropin and dibutyryl 3',5' adenosine monophosphate on the turnover of individual phospholipids in isolated cells and slices from pig thyroid. Endocrinology 87, 5, 1970.
- 22: Gerard, C, Haye B, Jacquemin C, Mauchamp J. Chronic and acute effects of thyrotropin on phosphatidylinositol turnover in cultured porcine thyroid cells. BB Acta 710:359, 1982.
- 23: Burke G., Chang L., Szabs M., Thyrotropin and cyclic nucleotides: effects on prostaglandin levels in isolated thyroid cells. Science 180:872, 1973, .
- 24: Igaraski Y., Konds Y., Transient increase in prostaglandin production as an acute response of thyroid isolated follicles to thyrotropin. BB Res. Commun. 99: 1045, 1981.
- 25: Haye B., Champion S., Jacquemin C. Existence of two pools of prostaglandins during stimulation of the thyroid by TSH FEBS Letters 41:89, 1974.
- 26: Boyenaems J. Pharmacological actions of prostaglandins on the thyroid. Handbook of prostaglandins and related compounds, 46; Churchill-Livingstone, London. 1983.

- 27: Raghupathy E, Abraham S, Kerkof, P, Chaibof, L, Some Characteristics of the sheep thyroid gland system for incorporating amino acids into protein. Endocrinology 74:468, 1964.
- 28: Tong W. Thyrotropin stimulation of ¹⁴C amino acid incorporation in protein by isolated bovine thyroid cells. Endocrinology 80:1101, 1967.
- 29: Lecoq, R., Dumont, J., Stimulation by thyrotropin amino acid incorporation into proteins in dog thyroid slices in vitro. BB Acta 281:434, 1972.
- 30: Pisarev-M, De Groot L, Wilber J. Cyclic AMP production of goiter. Endocrinology 87: 339, 1970.
- 31: Lindsay R, Cash A, Hill J., TSH stimulation of orotic acid conversion to pyrimidine nucleotides and RNA in bovine thyroid. Endocrinology. 84:534, 1969.
- 32: Adiga P, Murthy, P. Mackenzie J. Stimulation of thyrotropin, LATS and dibutyryl 3'5' AMP of protein and RNA synthesis and RNA polymerase activities in porcine thyroid in vitro. Biochemistry. 10:702, 1971.
- 33: Begg, D, Munro H, Action of thyroid stimulating hormone, on acid synthesis slices and in isolated thyroid nucleinate 207:483, 1965.
- 34: Lanry, F, Willems C, Lecoq R, Delacroix, C. Dumont J. Stimulation by thyrotropin in vitro of uridine incorporation into the RNA of thyroid slices- Horm. Metab. Res. 3:414 1971.-

- 35: Pisarev M, Kleiman de Pisarev, D. Action of cyclic nucleotides on protein and RNA Synthesis in the thyroid. *Acta Endocrinologica* 84:297, 1977.
- 36: Winaud R, Wadeleux P, Etienne-Deerf, J. Kohn L. Biochemical basis of thyroid stimulation in using thyroid cells in tissue culture. *Biochemical basis of thyroid stimulation and thyroid hormone actions*. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1976.
- 37: Shuman S, Zor V, Chayeth R, Field J. Exposure of thyroid slices to thyroid stimulating hormones induces refractoriness of the AMP system to subsequent hormone stimulation. *J. Clin-Investigation*. 57:1132, 1976.
- 38: Holmes S., Titins G, Chow M., Field J. Effect of TSH and cholera toxin on the thyroid adenylate cyclase- c AMP system. *Endocrinology* 107:2076, 1980.
- 39: Field J. Bloom G, Chow C, Kerins M. Inhibition of thyroid stimulating hormone stimulation of protein kinase, glucose oxidation and phospholipid synthesis in thyroid slices previously exposed to the hormone. *J Clin Invest*. 59:659, 1977
- 40: Field, J. Dekker A, Bloom G. Kerins M, Fruness R., In vivo and in vitro refractoriness to thyrotropin stimulation of iodide organification and thyroid hormone secretion. *J. Clin Invest*. 64: 265, 1979.
- 41: Shenkman L, Mitsunna T, Suphavai, A, Hollander, C. Response to thyrotropin releasing hormone in man: feedback inhibition by thyroid hormone. *Am J Med Sci*. 263: 431, 1972.

- 42: Sawin C, Hershman J, Chopra, I. The comparative effect of T_4 and T_3 on the TSH response to TRH in young adult men. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 44:273, 1977.
- 43: Larsen P, Dick TE, Markovitz B, Kaplan M, Gand T. Inhibition of intrapituitary thyroxine to 3,5,3¹-triodothyronine conversion prevents the acute suppression of thyrotropin release by thyroxine in hypothyroid rats. *J Clin Invest.* 64:117, 1979.
- 44: Larsen, P. Silva, J, Kaplan, M. Relationship between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. *Endoer Rev.* 2:87, 1981.
- 45: Sterling K. Thyroid hormone action at the cell level. *N. Engl. J. Med.* 300:117, 1979.
- 46: Obregon, M. Pascual A, Mollol, J Marrede de Escobar, G. Escobar del Rey, F. Evidence against a major role of L- T_4 at the pituitary level: studies in rats treated with iopanoic acid. *Endocrinology* 106:1827, 1980.
- 47: Blaquier, J., Calandra, R, *Endocrinologia Molecular.*
- 48: O'Malley B, Means AR Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science,* 183:610, 1974.
- 49: Rochefort, H, Lignon F, Differences between the estradiol and testosterone receptors in rat interns. *Eur. J. Biochem.* 48:503, 1974.
- 50: Jansen, EV, Jacobsen, HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progr. Hormone Res.* 18: 387, 1962.

- 51: Noteboom WD, Gorski J. Sterospecific binding of estrogen in the rat uterus. Arch. Biochem. Biophys - 11:559, 1965.
- 52: King RJ, Mainwaring WI. Cell interactions. Steroid. 1974.
- 53: Murphy, BE. Clinical evaluation of urinary cortisol determinations by competitive protein binding radioassay J. Clin Endocrinol. 28:343, 1968.
- 54: Soloff MS, Creange DE, Potts GO. Unique, estrogen binding properties of rat pregnancy plasma. Endocrinology. 88:427, 1971.-
- 55: Schrader, WT, O'Malley BW. Progesterone binding components of chick oviduct. Characterization of purified subunits. J. Biol. Chem. 247:51, 1972.
- 56: Anderson KM, Liao S. Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei. nature. 219:277, 1968.
- 57: Bruchovsky N, Wilson JD. The intranuclear binding of testosterone and 5 androstan-17 β 3 one by rat prostate. J. Biol. Chem. 243:5953, 1968.
- 58: Gurpide E, Walch M, Dynamics of uptake of estrogens and androgens by human endometrium. J. Biol. Chem. 244:5159, 1969
- 59: Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut, P. De Sambre ER. A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59:632, 1968.
- 60; Shymala G, Gorski J. Estrogen receptors in the rat uterus Studies on the interaction of cytosol and nuclear binding sites. J. Biol. Chem. 244:1097, 1967.

- 61: Anderson JN, Clark JH, Peck EJ. Oestrogen and nuclear binding sites: determination of specific sites by ³H-oestradiol exchange, *Biochem J.* 126:561, 1972.
- 62: Clark, JH, Gorski, J. Estrogen receptors: An evaluation of cytoplasmic-nuclear interactions in a cell-free system and a method for assay. *Biochem Biophys Acta* 192:508, 1969.
- 63: Clark JH, Peck EJ, Nuclear retention of receptor oestrogen complex and nuclear acceptor sites. *Nature* 260:635, 1976
- 64: Clark, JH, Eriksson HA, Hardin JW Uterine receptor-estradiol complexes and their interaction with nuclear binding sites. *J. Steroid Biochem.* 7: 1039, 1976.
- 65: Puce GA, Bresciani, F. Receptor molecules for oestrogen from rat uterine. *Nature.* 218:967, 1968.
- 66: Stancel GM, Laang KM, Gorski, J. Estrogen receptors in the rat uterine. Relationship between cytoplasmic and nuclear forms of the estrogen binding protein. *Biochemistry* 12:2137, 1973.
- 67: Russell J.T. Thomas GH Oestradiol uptake and retention and high affinity binding sites in cultured rabbit uterine. *Biochem J.* 144: 99, 1974.
- 68: Spaulding SW, Burrow GN, Donabedian R, Van Ubert M. L-Dopa. Suppression of thyrotropin releasing hormone response in man. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 35:182, 1972.

- 69: Delitala G. Dopamine and TSH secretion in man. *Lancet* 2:760, 1977.
- 70: Lewis, M, Scaulon M.F., Foord S.M., Shale D.J., Mac Donald C., Hall R. Dopamine inhibits thyrotropin secretion by a direct action in the rat thyrotroph. *Proceedings of the Sixth International Congress of Endocrinology, Melbourne* p.381, 1980.
- 71: Pourmand M., Rodríguez-Arno MD, Weightman DR, Hall R, Cook DB, Lewis M., Scanlon M.F. Domperidone: a novel agent for the investigation of anterior pituitary function and control in man. *Clin. Endocrinol* 12:211, 1980.
- 72: Scanlon, MF, Mora B, Shale DJ, Weightman DR, Heath M, Snow MH, Hall R. Evidence for dopaminergic control of thyrotropin (TSH) Secretion in man. *Lancet* 2: 421, 1977.
- 73: Sowers JR, Mc Callum RW, Hershman JM, Carbon HE, Sturdevant RAL, Meyer N., Comparison of metoclopramide with other dynamic tests of prolactin secretion. *J. Clin Endocrinol Metab.* 43:679, 1976.
- 74: Foord SM, Peters J, Scanlon MF, Rees-Smith B, Hall R. Dopaminergic control of TSH secretion in isolated rat pituitary cells. *FEBS Lett.* 121:257, 1980.
- 75: Vijayan E, Krulich L, Mc Cann SM Catecholaminergic regulation in TSH and growth hormone release in ovariectomized and ovariectomized steroid primed rats. *Neuroendocrinology* 26: 176, 1978.

- 76: Annunziata L, Di Renzo G, Lombardi G, Scopeccina F, Schettine G, Prezioni P, Scapagnini U, The role of central noradrenergic neurons in the control of thyrotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 100:738, 1977.
- 77: Krulich L., Giacchetti, A., Marchlewska Kg. A, Hefese, Jameson ME., On the role of the central noradrenergic and dopaminergic systems in the regulation of TSH secretion in the rat. *Endocrinology* 100: 496, 1977.
- 78: Montoya E, Wilber JF, Lorinez, M. Catecholaminergic control of thyrotropin secretion. *J. Lab. Clin. Med.* 93:887, 1979.
- 79: Morley, JE., Brammer GL, Sharp B, Yamada T, Jucviler A, Herschman J.M. Neurotransmitter control of hypothalamic-pituitary-thyroid function in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 70:263, 1981.
- 80: Hirooka Y, Hollander CS, Suzuki S, Ferdinand, P, Juan S, Somatostatin inhibits, release of thyrotropin releasing factor from organ cultures of rat hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sei USA* 75: 4509, 1978.
- 81: Grimm, Y, Reichlin S, Thyrotropin- releasing hormone (TRH) neurotransmitter regulation of secretion by mouse, hypothalamic tissue in vitro. *Endocrinology.* 93: 626, 1973.
- 82: Nilsson, K.O. Thorell J.I., Hobfelt B, The effect of thyrotropin releasing hormone on the release of thyrotropin and other pituitary hormones in man under basal conditions and following adrenergic blocking agents. *Acta End.* 76:24,1974.

- 83: Rogal AD, Reeves, GD, Varma MM, Blizzard, RM. Thyroid-stimulating hormone and prolactin responses to thyrotropin releasing hormone during infusion of epinephrine and propandol in man. *Neuroendocrinology* 29:413, 1979.
- 84: Peck V, Gershengorn M., Differential regulation of thyrotropin releasing hormone receptors in neoplastic rodent mammatropic, adrenocorticotrophic and thyrotropic cells in culture. *J. Clin, Endocrinol. Metab.* 50: 1144, 1980.
- 85: Snyder SH, Histamine in the brain: a neurotransmitter? In *Perspectives in neuropharmacology* p. 43. New York: Oxford University Press.
- 86: Brownstein M, Saavedra J, Palkovitz M., Axelrod, J. Histaminic content of hypothalamic nuclei in the rat. *Brain Research*, 77: 151, 1974.
- 87: Meyer, V, Knobil E. Growth hormone secretion, in the unanesthetized rhesus monkey in response to noxious stimuli. *Endocrinology* 80:163, 1967.
- 88: Rivier, C, Vale E. Effects of aminobutyric acid and histamine on prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 101: 506, 1977.
- 89: Arakelian M, Libertein C. H₁ and H₂ histamine receptor participation in the brain control of prolactin secretion in lactating rats. *Endocrinology* 100: 890, 1977.
- 90: Libetun C, Mc Cann S. The possible role of histamine in the control of prolactin and gonadotropin release. *Neuroendocrinology* 20:110, 1976.

- 91: Jan YN, Jan LY, Kreffler SW, A peptide as a possible transmitter in sympathetic ganglia of the frog. Proc. Natl. Acad. Sei. USA 76:1501, 1979.
- 92: Bharghava K, Kulshrestha V, Santhakumary, T., Mechanism of histamine-induced antidiuretic response. British J. Pharmacology and Chemotherapy. 47:700, 1973.
- 93: Ramsay, D. Keil L., Sharpe M., Shinsaks J., Angiotensin II, infusion, increases vasopressin, ACTA and II-hydroxycorticosteroid secretion Am J. Physiol 234: RGG, 1978.
- 94: Ulloa E. Zaninovich A. Effects of histamine H₁ and H₂ receptor antagonists on thyrotropin secretion in the rat. J. Endocr. 111:175, 1986.
- 95: Ferrari C, Caldara R, Barbieri C, Biertli L, Romussi M, Prolactin release by intravenous corretidine in man; evidence for a suprapituitary locus of action. Clinical Endocrinology. 11:619, 1979.
- 96: Hinkle P, Tashjian A. Thyrotropin releasing hormone regulates the number of its own receptors in G₃ strain of pituitary cells in culture Biochem. 14: 3845, 1975.
- 97: R. Adams, Rapaport B, Induction of refractoriness to thyrotropin stimulation in culture thyroid cells: dependence on new protein synthesis. J. Biol. Chem. 251: 6653, 1976.
- 98: Vitti, P. De Wolf M. Acquaviva A, Epstein M, Kohn L, Thyrotropin stimulation of the ADP-ribosyltransferase activity of bovine thyroid membranes Proc. Natl. Acad. Sei USA 79: 1525, 1982.

- 99: Catt, K, Harwood J, Aguilera G, Dufau M. Hormonal regulation of peptide receptors and target cell responses. *Nature* 280: 109, 1979.
- 100: Grandison L, Guidotti A. Gamma-aminobutyric acid, receptor function in rat anterior pituitary: evidence for control of PRL release. *Endocrinology* 105:754, 1979.
- 101: Mattila J. Studies on the mechanism of the GABAergic inhibition of TSH secretion in male rats. *Acta Pharmacol Toxicol.* 48:320, 1981.
- 102: Jordan D, Poncet C, Veisseire M, Mornex R. Role of GABA in the control of thyrotropin secretion in the rat. *Brain Res.* 268:105, 1983.
- 103: Mattila, J, Mannisto P. Modification of GABAergic activity and thyrotropin secretion in male rats. *Acta Pharmacol Toxicol.* 47:241, 1980.
- 104: Tapia-Arancibia L, Rousel J, Aster H. Evidence for a dual effect of GABA on TSH-releasing hormone induced TSH release from perfused rat pituitaries. *Endocrinology* 121:980, 1987.
- 105: Schally A, Redding T, Arimura A, Dupont A, Linthicum G. Isolation of gamma-aminobutyric acid from pig hypothalamus and demonstration of its prolactin release inhibiting (PIF) activity in vivo and in vitro. *Endocrinology* 100:681, 1977.
- 106: Enfalbert A, Rubert M, Arancibia S, Fiore, L, Priam M, Kordon C. Independent inhibition of prolactin secretion by dopamine and GABA in vitro. *Endocrinology* 105:823, 1979.

- 1.07: Grossman A, Delitala G., Yer Z, Besser G, GABA and muscimol inhibit the release of prolactin from dispersed rat anterior pituitary cells. Neuroendocrinology. 32:145, 1981.
- 1.08: Roussel, J, Artier H. Tapia, Arancibia L, Benzodiazepines inhibit TRH induced TSH and GH release from perfused rat pituitaries. Endocrinology 119:2519, 1986.
- 1.09: Lambers's, McLeod R. Studies on the mechanism of the GABA mediated inhibition of prolactin secretion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 158:10, 1978.
- 1.10: Matsushita N, Keto Y, Shimatsu A, Katakami, H, Yanaihara, N, Umura M. Effects of VIP, TRH, GABA and dopamine on prolactin release from superfused rat anterior pituitary cells. Life Sci. 321:1263, 1983.
- 1.11: Anderson R, Mitchell R, Biphasic effect of GABA A receptor agonist on prolactin secretion: evidence for two types of GABA A receptor complex on lactotrophes. Eur. J. Pharmacol. 124:1, 1986.
- 1.12: Weeke, J. Hansen, A. Lundback K, Inhibition by somatostatin of basal levels of serum TSH in normal men. J. Clin Endocrinol. Metab. 41:168, 1975.
- 1.13: Weeke, J., Christensen SE, Hansen A, Lawrberg, P, Lundback K., Somatostatin and the 24 h. levels of serum TSH, T₃, T₄ and reverse T₃ in normals diabetics and patients treated for myxedema. Acta Endocrinol. 94: 30, 1980.

- 114: Lenke C, Hoffben B, Won Zur Muhlen A, The effect of somatostatin on TSH levels in patients with primary hypothyroidism. J. Clin Endocrinol. Metab. 41:1082, 1975.
- 115: Hall, R, Besser GM, Schally Av, Cay DH, Evered D., Goldic DJ, Kastin AJ, Mc Neilly AS, Mortimer CH, Phenekos C, Turnbridge WN, Weithman D. Action of growth hormone release inhibitory hormone in healthy men and in acromegaly. Lancet 2: 581, 1973.
- 116: Weeke J, Hansen A, Landback K. The inhibition by somatostatin of the thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone in normal subjects scand. J. Clin. Lab. Invest. 33:101, 1974.
- 117: Reichlin, S. Control of thyrotropic hormone secretion. In: martine L, Ganong WF (eds) neuroendocrinology. Academic Press, New York, vol. 1:445, 1966.
- 118: Vale W, Rivier C, Brazcau P, Guillemin R., Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. Endocrinology 95:968, 1974.
- 119: Borgeat P, Labrie F, Drauin J, Belanger A., Immer A, Sestany K, Nelson V., Gotz, M., Schally AV, Coy, EJ. Inhibition of adenosine 3'5' monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by growth hormone release inhibiting hormone. Biochem. Biophys Res. Commun 56:1052. 1974.

- 120: Belanger A, Labrie, F, Borgeat, P, Savarg M, Cote, J, Drouin J, Schally AV, Coy DH, Coy EJ, Immer H, Sestany K, Nelson V, Gotz, M., Inhibition of growth hormone and thyrotropin release by growth hormone-release inhibiting hormone. *Mol. Cell. Endocrinology*. 1:329, 1974.
- 121: Arimura A, Schally, AV. Increase in basal and thyrotropin releasing hormones-stimulated secretion of thyrotropin by passive immunization with antiserum to somatostatin-*endocrinology* 98:1069, 1976.
- 122: Arimura, A, Gordin, A, Schally, AV, Increases in basal and thyrotropin-releasing hormone-stimulated secretion of thyrotropin and the effects of Ts in rats passively immunized with antiserum to somatostatin. *Fed. Proc.* 35:782, 1976.
- 123: Root AW, Snyder, PJ, Rezvani I, Di George AM, Utiger RD. Inhibition of thyrotropin releasing, hormone mediated secretion of thyrotropin by human growth hormone *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36:103, 1973.
- 124: Porter, BA., Refetoff S, Rosenfeld RL, De Groot L3, Fang VS, Stark B., Abnormal T4 metabolism in hyposomatotropic dwarfism and inhibition of responsiveness to TRH during GH therapy. *Pediatrics* 51: 668, 1975.
- 125: Connors. MH. Alteration of stimulated TSH and prolactin response in children treated with growth hormone . *Life Sei* 21: 1505, 1977.

- 126: Irie M., Tushima T. Increase of serum growth hormone concentration following thyrotropin-releasing hormone infusion in patients with acromegaly or gigantism. *J Clin Endocrinol. Metab.* 35:97, 1972.
- 127: Wilber JF, Utiger RD., The effect of glucocorticoid on thyrotropin secretion. *J. Clin Invest.* 48:2096, 1969.
- 128: Faglia G., Ferrari, C., Beck-Peccoz P., Spada A., Travaglini, P, Ambrosi, B., Reduced plasma thyrotropin response to thyrotropin releasing hormone after dexamethasone administration in normal subjects. *Horm. Metab. Res.* 5: 289, 1973.
- 129: Mc Ewen, BS, de Kloet R, Wallach, Interactions in vivo and in vitro of corticoids and progesterone with cell nuclei and soluble macromolecules from rat brain regions and pituitary. *Brain Res.* 105:129, 1976.
- 130: Funder JF, Barlow J W. Heterogeneity of glucocorticoid receptors. *Circ. Res.* 46: I-83, 1980.
- 131: Pamerter RW, Hedge GA., Inhibition of thyrotropin secretion by physiological levels of corticosterone. *Endocrinology* 106:162, 1980.
- 132: Tashjian, AH, Osborne R, Maina D, Knaian A, Hydrocortisone increases the number of receptors for thyrotropin-releasing hormone on pituitary cells in culture. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 79: 333, 1977.

- 133: Morley, DE, Samvin, CT, Carlson HE, Longcape C, Horshman J.M., The relationship of androgen to the thyrotropin and prolactin responses to thyrotropin-releasing hormone in hypogonadal and normal men. *J. Clin. Endocr. Meta.* 52: 173, 1981.
- 134: Rapp, JP., Pyun LL, A. Sex difference in plasma thyroxine and thyroid stimulating hormone in rats. *Proce. Soc. Exp. Biol. Med.* 146:1021, 1974.
- 135: Kiefferd, D., Mover, H, Federico P, Maloof, F. Pituitary Thyroid axis in monotal and adult rats: comparison of sexes. *Endocrinology.* 98: 295, 1976.
- 136: Simpkins JW, Bruni JF, Mioduszewski; RJ, Meites J. Serum and pituitary TSH and response to TRH, in developing male and female rats. *Endocrinology* 98: 1365, 1976.
- 137: Christianson D., Roti E., Vagenakis AG, Braverman LE., The sex-related difference in serum TSH concentration is androgen mediated. *Endocrinology* 108:529, 1981.
- 138: Krulich L. Central neurotransmitters and the secretion of prolactin, SH , LH, and TSH. *Annu Rev. Physiol.* 41:603, 1979.
- 139: Weiner, RI., Ganong WF, Regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol. Rev.* 58:905, 1978.
- 140: Maayan ML., Miller, SI, Jugbar, SH., Effects of serotonin on iodide and intermediary metabolism in isolated thyroid cells. *Endocrinology.* 88:620, 1971.

- 141: Taylor, J.M. Mitchell, WM., Cohen, J., Biol. Chem.
247: 5928, 1972.
- 142: Cohen S., Carpenter G., Proc. Natl. Acad. Sci - USA
72: 1317, 1975.
- 143: Moore, JB Arch, Biochem Biophys. 189: 1, 1978.
- 144: Covelli, I. Rossi, R., Mozzi, R, Frati, L., En. J.,
Biochem, 27: 225, 1972.
- 145: Frati, L., Daniele, S, DeLogu, A., Covelli I, Exp. Eye.
Res. 14: 135, 1972.
- 146: Gospodarowicz, D, Mescher AL, Brown, KD., Birdwell,
CR., Exp. Eye, Res. 25:631, 1977.
- 147: Cohen, S., Carpentier, G., Lembach., K, J. Adv. Metab.
Disord. 8: 265, 1975.
- 148: Hollenberg MD., Cuatrecasas, P., J. Biol. Chem., 350:
3845, 1975.
- 149: Westermarck, B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 1619, 1977.
- 150: Haigler H., Ash, JF., Singer SJ., Cohen, S. Proc. Natl.
Acad. sei USA 75:3317, 1978.
- 151: Pruss RM, Hershman HR., Proc. Natl. Acad. Sci USA
74: 3918, 1977.
- 152: Vlodaysky, I., Brown, KD., Gospodarowicz D., J. Biol.
Chem. 253:3744, 1978

- 153: Gospodarowicz D., Brown KD., Birdwell, CR., Zetter, BR
J Cell Biol. 77: 774, 1978.
- 154: Benveniste, R., Speeg KV., Carpenter G., Cohen, S.,
Lindner J. Rabinowitz, D. J. Clin. Endocrinol. Metab. 46:
169, 1978.
- 155: Fabricant RN, de Larco JE., Todaro GJ., Proc. Natl.
Acad. Sei. USA. 74: 565, 1977.
- 156: Carpenter G., Cohen, S., In Biochemical Actions of Hormo-
nes ed. G. Litwack vol. 5 New York: Academic. p.203, 1978.
- 157: Carpentier, G., Lembach, KJ., Morrison M. Cohen, S.
J. Biol. Chem., 250:4297, 1975.
- 158: O'Keefe, E., Hollenberg MD., Cuatrecasas, P. Arch, Biochem
Biophys 164: 518, 1974.
- 159: Naftel, J., Cohen, S., J. SC., Med. Assoc., 74; 53, 1978.
- 160: Carpenter G., Cohen S., J. Cell Biol. 71: 159, 1976.
- 161: Carpenter G., Cohen S., Ann. Rev. Biochem. 48: 193, 1979.
- 162: Holley, RW., Armour R., Baldwin, JH., Brown, KD, Yeh Y.,
Proc. Natl. Acad. Sei USA - 74: 5046, 1977.
- 163: Cohen S., J. Biol. Chem. 234: 1129, 1959.
- 164: Hassell J., Pratt R. Exp. Cell Res. 106: 55, 1977.
- 165: Fernández Pol, J. Biol. Chem. 260: 5003, 1985.
- 166: Schlessinger, J., Shechter Y., Willingham M., Postan I.;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 2659, 1978.
- 167: Zaninovich, A., Degrossi, O., Gotta, H. Effects of estro-
gens on serum TBG capacity and on the peripheral metabolism

- of T4 in patients with hepatic cirrhosis. *Acta Endocrinológica*. 67:73, 1971.
- 168: Zaninovich, AA., Ezrin C., Volpé, R., Effects of variations in TBG capacity on triiodothyronine Plasma half time. *J. Canadian Medical Assoc.* 95:262, 1966.
- 169: Zaninovich, A., Efectos metabólicos de la administración de estrógenos en el hipertiroidismo. *Medicina* 32: 37, 1972.
- 170: Rapp, J. Pyun L. A sex difference in plasma T4 and thyroid stimulating hormone in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146: 1021, 1974.
- 171: Zaninovich, AA., The effects of estrogen and a serotonin antagonist on the thyroidal economy of patients with hyperthyroidism. *Proceedings 6th. Asia & Oceanic Congress of ENDOCRINOLOGY, SINGAPUR, 1978.*
- 172: Ingbar, S., Frankel, N. Regulation of the peripheral metabolism of the thyroid hormones. *Rec. Prag. Horm. Res.* 16: 353, 1960.
- 173: Robbins, J. Rall J. Hormone Transport in circulation: the interaction of thyroid hormones and proteins in biological fluids. *Recent. Prog. Horm. Res.* 13: 161, 1957.
- 174: Melmed, S. Park J., Hershman, J. Triiodothyronine induces a transferable factor which suppresses TSH secretion in cultured mouse thyrotropic tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98: 1022, 1981.

- 175: Hershman J, Edwards, C., Serum thyrotropin levels after thyroid ablation compared with TSH levels after exogenous bovine TSH: implications for treatment of thyroid carcinoma J. Clin. Endocrinol. Metab. 34: 814, 1972.
- 176: Chen, HJ., Walfish, P. Effects of age and ovarian function in the pituitary thyroid system in female rats. J. endocrinology 78: 225, 1978.
- 177: D'Angelo S., Fisher J. Influence of estrogen on the pituitary-thyroid system of the female rat: mechanism and loci of action. Endocrinology 84:117, 1969.
- 178: Simpkins, J., Bruni J., Mieduszewski R., Meites, J. Serum and pituitary TSH and response to TRH., in developing male and female rats. Endocrinology 98: 1365, 1976.
- 179: Zaninovich, AA., Metabolismo de la triodotironina en la rata preñada. Medicina 35: 129, 1974.
- 180: Zaninovich, A., Degrossio, Pecorini V. Alterations in triodothyronine Kinetics induced by changes in TBG capacity in T4 treated athyreotic subjects. In current topics in Thyroid Research, Viena. AUSTRIA., 1971.
- 181: Atkinson, S., Smith P, Taylor J., Kendall-Taylor. P. Specific epidermal growth factor receptors on porcine thyroid cell membranes. FEBS LETTERS 153:88, 1983.
- 182: Westermark, K. Westermark, B., Karlsson, F., Ericson, L., Location of epidermal growth factor receptors

- on porcine thyroid follicle cells and receptor regulation by thyrotropin. *Endocrinology* 118:1040, 1986.
- 183: Vonderhaar B, Tang E., Lyster R., Mascimento M., Thyroid hormone regulation of epidermal growth factor receptor levels in mouse mammary glands. *Endocrinology* 119:580, 1986.
- 184: Mukku, VR. regulation of epidermal growth factor receptor levels by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 259: 6543, 1984.
- 185: Keji, H., Hinkle P. Epidermal growth factor decreases thyroid hormone receptors and attenuates thyroid hormone responses in Gtt4 cells. *Endocrinology* 120:537, 1987.
- 186: Carcoran, J.M., Waters, M., Eastman, C., Jorgensen, G. Epidermal growth factor: effect on circulating thyroid hormone levels in sheep. *Endocrinology* 119:214, 1986.
- 187: Schorbrunn, A., Krasnoff, M., Westendorf, J., Tashjian, A., Epidermal growth factor and thyrotropin releasing hormone act similarly on a clonal pituitary cell strain. *J. cell Biology* 85: 786, 1980.
- 188: Boruke, J., Mc Grath, P., Huxham, G., Waters, M. Manley, S. Effect of epidermal growth factor on the membrane potential of cultured porcine thyroid cells. *J. Endocr.* 109:321, 1986.
- 189: Heath, S. Lakshmanan, I. Fisher, D., Structure activity relation of thyroid hormone analogues and tissue epidermal growth factor concentrations in neonatal and adult mice.

- 190: Radioiodination Techniques. Review 18, Anersham-AE Bolton.
- 191: Roy EJ., Mc Ewen BS., Steroids 30: 657, 1977.
- 192: Camp P., Wise PM., Barraclough CH., J.Recept. Res. 3: 579, 1983.
- 193: Lowry, O. Rosebrough, N. Farr N., Randall R., J. Biol. Chem. 193:265, 1951.
- 194: Burton KA., Biochem J. 62: 315, 1956.
- 195: Záhínovich AA, Volpé, Ezrinc, J. Clin., Endocrinol&Metab. 29: 1601, 1969.
- 196: Zaninovich, AA., Thyroxine kinetics during prolonged estrogene administration. J. Clin Endocrinol. Metab. 37:949, 1973.
- 197: Zaninovich AA., Degrossi OJ., Pecorini, V., J.Clin. Endocrinol&Metab. 32: 509, 1971.
- 198: Zaninovich, AA., Boado R., Ulloa, E., Bromage, NR., Matty, AJ., Acta Endocrinológica 99: 386, 1982.
AJDC 138:251, 1984.
- 199: Boado, R., Ulloa, E., Zaninovich, AA., Effects of oestra-
diol benzoate on the pituitary-thyroid axis of male and
female rats. Acta Endocrinológica. 102:386, 1983.
- 200: Boado, R. Deza, S., Zaninovich, AA., Effects of oestra-
diol benzoate on the pituitary secretion and periphe-
ral kinetics of thyrotropin in the rat. Acta Endocrino-
lógica 109:232, 1985.

- 201: Bruni, JF., Marshall S., Dibbet, JA., Meités, J.
Endocrinology, 97:558: 1975.
- 202: Hagins N., Endocrinology 88: 1332, 1971.
- 203: Barbanel G., Assernmacher I. Mol. Cell Endocrinology,
28:247, 1982.
- 204: Azubizawa M., Mori S., Ohta H. Matsumura, S., Yoshimo-
to, H., Uozumi, T., Miyai K., Kumahara Y. Endocrinol.
Ipu., 26: 719, 1979.
- 205: Castro, N. Scaglione, R., Circadian Rhythm of TSH in adult
men and women. Acta Endocrinol. 95: 465, 1980.
- 206: Weeke, J . Circadian variation of the serum thyrotropin
level in normal subjercts. Scand J. Clin Lab. Invest.
31: 337, 1973.
- 207: Weeke, J. Laurberg, P; Diurnal TSH variations in hypothyroi-
dism. J. Clin Endocrinol Metab. 43:32, 1976.
- 208: Bakke, JL., Lawrence, N. Circadian periodicity in thyroid
stimulating hormone titer in rat hypophysis and serum me-
tabolism 14:841, 1965.
- 209: Singh, DV., Panda, JN., Anderson, PR., Turner, CW.,
Diurnal variation of plasma and pituitary thyrotropin
in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126:553, 1967.
- 210: Azizi, F., Vagenabis AG., Portnay GI, Rapoport B., Ingbar
SH., Braverman LE., Pituitary thyroid responseveness to
intramuscular thyrotropin -releasing hormone based on ana-
lyses of serum thyroxine, thirodothyronine and thyrotropin
concentrations. N. Engl. I. Med. 292:273, 1975.

- 211: Nabagawa, K., Thyrotropin response to repeated in fiction of thyrotropin releasing hormone. Horm. Metab. res. 7:217 1975.
- 212: Haigler, ED., Hershman J.M., Pittman JA., Response to orally administered synthetic thyrotropin releasing hormone J. Clin Endocrinol. Metab. 37:466, 1972.
- 213: Haigler, ED., Pittman, JA., Hershmann J.M., Baugh, CM., Direct evaluation of pituitary thyrotropin reserve utilizing synthetic thyrotropin releasing hormone. J. Clin Endocrinol. Meta. 33: 573, 1971.
- 214: Brenner WJ., Abrece, R., Stocking JR., De Kretser DM; Burger HG., Pituitary thyroid responses to 4-hour constant infusions of thyrotropin releasing hormone in man. J. Clin Endocrinol. Metab. 45: 981, 1977.
- 215: Surks M, De Fesi CR., Endocrinology 101: 946, 1977.
- 216: Alosno, G.E.; Burdman JA., Szijan I., Studies on oestrogen receptors in the cytosol and nuclei of the rat anterior pituitary gland. Determination of specific sites by 3H estradiol exchange essay. J. Steroid Biochem 14:1285. 1981.
- 217: Thrower S., Lim., L., A Comparison of the relationships between progestin receptors and oestrogen receptors in neural and non neural target tissues of the rat during the oestrons cycle. Biochem. J. 190: 691, 1980.
- 218: Blaustein; J. Fider H. Cytoplasmic progestin receptors in Guinea pig brain : Characteristics and relationship to the induction of sexual behavior. Brain Research- 169:481, 1979.

- 219: De Lean, A., Ferland, L. Draun J., Kelly PA., Labrie F.,
Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone,
receptor levels by estrogens and thyroid hormones.
Endocrinology 100:1496, 1977.
- 220: Chem, AJ., Walfish, PG., Effects of estradiol benzoate on
thyroid pituitary function in female rats. Endocrinology
103: 1023, 1978.
- 221: D'Angelo SA. Simultaneous effects of estradiol on TSH secre-
tion and adrenocortical function in male and female rats.
Endocrinology. 82: 1035, 1968.
- 222: Pasqualini, C., Bojda, F., Kerdelhué B. Direct. effect
of estradiol on the number of dopamine receptors in the
anterior pituitary of ovariectomized rats. Endocrinolo.
119: 2484, 1986.
- 223: Wise PM. Rance N., Barraclough CA., Effects of estradiol
and progesterone on catecholamine turnover rates in dis-
crete hypothalamic regions in ovariectomized rats. Endocri-
nology 108: 2186, 1981.
- 224: Cramer O.M., Parber CR, Porter, J.C. Estrogens: Inhibition
of dopamine release into hypophysial portal blood.
Endocrinology 104: 419, 1979.

INDICE GENERAL

| | <u>N° pág.</u> |
|---|----------------|
| 1. CONOCIMIENTOS PRELIMINARES | 5 |
| 1.1. SINTESIS DE TSH | 5 |
| 1.2. REGULACION | 7 |
| 1.3. ACCIONES DE LA TSH | 8 |
| 1.4. FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA REGULACION DE LA SECRECION DE TSH | 15 |
| 1.4.1 ESTROGENOS | 15 |
| 1.4.2. DOPAMINA | 19 |
| 1.4.3. NOREPINEFRINA | 20 |
| 1.4.4. HISTAMINA | 20 |
| 1.4.5. GABA | 21 |
| 1.4.6. SOMATOSTATINA | 22 |
| 1.4.7. OTROS ESTEROIDES | 23 |
| 1.4.8. SEROTONINA | 24 |
| 1.4.9. EGF | 26 |
| 1.5. ROL DE LOS ESTROGENOS EN LA ECONOMIA TIROIDEA | 31 |
| 1.6. ROL DEL EGF SOBRE LA ECONOMIA TIROIDEA | 32 |
| 2. OBJETIVOS | 34 |
| 3. MATERIALES Y METODOS | 36 |
| 3.1. TECNICAS UTILIZADAS | 36 |
| 3.1.1. RADIOINMUNOENSAYO | 36 |

| | <u>N° pág.</u> |
|---|----------------|
| 3.1.1.1. THS Y PRL | 37 |
| 3.1.2. MEDICION DE RECEPTORES | 39 |
| 3.1.2.1. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS | 39 |
| 3.1.2.2. RECEPTORES DE PROGESTERONA | 40 |
| 3.2. MODELOS EXPERIMENTALES Y OBTENCION DE LAS MUESTRAS | 41 |
| <u>ESTUDIOS CON ESTRADIOL</u> | |
| 3.2.1. EXPERIMENTOS <u>IN VIVO</u> | 41 |
| 3.2.1.1. PARTE EXPERIMENTAL | 43 |
| 3.2.2. EXPERIMENTOS <u>IN VITRO</u> | 45 |
| 3.2.2.1. PARTE EXPERIMENTAL | 48 |
| <u>ESTUDIOS CON EGF</u> | |
| 3.2.3. EXPERIMENTOS <u>IN VIVO</u> | 49 |
| 3.2.3.1. PARTE EXPERIMENTAL | 50 |
| 3.2.4. EXPERIMENTOS <u>IN VITRO</u> | 51 |
| 3.2.4.1. PARTE EXPERIMENTAL | 51 |
| 4. MODIFICACION DE LOS PARAMETROS TIROIDEOS POR LOS ESTROGENOS | 54 |
| 4.1. RESULTADOS Y DISCUSION | 54 |
| 5. MODIFICACION DE LOS PARAMETROS TIROIDEOS POR EL EGF | 76 |
| 5.1. RESULTADOS Y DISCUSION | 76 |
| 6. CONCLUSIONES | 91 |
| 7. ABREVIATURAS | 93 |
| 8. BIBLIOGRAFIA | 95 |
| 9. INDICE GENERAL | 122 |