

Tesis de Posgrado

Ontogenia de los mecanismos de control de la secreción adenohipofisaria

Lacau de Mengido, Isabel María

1988

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. 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:

Lacau de Mengido, Isabel María. (1988). Ontogenia de los mecanismos de control de la secreción adenohipofisaria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2192_LacaudeMengido.pdf

Cita tipo Chicago:

Lacau de Mengido, Isabel María. "Ontogenia de los mecanismos de control de la secreción adenohipofisaria". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2192_LacaudeMengido.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Ontogenia de los mecanismos de control de
la secreción adenohipofisaria**

Autora: Isabel María Lacau de Mengido

Director: Prof. Dr. Carlos Libertun

Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Biológicas

Instituto de Biología y Medicina Experimental
Obligado 2490. Buenos Aires.

1988

2.192
Ej. 2

A Santiago, José y Pablo,

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a todos los que hicieron posible este trabajo de tesis. Especialmente:

al Doctor Libertun, quien me apoyó en todo momento y me brindó su afecto;

a mis compañeros del Laboratorio, Damasia, Victoria, Graciela, Estela, Pablo y Sandra, con quienes es un placer trabajar;

a los que fueron compañeros de Laboratorio:

Gustavo, Marisa, Esteban, José Luis;

a todas las personas que trabajan en el IBYME y me acompañaron todos estos años;

a todos los integrantes de mi familia, directa y política, que siempre me apoyan y ayudan, sin quienes nunca hubiera podido terminar la tesis.

INDICE

Parte I. Introducción general.....	2
Control endócrino de la reproducción sexual.....	3
1) Regulación de las hormonas hipofisarias en la rata adulta.....	5
Hormona luteinizante.....	6
Hormona folículo-estimulante.....	8
Prolactina.....	10
Tirotrófina.....	12
2) Desarrollo puberal.....	13
a-Control fisiológico de la pubertad en la rata hembra.....	14
b-Control fisiológico de la pubertad en la rata macho.....	20
3) Diferenciación sexual del encéfalo.....	22
Parte II. Sección experimental.....	29
<u>Objetivos</u>	30
<u>Capítulo I</u> : Patrones hormonales durante el desarrollo.....	32
<u>Capítulo II</u> : Control dopaminérgico de la secreción de LH en ratas en desarrollo.....	38
<u>Capítulo III</u> : Regulación de FSH en la rata infantil.....	55
<u>Capítulo IV</u> : Diazepam y hormonas adenohipofisarias durante el desarrollo.....	71
<u>Capítulo V</u> : Tratamiento crónico con un dopaminérgico durante el período infantil. Efecto sobre las hormonas adenohipofisarias y sobre la eclosión puberal.....	104
<u>Capítulo VI</u> : Conclusiones generales.....	129
Resumen.....	134
Summary.....	137
Bibliografía.....	139

PARTE I

INTRODUCCION GENERAL

CONTROL ENDOCRINO DE LA REPRODUCCION SEXUAL

El proceso de reproducción sexual de los vertebrados superiores es uno de los fenómenos más complicados de la fisiología integrativa. No sólo son complejos los papeles de cada una de las hormonas involucradas, sino que también hay sistemas de integración que las coordinan entre sí y con los estímulos ambientales. Además, los mecanismos difieren entre los sexos.

Las estrategias y patrones desarrollados durante la evolución de los vertebrados son múltiples y altamente adaptativos para posibilitar el máximo éxito reproductivo en la gran variedad de hábitats colonizados. Inclusive hay diferencias en los procesos reproductivos de especies muy emparentadas; aquéllas constituyen la base del aislamiento reproductivo que hace posible la evolución de especies separadas dentro de una población simpátrica.

Basicamente: se ha establecido un eje de control hipotálamo-hipófiso-gonadal que regula el proceso de reproducción y por medio de las conexiones del hipotálamo con el resto del cerebro lo coordina con los estímulos ambientales. El funcionamiento y la regulación de este eje presentan

variaciones que dificultan la generalización. Los modelos más estudiados pertenecen a la clase Mammalia, y dentro de éstos se ha prestado especial atención a la rata, debido a su fácil cría como animal de laboratorio, y al hombre.

En este trabajo de investigación utilizamos como modelo experimental a la rata *Rattus norvegicus*, cepa Sprague-Dawley, Holtzman, del Instituto de Biología y Medicina Experimental, y estudiamos algunos aspectos de la ontogenia de la regulación hipofisaria por el hipotálamo.

Las figuras 1 y 2 representan esquemas de la región hipotálamo-hipofisaria de mamíferos mostrando los patrones típicos de las vías neurosecretoras. En la figura 1 se muestran axones de neuronas hipotalámicas, que envían sus productos de secreción a la región dorsal de la hipófisis, o pars nervosa. De allí se vuelcan a la circulación general. En la figura 2, se observan las fibras neurosecretoras que vuelcan sus productos en la eminencia media, a la sangre del sistema porta-hipofisario primario, que los lleva hasta la pars distalis y pars intermedia. Estas dos últimas partes, junto con la pars tuberalis, forman la adenohipófisis, que es responsable de la secreción de varias hormonas, entre las que se encuentran las gonadotrofinas y la prolactina, que intervienen directamente en la regulación de los procesos reproductivos. Los productos hipotalámicos que llegan a la hipófisis

anterior influyen sobre la secreción y liberación de las hormonas hipofisarias.

Es importante señalar que, aunque el sentido de circulación dentro del complejo hipotálamo-hipofisario es principalmente descendente (Houssay y col., 1935; Daniel, 1966) hay evidencias de que, según el estado hemodinámico del lecho vascular, existe un flujo retrógrado que lleva la sangre desde la hipófisis hacia el hipotálamo (Bergland y Page, 1979; Mezey y Palkovits, 1982; Oliver y col., 1977). Esto es de fundamental importancia para explicar ciertas características de la regulación hormonal.

1) REGULACION DE LAS HORMONAS HIPOFISARIAS EN LA RATA ADULTA:

A continuación describiremos brevemente la regulación de la secreción de las hormonas adenohipofisarias involucradas en la reproducción, gonadotrofinas y prolactina, y comparativamente, de una hormona metabólica, la hormona tirotrófica (TSH). En la tabla I se observa un resumen de la acción de algunos neurotransmisores sobre la secreción de LH, FSH, prolactina y TSH. En cada sección se discutirán con más detalle los aspectos que resulten de importancia para la mejor comprensión de los experimentos realizados y de los resultados obtenidos.

Hormona luteinizante (LH):

Tanto en machos como en hembras, la secreción de las gonadotropinas (LH y FSH) se realiza en forma pulsátil respondiendo a la liberación, por pulsos, de su factor liberador LHRH (Wildt y col., 1981). Este factor es un decapeptido sintetizado por neuronas especializadas del hipotálamo preóptico y liberado por ellas en el sistema portahipofisario (Setalo y col., 1975; Hokfelt y col., 1986). En la rata hembra se superpone a la secreción en pulsos de gonadotropinas, un patrón de secreción cíclico característico del ciclo estral (Gallo 1981 a y b).

Las gonadotropinas inducen la secreción de esteroides gonadales que, a su vez, retroactúan sobre el hipotálamo y la hipófisis, inhibiendo la secreción de LHRH, LH y FSH, ejerciendo el feed-back negativo. En la hembra, en determinado momento, el feedback por estradiol se vuelve positivo y genera un abrupto pico de gonadotropinas que desencadena la ovulación. Después predomina nuevamente el feedback negativo y recomienza el ciclo.

Las neuronas secretoras de LHRH son capaces, por sí mismas de secretar su producto en forma de pulsos (Estes y col., 1982; Kalra y Kalra, 1983). Sin embargo, su secreción puede ser modulada tanto por esteroides como por distintos neurotransmisores. Las evidencias experimentales sugieren que la acción de éstos sobre la secreción de LHRH depende del

modelo utilizado y, fundamentalmente, del ambiente estrogénico del individuo. Por ejemplo, la noradrenalina puede tener un efecto estimulador sobre LHRH (Vijayan y McCann, 1978; Leung y col., 1982) aunque en algunas situaciones produce inhibición (Gallo y Drouva, 1979). En general se acepta que juega un papel importante en la regulación de las descargas pulsátiles de LHRH y la inducción del pico preovulatorio de LH (Chappel, 1985).

Por otro lado, el papel de la dopamina en la regulación de LH está menos claro. Experimentos *in vitro*, en machos, asignan un papel inhibitorio a esta catecolamina (Negro-Vilar y col., 1979), lo mismo que experimentos farmacológicos *in vivo*, aumentando el turnover de dopamina (Simpkins y col., 1983). Sin embargo, en machos y en hembras pretratadas con estrógenos se observó una clara liberación de LH y LHRH producida por dopamina (Schneider y McCann, 1970; Vijayan y McCann, 1978). También en hembras se encontró una íntima relación entre los aumentos de LH y LHRH y el aumento del turnover de dopamina (Negro-Vilar y col., 1982) y se observó estimulación *in vitro* de LHRH por dopamina (Negro-Vilar y Ojeda, 1978).

También en la modulación de la liberación de LH por serotonina se han observado tanto componentes inhibitorios (Arendash y Gallo, 1978) como excitatorios (Wuttke y col., 1978; Hery y col., 1978; Becú-Villalobos y col., 1984; Becú-Villalobos y Libertun, 1986).

El papel de los péptidos opioides endógenos (β -endorfinas, encefalinas y dinorfinas) en la regulación de LH parecería ser inhibitorio y actuarían tanto a nivel de LHRH como en la modulación de la respuesta de LH a LHRH (Kato y col., 1982; Sylvester y col., 1982; Kalra y Kalra, 1983).

Por otro lado, el neurotransmisor GABA (ácido γ -aminobutírico) ejerce una acción inhibitoria sobre la liberación de LH (Donoso y Banzán, 1984). Se sugirió que su acción podría ser a nivel de las terminales noradrenérgicas y que su papel fisiológico sería el de sincronizar las descargas de LHRH (De Feudis, 1984).

Hormona foliculoestimulante (FSH):

La FSH responde al mismo factor liberador que la LH y por lo tanto ambas presentan, frecuentemente, patrones de secreción paralelos (Van Rees y de Koning, 1985). También responde, de manera similar a la LH, a los controles esteroideos negativos y positivos. Sin embargo, en determinadas situaciones, se observan cambios de FSH sin variaciones concomitantes de LH (Welschen y col., 1980). Se han postulado varios mecanismos para explicar estas diferencias en la secreción de LH y FSH (Chappel, 1985) y se ha encontrado un péptido, producido por las células de Sertoli en machos (Steinberger y Steinberger, 1976) y por las de la granulosa en hembras (Erickson y Hsueh, 1978), que ha sido denominado "inhibina", que inhibe selectivamente la secreción

de FSH y que actuaría tanto a nivel hipofisario como hipotalámico (de Jong y col., 1985). También se postula, aunque no ha sido demostrada, la existencia de un factor hipotalámico liberador de FSH, distinto del LHRH (Mizunuma y col., 1983).

No está claro aún, el papel que juegan los diversos neurotransmisores en la modulación de la regulación de FSH, ya que el tema no ha sido tan estudiado como en lo referente a LH. La noradrenalina y el GABA, al regular la liberación por pulsos de LHRH, estarían participando en la modulación de la relación de secreción LH/FSH (Chappel, 1985).

Entre los pocos trabajos existentes sobre la participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la FSH, se han descrito componentes inhibitorios, facilitatorios y nulos, dependiendo del entorno hormonal del modelo utilizado (Martini, 1969; Kamberi y col., 1971; Niaraki y col., 1982; Franks y col., 1980).

Tampoco está clara la modulación de la secreción de la FSH por el sistema dopaminérgico. Tratamientos con dopamina o agonistas de su receptor, produjeron tanto aumento como ausencia de cambios en la secreción de FSH (Kamberi y col., 1971; Clayton y Bailey, 1984) y con antagonistas se observaron tanto efectos inhibitorios (Dickerman y col., 1974; Beatie y col., 1976; Kun y col., 1985) como excitatorios (Clayton y Bailey, 1984).

En cuanto a la regulación por opiáceos, se ha encontrado

que tendrían una acción inhibitoria sobre la secreción de la FSH al igual que sobre la LH, ya que el antagonista naloxone aumenta ambas gonadotropinas en distintas situaciones (Bruni y col., 1977; Marini y col., 1984; Bhanot y Wilkinson, 1983; Cacicedo y Sánchez Franco, 1986). Sin embargo, en algunas oportunidades se observó aumento de la LH solamente, sin variaciones en la FSH (Marini y col., 1984; Piva y col., 1985 y 1986; Muraki y col., 1979; Ieri y col., 1980).

Prolactina:

La regulación de la secreción de prolactina por el hipotálamo, tiene como característica principal y particular su modalidad, tónicamente inhibitoria. La destrucción del hipotálamo medio basal, la sección del tallo hipofisario o el transplante de la hipófisis a un lugar distante del hipotálamo llevan a una hiperprolactinemia prolongada (Chen y col., 1970; Weiner y Ganong, 1978). Hasta ahora, se acepta que el factor hipotalámico inhibidor de la secreción de prolactina (PIF) más importante es la dopamina (MacLeod, 1976; Libertun y col., 1980), ya que antagonistas dopaminérgicos producen un aumento muy importante de la prolactinemia (McCann y col., 1974; Del Pozo y Lancranjan, 1978). La pregunta que aún queda por responder es si es el único factor fisiológico inhibidor o coexiste con otro(s). Otros neurotransmisores modifican la secreción de prolactina. La serotonina, por ejemplo, estimula

la secreción prolactínica en ciertas circunstancias, por acción a nivel hipotalámico, pero no hipofisario (Krulich y col., 1979; Pilotte y Porter, 1979). Por otro lado, los péptidos opioides también liberan prolactina, y el mecanismo de acción sugerido sería a través de una inhibición del sistema dopaminérgico (Deyo y col., 1980; Ieri y col., 1980).

El neurotransmisor inhibitorio GABA, por su parte, puede intervenir inhibiendo o estimulando la secreción prolactínica según su sitio de acción. Cuando actúa a nivel hipotalámico (microinyecciones en el tercer ventrículo o incremento del GABA endógeno por bloqueo de su degradación) inhibe al sistema dopaminérgico y por lo tanto se observa un aumento de la prolactinemia. Cuando su acción se ejerce directamente sobre la hipófisis, inhibe la descarga de prolactina por el lactotrofo (Libertun y col., 1979; Demeneix y col., 1986).

Además de estos neurotransmisores, otros factores pueden afectar la secreción de prolactina. Se han demostrado, acción inhibitoria de la somatostatina y acciones estimuladoras del factor hipotalámico liberador de tirotrófina (TRH), y del VIP (péptido intestinal vasoactivo), directamente a nivel hipofisario (Enjalbert y col., 1982). Estos factores estarían involucrados en la regulación de la liberación de prolactina durante la succión (deGreef y van der Schoot, 1985; Chiochio, 1988).

Finalmente, existe una autorregulación, feed-back inhibitorio corto, de la secreción de prolactina ya que ésta

actúa sobre el hipotálamo, estimulando el turnover de dopamina (deGreef y van der Schoot, 1985).

Tirotrofina (TSH):

La secreción de la TSH se encuentra estimulada en forma tónica por un tripéptido hipotalámico, el TRH (thyrotropin releasing hormone) o tiroliberina (Szabo y col., 1978; Mori y col., 1978; Harris y col., 1978). Este péptido es sintetizado por todo el hipotálamo medio basal, desde el área preóptica hasta la región mamilar (Hokfelt y col., 1986).

La secreción de la TSH puede ser modificada por diversos neurotransmisores. Datos concordantes indican un efecto estimulador de la secreción de esta hormona por noradrenalina (Weiner y Ganong, 1978). Para la serotonina, por otro lado, se han observado tanto efectos estimuladores (Woolf y Lee, 1977) como inhibidores (Bennet y col., 1975). La dopamina, en cambio, parecería ser inhibidora y actuaría modulando la secreción de TRH en la eminencia media (Krulich y col., 1977; Tuomisto y Mannisto, 1985). Por otro lado, los péptidos opioides estarían involucrados en la regulación fisiológica de la respuesta de la TSH a los cambios de temperatura y al estrés (Tuomisto y Mannisto, 1985).

También se ha observado que el GABA modifica la TSH plasmática, y que no actuaría directamente sobre la hipófisis sino a nivel del hipotálamo medio basal, inhibiendo la liberación de TRH (De Feudis, 1984).

2) DESARROLLO PUBERAL:

La puesta en marcha de la fertilidad y el período de rápido desarrollo que la precede se han denominado, en conjunto, pubertad. Los límites de este período son difíciles de determinar, ya que se trata de la aceleración de un proceso de desarrollo que ha comenzado mucho más temprano y que culmina con el establecimiento de la fertilidad funcional del animal, fisiológica y comportamentalmente (Bronson y Rissman, 1986). Este período es muy variable entre los mamíferos e, inclusive, varía entre los dos sexos de una misma especie. El problema común a todas las hembras de mamíferos para determinar el comienzo de la edad fértil es la preparación necesaria para afrontar el drenaje energético que supone la lactancia. Este problema no se presenta para los machos que, en general, tienen que hacer frente a problemas del tipo comportamental y disputar con otros machos en sus mismas condiciones el privilegio de aparearse. En los animales de laboratorio, las condiciones ambientales son uniformes, con lo cual la variación entre los individuos de la misma especie no es tan grande. Por supuesto, la diferencia entre los dos sexos existe y juegan un papel importante la variación genética indi-

vidual y los diferentes estados emocionales.

Aunque desde un punto de vista amplio, el comienzo de la fertilidad puede ser considerado como la culminación de la interacción de fuerzas genéticas y ecológicas, los factores que directamente regulan la pubertad son, fundamentalmente, hormonales.

A- El control fisiológico de la pubertad en la rata hembra.

El desarrollo, desde el nacimiento hasta la pubertad, de la rata hembra puede dividirse en cuatro etapas de acuerdo con sus características fisiológicas y morfológicas. Dichos periodos son (figura 4): *neonatal*, primera semana de vida; *infantil*, desde el día 8 hasta el 21 de edad; *juvenil*, desde el día 22 hasta el día 30-32; y *peripuberal*, desde este momento hasta la eclosión puberal propiamente dicha, esto es la primera ovulación (Ojeda y col., 1980). En la rata hembra, el signo visible de que la etapa fértil se puso en marcha, es la apertura de la vagina que ocurre alrededor del día 38-40.

Antes del nacimiento, alrededor del día 12 de gestación, empieza a producirse la LHRH (Aubert y col., 1985) y, alrededor del día 17 se detectan gonadotrofinas circulantes, cuyos niveles permanecerán bajos hasta el nacimiento (Salisbury y col., 1982).

El período neonatal:

En este período empieza a aumentar la secreción de gonadotrofinas, pero el ovario es relativamente insensible a ellas hasta alrededor del 5° día de vida (Funkenstein y col., 1980). A partir del 5° día la FSH empieza a ser capaz de estimular a la aromatasa, que produce estradiol a partir de testosterona. A pesar de que el ovario produce estrógenos, el control negativo por estradiol de la secreción gonadotrófica es inefectivo debido a la presencia en el suero de alfa-fetoproteínas que unen fuertemente a los estrógenos tornándolos biológicamente inactivos (Raynaud y col., 1971).

El número de receptores para gonadotrofinas en el ovario empieza a aumentar rápidamente hacia el final de este período (Smith-White y Ojeda 1981b) y se hace evidente la respuesta esteroideogénica del ovario a las gonadotrofinas (Funkenstein y col., 1980).

Además del control hormonal del ovario, se observa un control nervioso directo a juzgar por la presencia de fibras VIP-érgicas y noradrenérgicas en el ovario neonatal (Ojeda y col., 1986).

Se ha encontrado que, en este período se establece un tercer control del ovario. Se trata de un control inhibitorio ejercido por LHRH de origen materno, que llega a la cría por la leche, cruzando la pared gastrointestinal y, alcanzando por sangre, el ovario donde se une a receptores específicos, deprimiendo la función ovárica (Ojeda y col., 1986).

El período infantil:

Esta etapa se extiende desde el día 7 hasta el 21 de edad. Desde el comienzo de este período aumenta rápidamente la FSH que alcanza su máximo alrededor del día 12 (Ojeda y Ramírez, 1972). Esos niveles altos de FSH son fundamentales para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que van a ovular en la pubertad. En este período el ovario responde a la FSH con una elevada actividad de aromatasa (Andrews y col., 1981a).

Mientras la FSH se encuentra elevada y se secreta en forma tónica, la LH empieza a presentar picos de secreción esporádicos (Dohler y Wuttke, 1975). Estos picos parecerían reflejar eventos del tipo central, como por ejemplo aumentos en el recambio de norepinefrina que se observan en el área preóptica hipotalámica (Honma y col., 1979), y descargas no sincronizadas de LHRH, que podrían ser las responsables tanto de los niveles elevados de FSH, como de los picos esporádicos de LH (Hompes y col., 1982). No estarían relacionados con mecanismos de feedback positivo por estradiol, ya que éstos no son posibles de generar antes del día 15 de vida (Andrews y col., 1981b). Este patrón de secreción con alta FSH sostenida y picos esporádicos de LH caracteriza el período infantil.

La FSH aumentada está relacionada tanto con un feedback negativo por estradiol ineficiente debido a la presencia de

alfa-fetoproteínas, como con la ausencia de inhibina, que comienza a detectarse en el ovario recién alrededor del día 23 de vida (Sander y col., 1984). Durante este período, el único feedback negativo esteroideo que es parcialmente efectivo, es el producido por los andrógenos aromatizables que secreta el ovario (Andrews y Ojeda, 1981a).

Por otro lado, en este período, la hipófisis de la hembra es especialmente sensible a la estimulación de sus gonadotrofos por LHRH (Debeljuk y col., 1972b; Ojeda y col., 1977). Dicha sensibilidad decrece paulatinamente a partir del día 15 de vida.

Estas observaciones sugieren que el período infantil es el primer período de activación gonadotrófica previo a la pubertad, y que esta activación es la consecuencia de eventos de origen central (Ojeda y col., 1986).

El período juvenil:

Al principio de este período, alrededor del día 21 de edad, disminuyen los valores de FSH, desaparecen los picos esporádicos de LH, y decrecen los niveles de alfa-fetoproteínas, liberando el estradiol que aumenta su actividad biológica. Alrededor del día 22 de vida, la hembra es capaz de responder al estradiol con una liberación de LH similar a la que se produce en el día del proestro, por un claro mecanismo de feedback positivo (Andrews y col., 1981b).

Aunque los niveles de LH en esta etapa, son bajos, su patrón de secreción es claramente pulsátil y hacia el final de este período aumentan, tanto los niveles basales, como la amplitud de los pulsos durante la tarde (Urbansky y Ojeda, 1985a). A nivel ovárico, se observa un aumento de los receptores de LH (Smith-White y Ojeda, 1981b), que junto con el patrón de secreción de LH se traducen en una mayor esteroidogénesis (Urbansky y Ojeda 1985b). Además, se observa una disminución de los receptores ováricos de LHRH (Smith-White, 1981a) que junto con el progresivo destete del animal disminuyen el control inhibitorio de LHRH sobre el ovario.

No se puede dejar de nombrar la influencia de la prolactina, cuyos niveles bajos desde el nacimiento empiezan a aumentar a partir del día 20, durante este período. Esta hormona junto con la somatotrofina son facilitadoras de la acción estimuladora de las gonadotrofinas sobre la función ovárica, durante el desarrollo juvenil (Advis y col., 1981a y b; Ojeda y col., 1986).

Por otro lado, a nivel central, se observa un aumento del turnover de catecolaminas hipotalámicas (Wuttke y col., 1980) y de la capacidad secretora de LHRH (Andrews y Ojeda, 1978). Simultáneamente, disminuye la sensibilidad hipofisaria a la LHRH (Debeljuk y col., 1972b).

El aspecto más importante de los sucesos neuroendócrinos del período juvenil es el claro establecimiento de un ritmo circadiano de secreción de la LH y del feedback positivo por

estradiol (Ojeda y col., 1986).

El período peripuberal:

A partir de la diferenciación de un ciclo diurno de secreción de LH durante el período juvenil, primera manifestación de la cercanía de la pubertad, entramos en el período peripuberal, alrededor del día 30 de edad. Al principio de este período el patrón de secreción circadiano de LH se establece clara y regularmente. Este patrón es independiente del control esteroideo y es dirigido centralmente (Ojeda y col., 1986), al igual que el patrón, similar al de LH, de secreción de prolactina (Kimura y Kawakami, 1980).

Estos pulsos de secreción aumentados durante la tarde son, en última instancia, los responsables de la ocurrencia de la ovulación. Ellos estimulan al ovario para que secrete más estradiol. A su vez, estos cambios en los niveles de estradiol son capaces de producir por feedback positivo, picos de secreción de LH. Al mismo tiempo, se observa un máximo número de receptores para FSH y LH en el ovario (Smith-White y Ojeda 1981b), lo que se traduce en una máxima respuesta esteroidogénica del mismo. Aumentan marcadamente los niveles de estradiol, y moderadamente los de progesterona y testosterona (Andrews y col., 1980). Esta última, sería la responsable de la canalización de la vagina (Ojeda y col., 1986).

Los niveles aumentados de esteroides afectan profundamente al hipotálamo. Se observa un aumento importante de la actividad noradrenérgica y serotoninérgica (Advis y col., 1978) y de la consecuente liberación de LHRH. Por otro lado, el día anterior a la primera ovulación, aumenta marcadamente la sensibilidad hipofisaria a la LHRH (Sarkar y Fink, 1979). Este aumento de sensibilidad se lleva a cabo al mismo tiempo en que se observan los máximos niveles de estradiol y cuando empieza la gran descarga de LHRH. Finalmente, esto culmina con el pico de gonadotrofinas de la tarde del proestro y la consecuente ovulación.

B- El control fisiológico de la pubertad en la rata macho:

El macho alcanza su madurez sexual por un proceso gradual de maduración de su eje hipotálamo-hipófiso-testicular. Este proceso culmina en la pubertad, cuando se libera la primera generación de espermatozoides a la luz de los túbulos seminíferos y maduran pasando a los vasos deferentes. En la rata, esto ocurre normalmente entre los 50 y 60 días de edad.

En la rata macho, se detectó LHRH en el hipotálamo a los 17 días de gestación (Chiappa y Fink, 1977), antes de que se establezca completamente la conexión vascular entre el hipotálamo y la adenohipófisis. En este momento se observan altos valores de testosterona, directamente responsables de la

diferenciación encefálica masculina (Weisz y Ward, 1980).

La hipófisis **neonatal** es capaz de responder a un estímulo de LHRH con liberación de LH y FSH (Root y col., 1975), y su sensibilidad va aumentando gradualmente con la edad (Debeljuk y col., 1972a).

Durante el período **infantil**, segunda y tercera semanas de vida (figura 4), empiezan a aumentar los niveles de FSH, que estaban muy bajos en el período **neonatal**, y también aumentan dos o tres veces sus receptores testiculares (Ketelslegers y col., 1975). Estos procesos son de fundamental importancia para la compleción de la espermatogénesis.

Los niveles de LH son variables durante los períodos **neonatal** e **infantil** (Dohler y Wuttke, 1974), y los niveles de testosterona bajan hasta encontrarse en un mínimo en la transición entre los dos períodos (Dohler y Wuttke, 1975).

El período **juvenil**, empieza el día 21 y termina el día 35 de edad, se caracteriza por un aumento notable de los receptores testiculares de LH, inducidos por la FSH que alcanza sus máximos valores (Ketelslegers y col., 1975). De ahí en más, la FSH decrece gradualmente hacia la pubertad. También la prolactina, que aumenta gradualmente a partir del día 20, induce la formación de receptores de LH en las células de Leydig (Bartke, 1980). En este período, los datos sobre los niveles de LH no son concordantes. Algunos autores observaron un aumento de los mismos (Dohler y Wuttke, 1974), mientras que otros no detectaron cambios (Ketelslegers y col., 1975).

Finalmente, el período **puberal** se inicia alrededor del día 35, momento en el cual aumentan rápidamente los niveles de testosterona (Ketelslegers y col., 1975), y empiezan a aparecer los primeros espermatozoides libres en los túbulos seminíferos. Este período termina entre los 55 y 60 días de edad, cuando los espermatozoides han madurado y llegan a los vasos deferentes.

El aumento gradual de las gonadotrofinas durante el desarrollo del macho desde el nacimiento hacia la pubertad, es la consecuencia de una decreciente sensibilidad de la unidad hipotálamo-hipofisaria al feedback negativo esteroideo. De este modo, cada vez se secretan más gonadotrofinas y se necesitan mayores cantidades de testosterona para inhibir dicha síntesis. La señal gonadotrófica se ve, además, amplificada por el aumento de los receptores para LH durante la etapa juvenil, lo que desencadena la gran elevación de testosterona que caracteriza la pubertad masculina (Ojeda y col., 1980).

3) DIFERENCIACION SEXUAL DEL ENCEFALO

El desarrollo de los fenotipos sexuales en los mamíferos euterios está mediado por las hormonas gonadales. El proceso de diferenciación sexual empieza con la fecundación, momento en el cual se establece el sexo cromosómico. Las fórmulas

cromosómicas sexuales de mamíferos son XX para la hembra y XY para el macho. El cromosoma Y es el responsable del desarrollo del testículo a partir de los primordios gonadales. En ausencia del cromosoma Y el embrión se desarrolla en forma femenina. Al diferenciarse el testículo, aparece su principal producto endócrino, la testosterona. Esta es la responsable de la diferenciación sexual masculina, tanto a nivel periférico (diferenciación de conductos de Wolff, próstata y genitalia externa) como central (diferenciación sexual del encéfalo) . Además, el testículo embrionario secreta un factor peptídico, el factor de regresión Mulleriano, que actúa inhibiendo el desarrollo de los conductos femeninos a partir de los conductos de Muller (George y Wilson, 1986).

En la rata, la diferenciación sexual del encéfalo se produce en los días cercanos al nacimiento (figura 3). Si en este momento, hay testosterona circulante, el cerebro se diferenciará en forma masculina; si no, será un cerebro femenino. Un encéfalo diferenciado en forma masculina regirá un comportamiento típicamente masculino y una secreción tónica de gonadotrofinas. Un cerebro femenino será responsable de un comportamiento femenino y una secreción cíclica de gonadotrofinas. Si a una rata hembra, se le administra testosterona al nacer, su patrón de secreción gonadotrófica será tónico, como en los machos, y tendrá un comportamiento masculino (McEwen, 1981; MacLusky y Naftolin, 1981). A la inversa, la castración neonatal de un macho producirá un animal

con secreción gonadotrófica cíclica y comportamiento femenino (Harris, 1964). Es importante mencionar que la acción masculinizante de la testosterona a nivel central está, paradójicamente, mediada por su aromatización *in situ* a estradiol (Roselli y col., 1985). Dicho proceso puede ser logrado artificialmente por la administración neonatal de estrógenos o andrógenos aromatizables y prevenido por antiestrógenos o por inhibidores de la aromatasa (Doughty y col., 1975; Liebeburg y col., 1977).

En resumen, el cerebro de la rata al nacer, está potencialmente preparado para diferenciarse femeninamente y producir un patrón cíclico de secreción gonadotrófica y prolactínica en la adultez. Si el individuo es sexualmente macho (XY) y sus testículos se desarrollan en forma normal, producen testosterona que, a su vez, en las células cerebrales, se aromatiza a estradiol y produce la masculinización o "defeminización" del encéfalo, suprimiendo el centro cíclico de regulación y generando una secreción tónica de las gonadotrofinas.

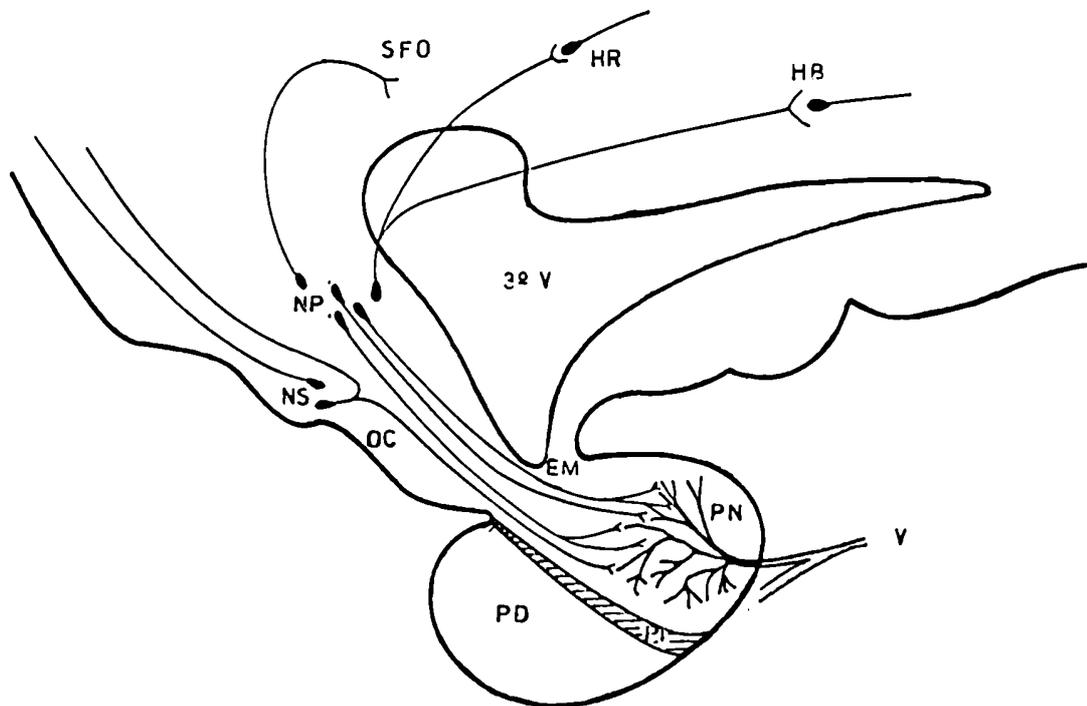


Figura 1: Diagrama de la región hipotálamo-hipofisaria de vertebrados, en sección sagital: Patrones de fibras neurosecretoras que envían sus productos a la pars nervosa (PN) de la hipófisis. NP: núcleo paraventricular; NS: núcleo supraóptico; OC: quiasma óptico; SFO: órgano subfornical; HR: región habenular; HB: cerebro posterior; 3ºV: tercer ventrículo; EM: eminencia media; PD: pars distalis; PI: pars intermedia; V: vena. (adaptado de Gorbman y col., 1983).

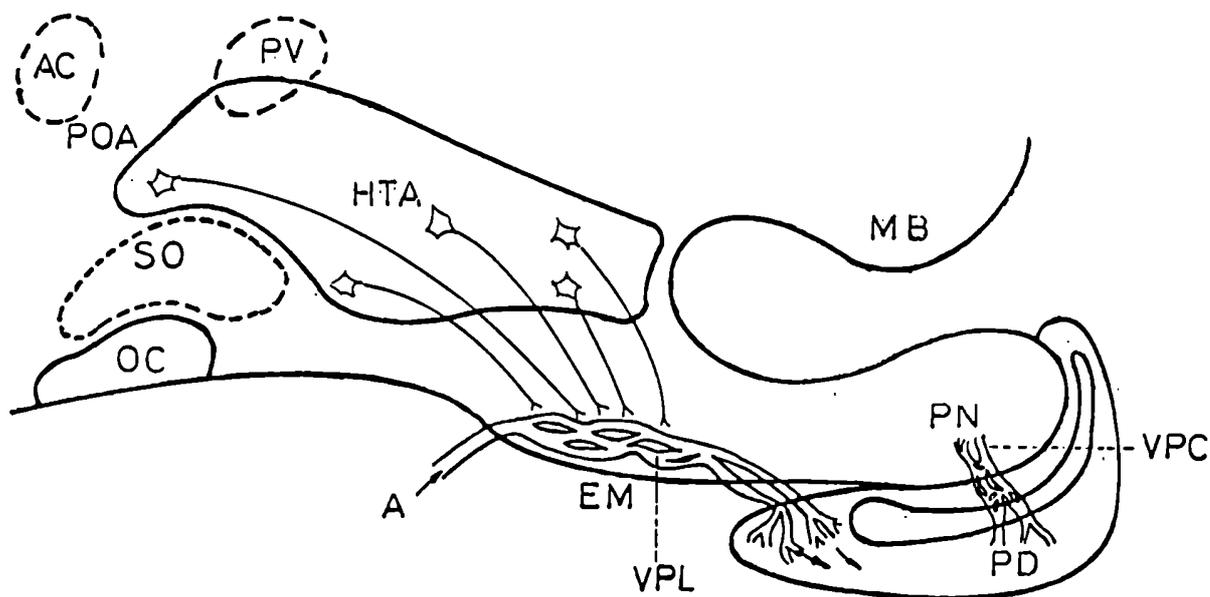


Figura 2: Diagrama de la región hipotálamo-hipofisaria de vertebrados en sección sagital, mostrando los patrones de fibras neurosecretoras que envían sus productos a la región de la eminencia media (EM), donde son recogidos por los vasos portales largos (VPL) y llevados a la pars distalis (PD) de la hipófisis. AC: comisura anterior; POA: área preóptica; PV: núcleo paraventricular; HTA: área hipofisotropa; MB: cuerpos mamilares; SO: núcleo supraóptico; OC: quiasma óptico; A: arteria; VPC: vasos portales cortos; PN: pars nervosa. (adaptado de Gorbman y col., 1983).

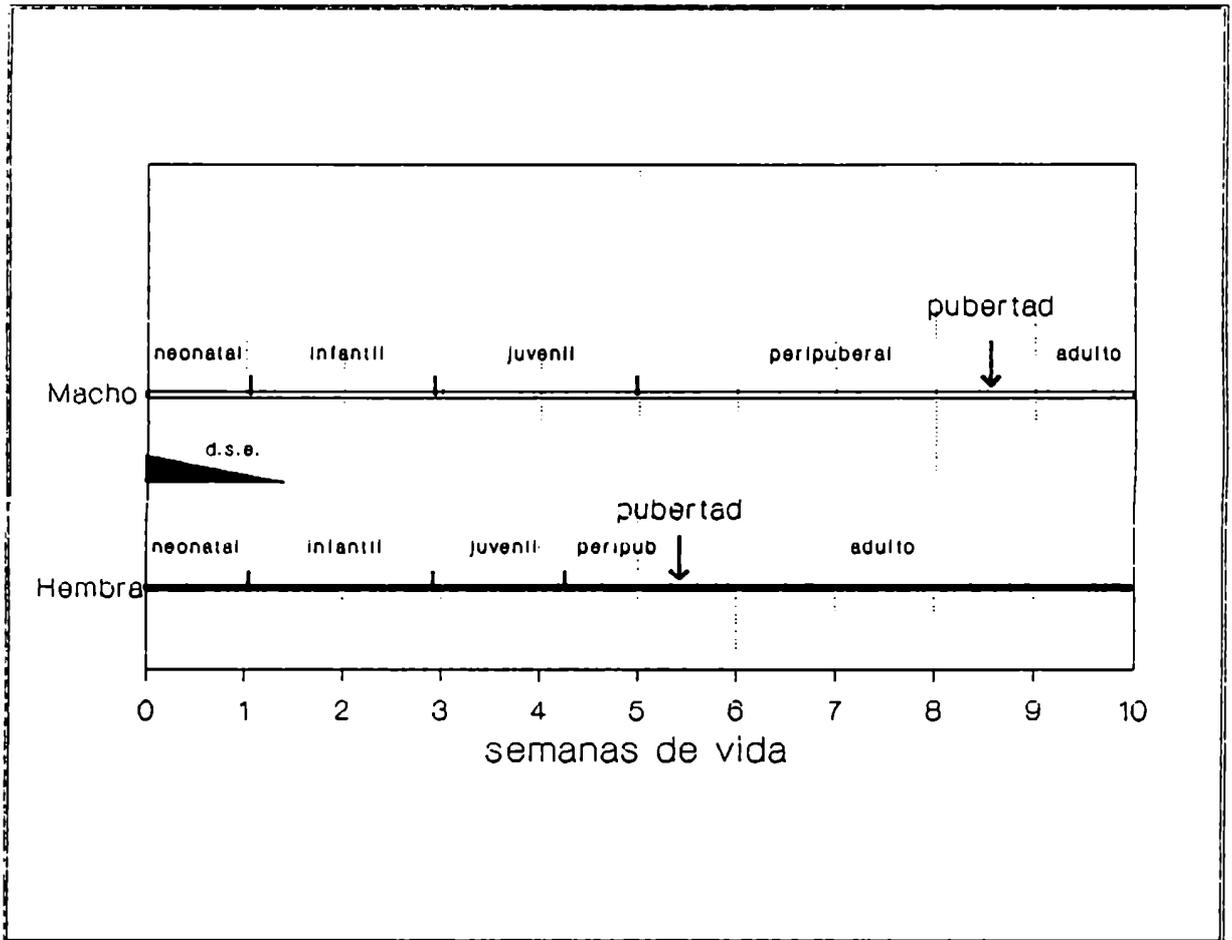


Figura 3: Etapas del desarrollo postnatal en ratas machos y hembras.
d.s.e.: diferenciación sexual encefálica.

	LH	FSH	Prolactina	TSH
Norepinefrina	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑
Dopamina	↑ ↓	↑ ↓	↓	↓
GABA	↓	↓	↑ ↓	↓
Opiaceos	↓	↓	↑	↓
Serotonina	↑ ↓	↑ ↓	↑	↑ ↓

Tabla I: Simplificación de los efectos principales de ciertos neurotransmisores sobre la secreción de hormonas hipofisarias.

↑ efecto estimulador

↓ efecto inhibidor

↑↓ efecto estimulador o inhibidor según el entorno hormonal

PARTE II

SECCION EXPERIMENTAL

OBJETIVOS

A partir de lo expuesto en la introducción, nos planteamos los siguientes objetivos:

1- Caracterizar los patrones hormonales normales, durante el desarrollo en nuestro modelo de trabajo (*Rattus norvegicus*, cepa Sprague-Dawley Holtzman, del Instituto de Biología y Medicina Experimental). Describiremos la evolución de LH, FSH, prolactina y TSH, en machos y hembras, desde el nacimiento hasta la edad adulta.

2- Investigar la participación del sistema dopaminérgico en la regulación de la LH durante el desarrollo, comparativamente en machos y hembras.

3- Estudiar la influencia de los sistemas dopaminérgico, serotoninérgico y opiáceo sobre la regulación de FSH en machos y hembras inmaduros.

4- Examinar el efecto del Diazepam, una ben-

zodiazepina, sobre LH, TSH y prolactina en distintos momentos del desarrollo, y paralelamente, estudiar la ontogenia post-natal de los sitios de unión para benzodiazepinas en el hipotálamo.

5- Estudiar los efectos endócrinos, a corto y a largo plazo, de un tratamiento crónico con un agente dopaminérgico durante distintas etapas de los periodos neonatal e infantil, en la rata hembra. (Este objetivo surgió del análisis de los resultados obtenidos una vez cumplidos los cuatro primeros, en los cuales observamos la existencia de un período particular en cuanto a la regulación gonadotrófica, alrededor del día 12 de edad en la rata hembra).

CAPITULO I

PATRONES HORMONALES BASALES DURANTE EL DESARROLLO

Para comenzar con la sección experimental, analizaremos brevemente el patrón de desarrollo de los niveles hormonales en nuestra cepa de trabajo. Para ello fueron decapitados animales de distintas edades, por la mañana, y fueron medidas las distintas hormonas por radioinmunoensayo, en suero de sangre troncal. Los métodos utilizados se comentan en las secciones "Materiales y Métodos" de los capítulos posteriores.

Las curvas evolutivas de prolactina se muestran en la figura I-1, y no difieren de las encontradas por otros investigadores (Ojeda y McCann, 1974; Dohler y Wuttke, 1975). Tanto en hembras como en machos, los niveles son bajos al nacer y permanecen bajos durante las dos primeras semanas de vida. A partir de los 20 días empiezan a aumentar hasta alcanzar los niveles adultos.

La LH (figura I-2), en los machos se mantiene baja durante las primeras semanas de vida y aumenta levemente en los adultos. En la hembra, los niveles no son sig-

nificativamente distintos de los observados en machos, pero, durante el período infantil, se registran variaciones individuales debidas a los picos espontáneos de la hormona que se producen a esta edad y que se traducen como altos errores estándar en las mediciones.

Por otro lado, se observa la clara diferenciación sexual en la secreción de FSH (Figura I-3). En los machos, aumenta gradualmente hasta sus máximos valores, alrededor del día 28, mientras que en las hembras sus niveles son moderadamente altos al nacer, crecen hasta encontrar un máximo alrededor de los 12 días de edad, y vuelven a bajar permaneciendo bajos hasta la pubertad.

En cuanto a la TSH, no se observan diferencias sexuales durante el desarrollo (figura I-4). En ambos sexos se ve un incremento de la hormona alrededor de los 20 días de vida, coincidiendo con las observaciones de Advis y Ojeda (1978) y de Walker y col. (1980). Finalmente, en los adultos, los niveles son significativamente superiores en los machos.

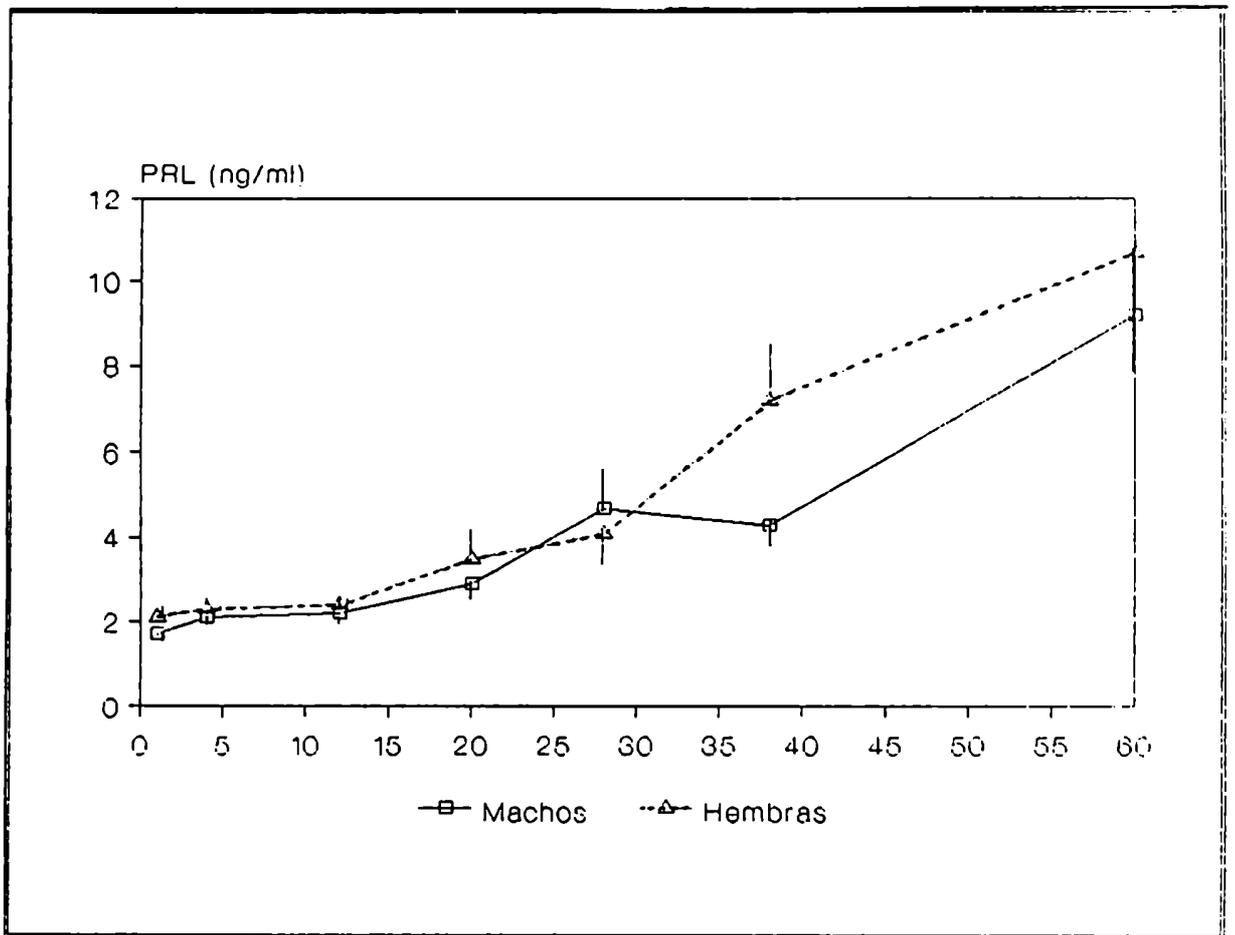


Figura I-1: Niveles de prolactina durante el desarrollo en ratas machos y hembras. En esta figura y las siguientes se muestran los valores medios de entre 9 y 15 muestras por edad. Las líneas verticales representan los errores estándar de la medición de cada edad. Las muestras fueron tomadas por decapitación, entre las 10.00 y las 12.00 hs. Se usaron ratas de 1, 4, 12, 20, 28, 38 y 60 días de edad.

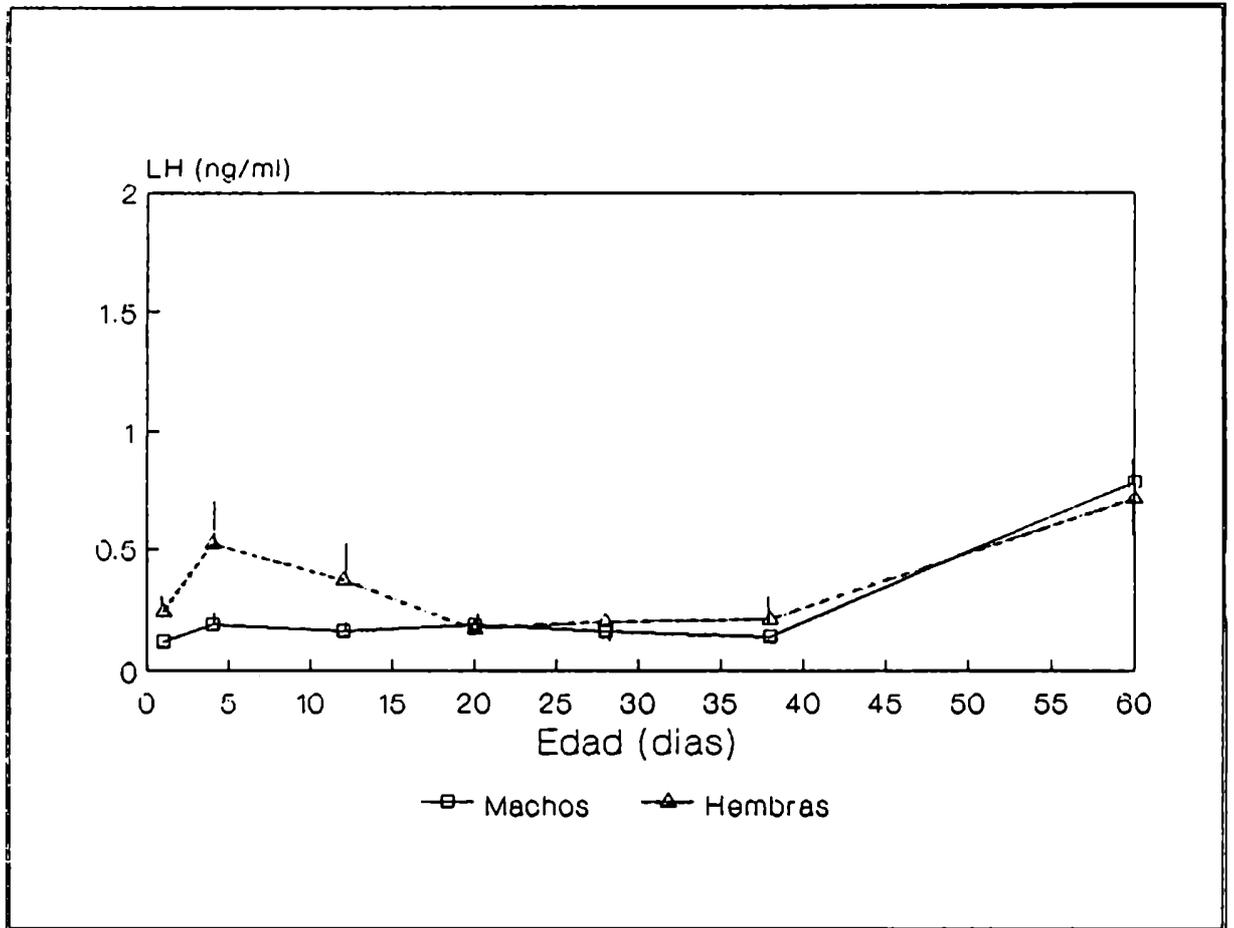


Figura I-2: Evolución de los niveles de LH, desde el nacimiento hasta la adultez, en machos y hembras. Nótese los altos errores estándar en las hembras de 4 y 12 días de edad.

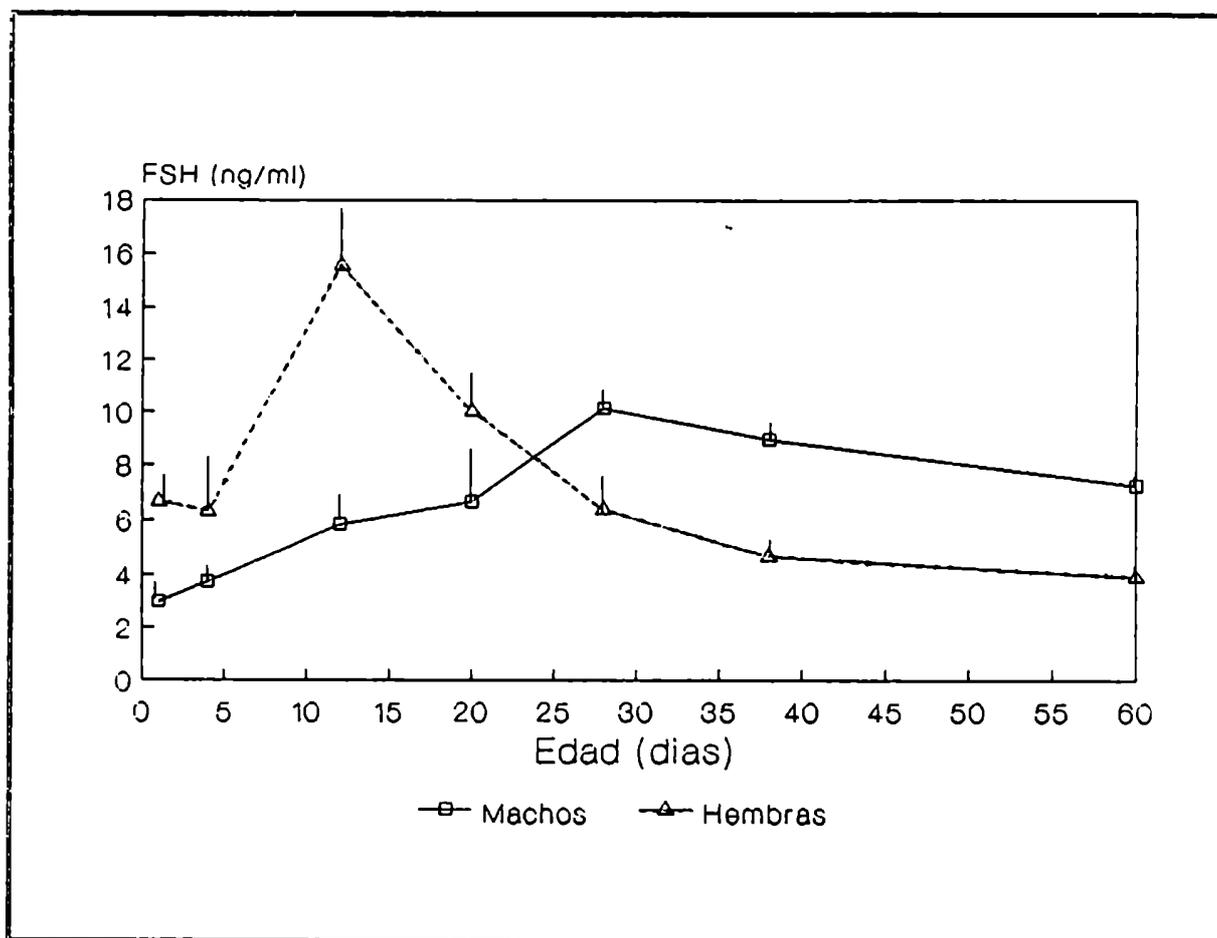


Figura I-3: Niveles de FSH durante el desarrollo de ratas machos y hembras. Se observa claramente la diferencia sexual en los patrones evolutivos de la hormona. En los machos aumenta gradualmente mientras que en las hembras se encuentra muy elevada a los 12 días y después baja marcadamente.

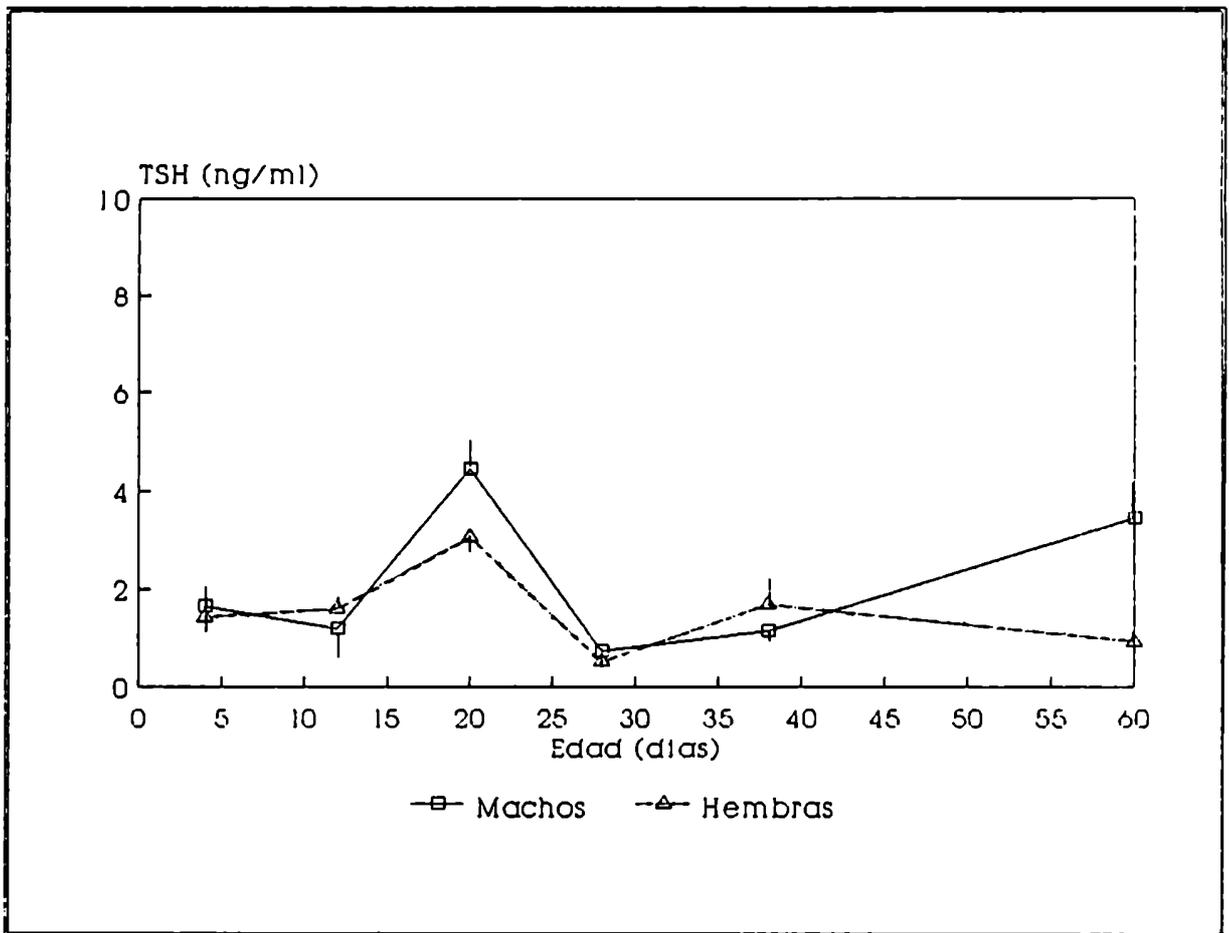


Figura I-4: Patrones de secreción de TSH durante el desarrollo en machos y hembras. No se observan diferencias sexuales.

CAPITULO II

CONTROL DOPAMINERGICO DE LA SECRECION DE LH EN RATAS EN DESARROLLO

Tal como vimos en la sección introductoria, el papel de la dopamina en el control de la secreción de LH no ha sido, todavía, perfectamente establecido. Algunos resultados de la bibliografía indican que el sistema dopaminérgico inhibe la secreción de LH, mientras que otros demuestran lo contrario. Por ejemplo, Beck y Wuttke (1977) lograron inhibir la secreción de LH en ratas hembras adultas tratándolas crónicamente con agonistas dopaminérgicos. Por otro lado, en ratas machos, la dopamina estimuló la liberación de esta hormona (Negro-Vilar y col., 1979; Rotsztein y col., 1977). Cuando se utilizaron antagonistas dopaminérgicos se bloqueó el pico de LH que se produce el día del proestro y la consiguiente ovulación; este efecto fué revertido por un tratamiento previo con el agonista dopaminérgico bromocriptina (Krieg y Johnson, 1981; Krieg y Cassidy, 1984). Se ha demostrado además, que la dopamina modula los receptores hipofisarios de estradiol y de LHRH (De Nicola y col., 1981;

Clayton y Bayley, 1984).

Estos experimentos fueron realizados en animales adultos. Sin embargo, en los animales jóvenes, la regulación endócrina, así como también el sistema dopaminérgico, tienen características especiales (Beck y Wuttke 1977; Becú-Villalobos y Libertun, 1986; Blank y col., 1979; Ojeda y col., 1977; Wuttke y col., 1980). Nuestro interés se centró en determinar si el Haloperidol podía modificar la LH sérica en ratas prepúberes y si existían diferencias sexuales en la respuesta a la droga. También estudiamos las diferencias sexuales en el efecto hiperprolactinéxico del neurotrópico y la participación de la diferenciación sexual encefálica sobre las diferentes respuestas de prolactina y LH.

MATERIALES Y METODOS

1) ANIMALES: MODELOS EXPERIMENTALES

Se usaron ratas de la especie Rattus norvegicus de la cepa Sprague-Dawley del IBYME. Los animales se encontraban en condiciones controladas de temperatura, ciclo luz-oscuridad (12hs:12hs, las luces se encienden a las 7.00 hs y se apagan a las 19.00 hs) y recibieron comida y agua a voluntad.

Se pusieron a aparear en jaulas 5 ratas hembras por

macho. Las ratas preñadas se separaron en cajas individuales 48 horas antes del parto. Las crías permanecieron con sus madres hasta el momento del experimento o hasta cumplir los 22 días de vida. A esta edad fueron destetadas y agrupadas por sexo, hasta 10 ratas por jaula.

Machos y hembras de 12, 20 y 28 días fueron inyectados en forma intraperitoneal con Haloperidol (0.25 mg/Kg) o con solución salina. A los 50 minutos de la inyección fueron decapitados.

En ratas de 12 días se probó también el antidopaminérgico Sulpiride, en dosis de 1 mg/Kg, en forma de inyección subcutánea. Los animales se decapitaron dos horas después.

Para la segunda parte de los experimentos se castraron machos antes de cumplir las 24 horas de vida, bajo anestesia por frío y se androgenizaron hembras con una inyección de 100 μ g de propionato de testosterona al día de edad. Estos animales se utilizaron al cumplir 12 días de edad. Recibieron una inyección intraperitoneal de Haloperidol (0.25 mg/Kg) o de solución salina, y se decapitaron 50 minutos más tarde.

En todos los casos se recolectó sangre troncal, separaron los sueros por centrifugación y se congelaron a -20°C . Los niveles hormonales se determinaron por radioinmunoensayo.

2) DROGAS UTILIZADAS

Las dosis fueron elegidas de acuerdo a experiencias previas de nuestro laboratorio.

Haloperidol: antidopaminérgico del grupo de las butirofenonas (Janssen), inyectado intraperitonealmente en dosis de 0.25 mg/Kg en solución salina.

Sulpiride: antidopaminérgico, antagonista específico de los receptores D₂ (donado por Roemmers Argentina), inyectado por vía subcutánea en dosis de 1 mg/Kg en solución salina.

Propionato de Testosterona: (Sigma, Missouri) inyectado por vía subcutánea en dosis única de 100 µg /animal, disuelto en aceite de maíz.

3) RADIOINMUNOENSAYOS

Se utilizó el radioinmunoanálisis por doble anticuerpo (Libertun, 1980) las muestras fueron evaluadas por duplicado en alícuotas de suero de rata que oscilaban entre 20 y 100 µl.

PROLACTINA: Se cuantificó usando el juego de reactivos provistos por el NIADDK, Instituto Nacional de Salud, Maryland, Estados Unidos.

A continuación se describirá el procedimiento de marcación, que es similar para prolactina, LH, FSH y TSH. Al describir los radioinmunoensayos de LH, FSH y TSH sólo se mencionarán aquellos puntos que difieran. Lo mismo se aplica para la preparación de antisueros y standards de referencia.

Para la marcación se utilizó prolactina de rata purificada (NIADDK rPRL-I-5), 5 µg, con una actividad biológica de 30 UI/mg por el análisis de Nicoll del buche de paloma, y contaminación mínima con somatotrofina y tirotofina. La hormona liofilizada fué disuelta en solución de CO₂HNa 0.01M a una concentración final de 200 µg/ml. La marcación se efectuó en tubos de vidrio, bajo campana. Se usó ¹²⁵I (New England Nuclear), libre de portador y apto para marcar proteínas. Las soluciones empleadas fueron: buffer fosfato 0.5M pH 7.5; buffer fosfato 0.05M pH 7.5; buffer fosfosalino compuesto por buffer fosfato 0.01M, ClNa 0.15M y Mertiolate 0.01% pH final 7.4; solución de transferencia: 100 mg de IK, 0.8 g de sacarosa, H₂O csp 10 ml; solución de cloramina T: 100 mg/100 ml de buffer fosfato 0.05M preparada inmediatamente antes de su uso; solución de metabisulfito de sodio: 25 mg/10 ml de buffer fosfato 0.05M.

La columna de cromatografía usada para la separación de la hormona marcada del ¹²⁵I libre fue de Biogel P60, 100-200 mesh, en buffer fosfato 0.05M. Los sitios activos de dicha columna fueron saturados previamente mediante el pasaje de 2 ml de buffer fosfosalino con EDTA 0.05M y 2% de seroalbúmina

bovina.

El procedimiento fué el siguiente: a la hormona disuelta en la solución de CO_3HNa se le añadieron 25 μl de buffer fosfato 0.5M y luego 1 mCi de ^{125}I . La oxidación se efectuó con 10 μl de la solución de cloramina T, bajo agitación suave durante 60 segundos. La reacción fué detenida con 25 μl de metabisulfito de sodio. Luego se agregaron 100 μl de la solución de transferencia, y el contenido del tubo de marcación fué pasado a la columna de separación. El buffer de corrida fué el buffer fosfato 0.05M. Se recogieron aproximadamente 500 μl de eluido por tubo, y se leyeron 10 μl de cada uno en un contador gamma. Con estas columnas de separación se obtenía una buena separación del pico de la hormona marcada y del ^{125}I que no había sido incorporado. Los mejores tubos de la marcación se reunieron en uno y se congelaron en alícuotas para posterior dosaje de actividad radioinmunológica.

El primer antisuero contra prolactina de rata fué obtenido en conejos (NIADDK-anti-rPRL-S-9). Se diluyó en buffer fosfosalino, EDTA 0.05M con 2% de suero de conejo normal, pH 7.4, a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo (entre 1:1500 y 1:2500). El standard de referencia fué prolactina de rata NIADDK-rPRL-RP-3, con una actividad biológica de 30 UI/mg. Los patrones, que iban de 0.0396 ng a 10 ng por tubo, se prepararon en buffer fosfosalino con 1% de albúmina de huevo. La separación se logró por segundo

anticuerpo, usando antisuero de oveja contra globulina de conejo, a diluciones de trabajo establecidas previamente.

El protocolo de rutina fué el siguiente: el primer día se agregaba el primer anticuerpo a los sueros preparados; luego de una incubación de 24 horas a 4°C, se agregaba la hormona trazadora; el tercer día el segundo anticuerpo; y luego de 48 a 72 horas se separaba la hormona libre de la acomplejada por centrifugación. El sobrenadante era aspirado y se leía la radioactividad en el precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo, en un contador gamma.

LH: El ensayo y los buffers usados para su medición fueron esencialmente los mismos, con las siguientes modificaciones: se usó el método heterólogo desarrollado por Niswender y col. (1968). La hormona trazadora fué, en este caso, LH purificada aislada de glándulas ovinas por Reichert y col. (LER 1056). Como primer antisuero se utilizó el obtenido por Niswender y col. inmunizando conejos con LH ovina emulsionada en adyuvante de Freund completo. Dicho antisuero reacciona no sólo con la LH de la oveja sino con la de numerosas especies, incluyendo la rata y el mono. Las diluciones de trabajo fueron de 1:20000 a 1:25000. Como preparación de referencia se usó la LH purificada de hipófisis de rata (NIAMDD-rat-LH-RP-2), con una potencia de 61 x NIADDK-r-LH-RP-1, con mínimos contaminantes de FSH y TSH. La curva patrón se extendía de 4 a 0.008 ng por tubo.

RESULTADOS

El efecto de una inyección aguda de haloperidol sobre los niveles séricos de LH se muestra en la figura II-1. Observamos que solamente en las hembras de 12 días existe un aumento significativo de la hormona. En las hembras de 20 días se observa una respuesta menor, estadísticamente no significativa. A los 28 días no se observa respuesta, ni tampoco en los machos de ninguna edad.

En el caso del Sulpiride, a los 12 días de edad, solamente se observa respuesta en las hembras, pero no en los machos (Figura II-2).

En todos los grupos tratados con haloperidol se observó hiperprolactinemia creciente con la edad, siendo mayores los niveles de prolactina sérica en hembras que en machos a los 20 y a los 28 días de edad (Figura II-3).

El haloperidol no tuvo efecto sobre la liberación de LH a los 12 días de edad, en las hembras androgenizadas al nacer. En los machos castrados neonatalmente los niveles basales de LH se encontraron elevados y el haloperidol produjo un aumento

significativo (Figura II-4). En estos grupos también el haloperidol elevó los niveles séricos de prolactina (figura II-5).

DISCUSION

Nuestros resultados indican que en las hembras menores de 20 días el sistema dopaminérgico es de importancia en la regulación de la secreción de LH. El haloperidol produce liberación de LH en las hembras de 12 días y, en menor medida, en las de 20 días. Por el contrario, en los machos de las mismas edades no se observa respuesta de LH al haloperidol, sugiriendo la inexistencia de un control dopaminérgico inhibitorio de la secreción de la hormona o una falta de sensibilidad de los receptores dopaminérgicos involucrados en el control de la secreción de LH. Los resultados similares obtenidos con Sulpiride en los animales de 12 días indican que el efecto del haloperidol se debe a su acción antidopaminérgica y no a efectos colaterales inespecíficos.

En ratas hembras adultas el haloperidol, administrado el día del proestro, bloquea el pico de LH y la consiguiente ovulación (Krieg y Cassidy, 1984), mientras que no tiene efectos sobre los niveles de LH en machos adultos (Weiner y Ganong, 1978). Otros antagonistas dopaminérgicos como la

domperidona o el butaclamol tampoco alteran los niveles basales de LH en ratas adultas (Carter y col, 1982; Drouva y Gallo, 1977).

Sin embargo, se ha demostrado que la regulación de la LH en las hembras inmaduras tiene características especiales con respecto al sistema dopaminérgico. Por ejemplo, Wuttke y col. (1980) describieron que se puede inhibir la secreción de LH con dosis de Piribedil o Apomorfina inefectivas en los adultos. Se ha visto además, que los niveles de LH en las hembras prepúberes son muy sensibles a varias drogas neurotrópicas, especialmente en el período de los 10 a los 18 días de edad. En esta etapa el hipotálamo es hipersensible a la acción liberadora de LH del naloxone (Blank y col., 1979) y de la serotonina (Decú-Villalobos y Libertun, 1986) y hay una máxima respuesta de la hipófisis al LHRH (Debeljuk y col., 1972, Ojeda y col., 1977). La liberación de LH en respuesta a LHRH, naloxone y serotonina disminuye gradualmente a partir de la tercera semana de vida. En el caso del haloperidol vemos que la respuesta de LH a la droga sigue el mismo patrón, ya que es máxima a los 12 días, un poco menor a los 20, y ha desaparecido por completo a los 28 días de edad.

Nuestros resultados indican que la diferencia de respuesta de LH al haloperidol entre machos y hembras prepúberes está relacionada con la exposición neonatal a los andrógenos. A los 12 días de edad, cuando la respuesta es máxima en las hembras, las hembras androgenizadas al nacer no

responden, de la misma manera que tampoco lo hacen los machos. En el caso de los machos castrados al nacer, el haloperidol libera LH a pesar de los altos niveles basales de la hormona. Estos niveles altos de LH se deben a la castración neonatal, que produce, en el macho, valores de LH mayores aún que los producidos por una castración más tardía y que afecta la respuesta de LH a los estrógenos durante la adultez (Lescoat, 1983; Weiland y Barraclough, 1984).

Es interesante destacar que en los machos prepúberes el 5-hidroxitriptofano y el naloxone no tienen acción sobre la LH a diferencia de lo que sucede en las hembras; la androgenización neonatal de las hembras masculiniza el efecto de estas drogas, mientras que la castración neonatal de los machos facilita su acción liberadora de LH (Becú-Villalobos y col., 1984; Sylvester y col., 1985). Estos resultados en conjunto con nuestros datos sugieren que las ratas hembras prepúberes (10-18 días de edad) son particularmente sensibles al efecto liberador de LH de algunas drogas, y que esta sensibilidad está sexualmente diferenciada.

Estos resultados también sugieren que el avance de la pubertad producido por tratamiento con sulpiride o pimozide (Advis y col., 1981; Advis y Ojeda, 1978) podría estar relacionado, no sólo con modificaciones de la secreción de prolactina, sino también con pequeños cambios en la secreción de LH. En este aspecto Ojeda y col. demostraron que cuando el animal se acerca a la pubertad existen cambios en el patrón de

secreción de LH (Andrews y Ojeda, 1981; Urbansky y Ojeda, 1985; Urbansky y Ojeda, 1986).

Por otro lado, la liberación de prolactina en respuesta al haloperidol 0.25 mg/Kg fué mayor en las hembras que en los machos; esta diferencia sexual aumentó con la edad tal como lo habíamos descripto usando haloperidol 1 mg/Kg (Becú-Villalobos y Libertun, 1982).

En conclusión, describimos una diferencia sexual en el control de la secreción de LH en ratas prepúberes. Sugerimos que la LH está bajo un control dopaminérgico inhibitorio en la hembra, durante las segunda y tercera semana de vida, y que este control se debilita a medida que el animal madura. Además la androgenización temprana de las estructuras cerebrales que controlan la secreción de LH sería responsable de las diferencias sexuales encontradas.

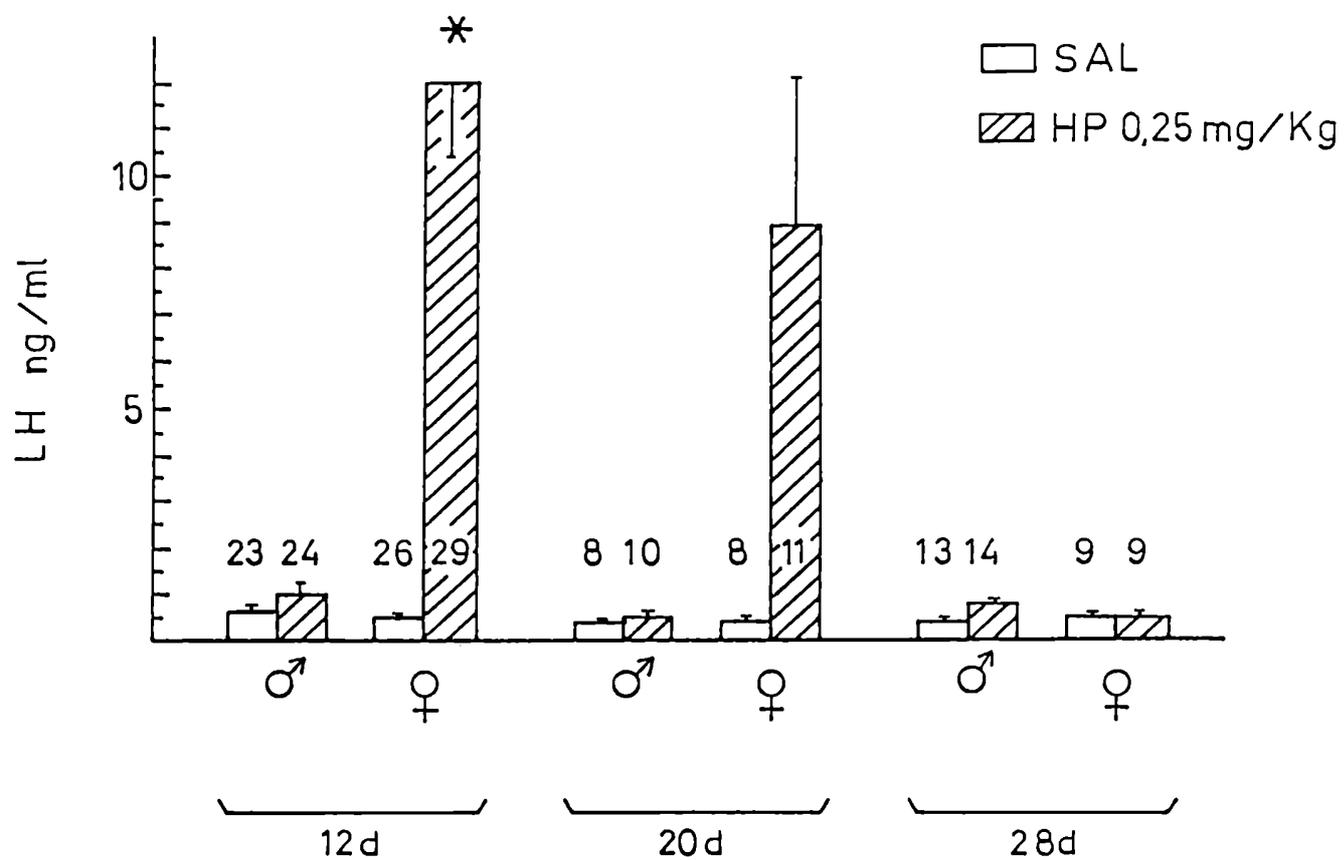


Figura II-1: Efecto del Haloperidol (0.25 mg/Kg) sobre la LH en machos y hembras de 12, 20 y 28 días.
 * $p < 0.05$ con respecto al grupo control de hembras de 12 días de edad.

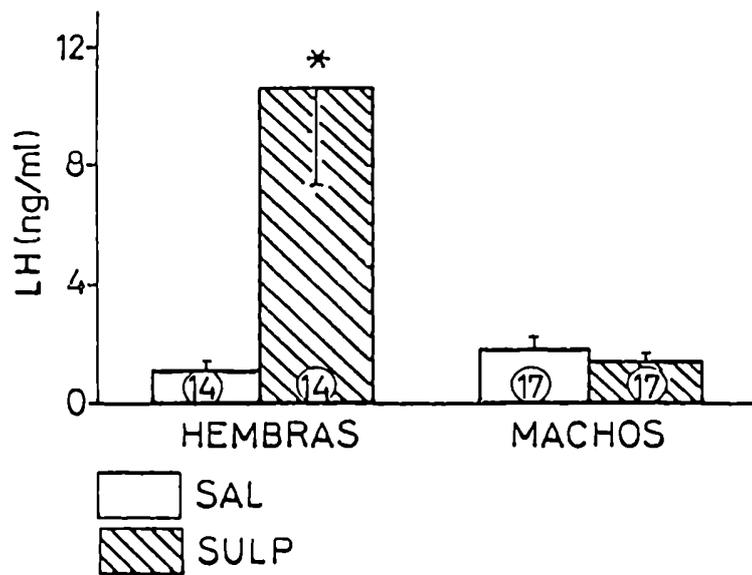


Figura II-2: Efecto de una inyección aguda de Sulpiride (1 mg/Kg) sobre la LH en ratas machos y hembras de 12 días de edad.

* $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

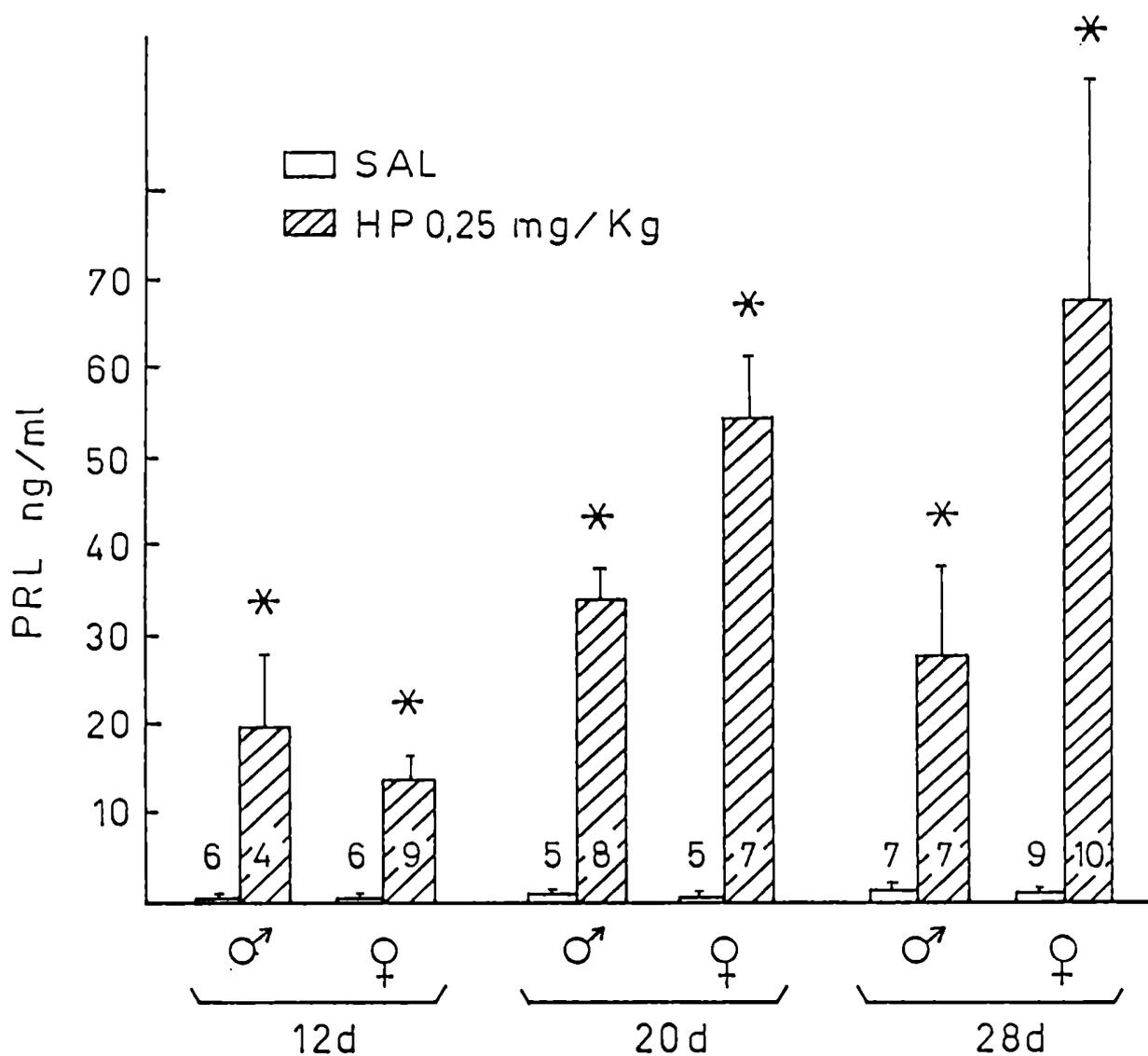


Figura II-3: Efecto del Haloperidol (0.25 mg/Kg) sobre los niveles séricos de prolactina en ratas machos y hembras de 12, 20 y 28 días de edad. En todos los casos: * $p < 0.05$ con respecto al grupo control del mismo sexo y edad.

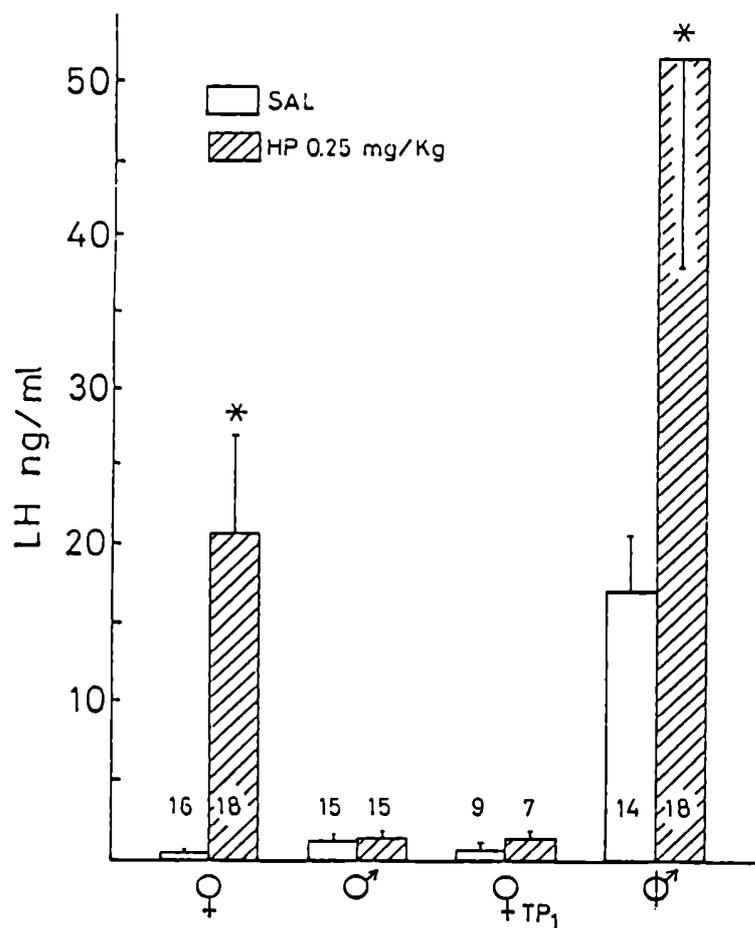


Figura II-4: Efecto de una inyección aguda de Haloperidol (0.25 mg/Kg) sobre los niveles de LH de ratas hembras, machos, hembras androgenizadas al nacer y machos castrados neonatalmente, a los 12 días de edad.

* $p < 0.05$ con respecto al grupo control correspondiente.

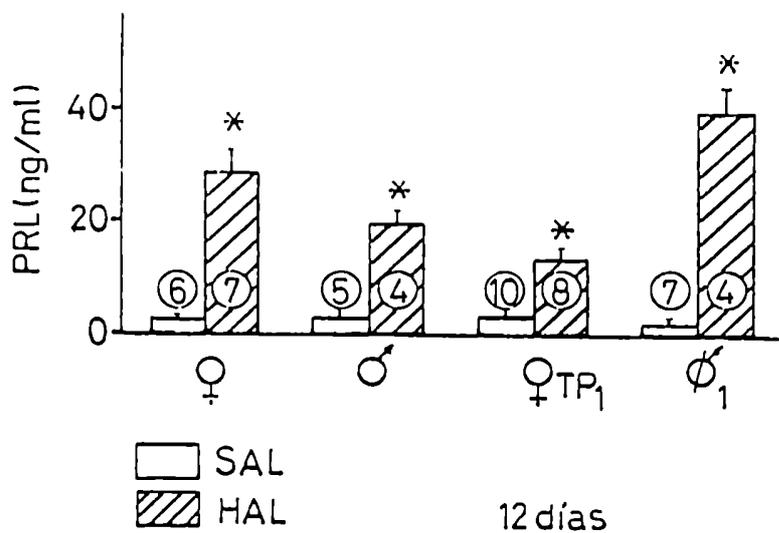


Figura II-5: Efecto de una inyección aguda de Haloperidol (0.25 mg/Kg) sobre la prolactinemia de ratas hembras, machos, hembras androgenizadas al nacer y machos castrados neonatalmente, a los 12 días de edad.
 * p<0.05 con respecto al grupo control correspondiente.

CAPITULO III

REGULACION DE LA FSH EN LA RATA INFANTIL : CARACTERISTICAS ES- PECIALES DE SU ESTIMULACION POR DROGAS NEUROTROPICAS EN LA HEMBRA.

Desde el día 5 hasta el día 17-18 de vida, la secreción de FSH se encuentra aumentada en la rata hembra (Dohler y Wuttke, 1975). Este patrón de secreción es esencial para el desarrollo normal de los folículos ováricos (Ojeda y col., 1980; Hage y col., 1978). Tanto la LHRH como los estrógenos y la inhibina, están involucrados en el control de esta secreción. Se ha demostrado que la respuesta de la FSH a la LHRH, tanto *in vivo* como *in vitro*, está aumentada durante las dos primeras semanas de vida y es máxima entre los 10 y 15 días de edad (Ojeda y col., 1977; Dullaart, 1977). Por otro lado, los valores altos de FSH estarían relacionados con un control de retroalimentación (feed-back) negativo por estradiol relativamente inefectivo, y un control androgénico parcialmente efectivo (Andrews y Ojeda, 1981; Caligaris y col., 1973). A partir del día 15 madura el control por

estradiol y disminuyen los niveles de FSH. Finalmente, se ha demostrado, que la inhibina y sus péptidos relacionados no estarían presentes inhibiendo la secreción de FSH entre los días 5 y 10 de vida, tal como lo demuestran estudios de inmunoneutralización (Rivier y Vale, 1987). También se ha observado que cuando disminuyen los niveles de FSH es cuando aumentan los de inhibina (Rivier y Vale 1987; Sander y col., 1985).

Estos datos sugieren que la regulación de FSH en la hembra infantil es diferente que en la hembra adulta, como también lo es el control de LH: hay una gran sensibilidad de LH al efecto liberador de la LHRH (Ojeda y col., 1977; Dullaart, 1977), naloxone (Blank y col., 1979; Ieri y col., 1979), serotonina (Becú-Villalobos y Libertun, 1986) y haloperidol (ver sección anterior).

Hasta que no se demuestre lo contrario, se acepta que FSH y LH comparten el mismo factor liberador. Fué entonces muy interesante estudiar el efecto de drogas neurotrópicas, que no tienen o tienen poco efecto sobre la FSH en la adultez (Piva y col., 1985; Jimenez y Walker, 1985; Dickerman y col., 1974; Moguilevsky y col., 1985) y tienen efecto liberador de LH en la hembra inmadura (cap. I), sobre la secreción de FSH en la hembra infantil.

Por otro lado, como el patrón de secreción de FSH durante el desarrollo en el macho, es totalmente diferente al de la hembra (Dohler y Wuttke, 1975) no sólo estudiamos los efectos

de las drogas durante el desarrollo sino también sus diferencias sexuales.

MATERIALES Y METODOS

1) ANIMALES: MODELOS EXPERIMENTALES

Se usaron ratas machos y hembras adultas y de 1, 12, 20 y 28 días de edad de la cepa Sprague-Dawley del IBYME. Cuando se usaron hembras adultas, se controlaron los ciclos por extendidos vaginales diarios, se seleccionaron las ratas con ciclos regulares de por lo menos dos semanas, y se usaron en diestro. Los experimentos se realizaron siempre entre las 10.00 y las 12.00 hs.

Ratas de las diferentes edades se inyectaron con naloxone (2 mg/Kg, sc), 5-hidroxitriptofano (50 mg/Kg, sc), haloperidol (0.25 mg/Kg, ip) o solución salina en volumen equivalente. Las dosis y las vías de inyección fueron elegidas de acuerdo a experiencias previas de nuestro laboratorio. Todas las drogas se disolvieron en solución salina. Los animales fueron decapitados a los 30, 60 y 50 minutos de las inyecciones de

cada droga, respectivamente. Se hicieron controles para los diferentes tiempos de decapitación y para las diferentes vías de inyección. Como no se encontraron diferencias entre controles de cada edad, los resultados se agruparon para la ratas de 1 día. Se recolectó sangre troncal, se separaron los sueros por centrifugación y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento. Para estos experimentos se usó un total de 770 animales.

2) DROGAS UTILIZADAS

Haloperidol: antidopaminérgico del grupo de las butirofenonas (Janssen), inyectado intraperitonealmente en dosis de 0.25 mg/Kg en solución salina.

Naloxone: N-alil-noroximorfona, antagonista opiáceo (Dupont Pharmaceuticals), inyectado por vía subcutánea en dosis de 2 mg/Kg en solución salina.

5-hidroxitriptofano: precursor biosintético de la serotonina (Sigma, Missouri), inyectado por vía subcutánea en dosis de 50 mg/Kg en solución salina.

3) RADIOINMUNOENSAYOS

El método utilizado para medir FSH fué similar a los anteriormente descritos para prolactina y LH. A continuación lo describimos brevemente con las variaciones pertinentes.

El esquema patrón para marcación y protocolo es similar al usado para prolactina, con las siguientes variaciones: la hormona trazadora fue NIADDK-rFSH-I-6, con potencia biológica de 100 x NIH-FSH-S1 (ensayo de elevación por HCG) y contaminación por rLH o rTSH menor al 1% y por rPRL o rGH menor al 0.1%. El primer antisuero fue obtenido en conejo contra FSH purificada de rata (NIADDK-anti-rFSH-S-11), siendo la dilución de trabajo de 1:2000 a 1:2500. El standard de referencia fue FSH purificado de rata (NIADDK-rFSH-RP-2) con una potencia de 45 x NIAMDD-rFSH-RP-1. La curva patrón se extendió desde 15.04 a 0.1175 ng por tubo.

Para las ratas de 1 día de edad cada determinación se realizó (por duplicado) juntando el suero de tres de ellas para conseguir el volumen necesario.

RESULTADOS

Los niveles basales de FSH de las hembras fueron altos al nacimiento (día 1) y a los 12 días de edad y bajaron marcadamente a los 20 días, mientras que en los machos fueron aumentando gradualmente desde el nacimiento hasta los 28 días de edad.

En las hembras, el haloperidol produjo un aumento significativo de FSH a los 12 días de edad. A los 20 días el efecto se esbozó, pero no fue estadísticamente significativo. No tuvo efecto a ninguna otra edad ni en los machos (figura III-1).

Del mismo modo, tanto el naloxone como la 5-hidroxitriptamina, liberaron FSH a los 12 días de edad en las hembras. A los 20 días no se observó el efecto. Los machos no respondieron a ninguna edad (figuras III-2 y III-3).

Cuando se repitieron los experimentos en machos y hembras adultos no se encontró que las drogas utilizadas produjeran ninguna modificación de los niveles de la FSH (figuras III-4 y III-5).

DISCUSION

Estos resultados muestran que la estimulación de FSH por agentes neurotrópicos en la hembra infantil tiene características particulares que son propias y únicas de este período y sexo. A los 12 días de edad, el Haloperidol, el naloxone y el 5-hidroxitriptofano producen una clara liberación de FSH que no se repite a ninguna otra edad ni en los machos.

En cuanto al efecto del antagonista opiáceo naloxone sobre la FSH, en la bibliografía se encuentran datos contradictorios. Algunos autores describen que el naloxone puede alterar simultáneamente la LH y la FSH mientras que otros opinan que sólo es capaz de modificar la LH sin alterar la FSH. Por ejemplo, aumentos de ambas gonadotrofinas se observaron en: ratas machos (Bruni y col., 1977), después de un tratamiento prolongado (Marini y col., 1984), en ratas hembras castradas (Bhanot y Wilkinson, 1983) y en experimentos *in vitro* (Cacicedo y Sanchez Franco, 1986). En cambio, no se vieron cambios en FSH aunque sí en LH por inyecciones subcutáneas o intraventriculares en machos (Marini y col., 1984; Piva y col., 1986) y en diferentes fases del ciclo estral en hembras (Piva y col., 1985; Muraki y col., 1979; Koves y col., 1981; Ieri y col., 1980). Las discrepancias probablemente se

deban a que el entorno hormonal es diferente en cada caso e influye en la regulación de las gonadotrofinas (Blank y col., 1979; Piva y col., 1985; Piva y col., 1986; Petraglia y col., 1984; Spencer y Whitehead, 1986). En nuestros experimentos, el naloxone no fué capaz de liberar FSH en los adultos, en los cuales el control de FSH por inhibina y de ambas gonadotrofinas por el feedback negativo esteroideo está bien establecido, contrastando con la situación de la hembra infantil en la cual el feedback negativo por estradiol es relativamente inefectivo y se encuentran bajos los niveles de inhibina (Ojeda y col., 1980; Caligaris y col., 1973; Andrews y Ojeda, 1981; Rivier y Vale, 1987; Sander y col. 1985).

Entre los pocos trabajos existentes sobre la regulación de FSH por serotonina, se han descrito efectos inhibitorios, facilitatorios y nulos. Por ejemplo, implantes de serotonina en la eminencia media de machos castrados tuvieron como resultado un descenso en la cantidad de FSH en la hipófisis (Martini, 1969) y una inyección de la droga en el tercer ventrículo produjo una disminución de la FSH sérica en ratas machos (Kamberi y col., 1971). Por otro lado, un exceso de serotonina aumentó la FSH sérica en ratas machos (Niaraki y col., 1982) y un pretratamiento con 5-hidroxitriptofano en hembras castradas tratadas con estradiol aumentó la respuesta de FSH a la progesterona (Franks y col., 1980). No se encontraron efectos de la serotonina ni del 5-hidroxitriptofano

en machos, ni en hembras ovariectomizadas (Franks y col., 1980; Porter y col., 1971/1972; Ruzsas y col., 1982). Nuestros resultados en adultos están de acuerdo con una ausencia de efecto del indol sobre FSH , pero los experimentos con ratas infantiles ponen de manifiesto un papel facilitatorio del 5-hidroxitriptofano sobre la FSH en la situación endócrina particular de la hembra a esta edad.

Se ha descrito que también la dopamina tiene efecto dual sobre la secreción de FSH así como de LH (Weiner y Ganong, 1978; Steger y Morgan, 1985). Después de una inyección intraventricular de dopamina a ratas machos se observó tanto estimulación como ausencia de alteraciones de la FSH (Kamberi y col., 1971) mientras que el agonista dopaminérgico bromocriptina no modificó los niveles de la hormona en hembras ni en machos adultos (Clayton y Bailey, 1984). En experimentos usando agentes antidopaminérgicos los resultados tampoco son concluyentes: una inyección de haloperidol o pimozide disminuyó los niveles de FSH (Dickerman y col., 1974; Beatie y col., 1976; Ojeda y McCann, 1973), el pimozide no afectó el pico preovulatorio de FSH (Kun y col., 1985) y la domperidona y la metoclopramida no tuvieron efecto sobre la hormona circulante pero aumentaron la FSH hipofisaria (Clayton y Bailey, 1984). De nuestros resultados se desprende que las neuronas dopaminérgicas no participarían directamente de la regulación de FSH en el adulto aunque tendrían un rol

inhibitorio en la hembra infantil.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los niveles altos de FSH en la hembra infantil, están bajo control opiáceo y dopaminérgico, ya que sus respectivos antagonistas producen un aumento significativo de la hormona. Esto podría estar relacionado con el control androgénico previamente mencionado (Andrews y Ojeda, 1981). Por otro lado hay una alta sensibilidad al efecto liberador no sólo de LHRH sino de 5-hidroxitriptofano. Esta droga podría estar actuando a través de la liberación de LHRH. A medida que madura el feedback negativo por estradiol y aumenta la influencia de la inhibina (Caligaris y col., 1973; Rivier y Vale, 1987; Sander y col., 1985) el incremento de FSH producido por LHRH y 5-hidroxitriptofano disminuye. Por otro lado, los controles inhibitorios opiáceo y dopaminérgico de la gonadotrofina se hacen cada vez más inefectivos a medida que el animal madura, tal como se describió para el control opiáceo (Bhanot y Wilkinson, 1983) y dopaminérgico (ver cap I) de la LH. Estas variaciones podrían, en parte, explicar el cambio de una dominancia relativa de FSH hacia una de LH que ocurre durante el desarrollo prepuberal (Dullaart, 1977).

Finalmente, las marcadas diferencias sexuales observadas pueden estar relacionadas con los altos valores de testosterona presentes en el plasma de los machos hasta alrededor del día 17 de vida, a diferencia de las hembras en las

cuales son muy bajos los niveles de andrógenos (Dohler y Wuttke, 1985), y por los distintos niveles de inhibina que son altos en el macho en la etapa infantil y luego disminuyen (Rivier y col., 1988). Los niveles de estrógenos, en cambio, son muy similares en ambos sexos durante el desarrollo. Las diferencias sexuales en los patrones de secreción de gonadotrofinas en la rata inmadura también fue relacionada con el tamaño de los gonadotropos (Dada y col., 1985) y con las diferentes concentraciones hipofisarias de FSH que son mucho mayores en las hembras que en los machos inmaduros (Dada y col., 1985; Aubert y col., 1985). Por otro lado, la diferenciación sexual del encéfalo podría ser responsable de las diferencias sexuales encontradas tal como se describió para los efectos LH-liberadores del Haloperidol (ver cap. I), naloxone y 5-hidroxitriptofano en las ratas prepúberes (Sylvester y col., 1985; Schultz y col., 1985; Moguilevsky y col., 1987).

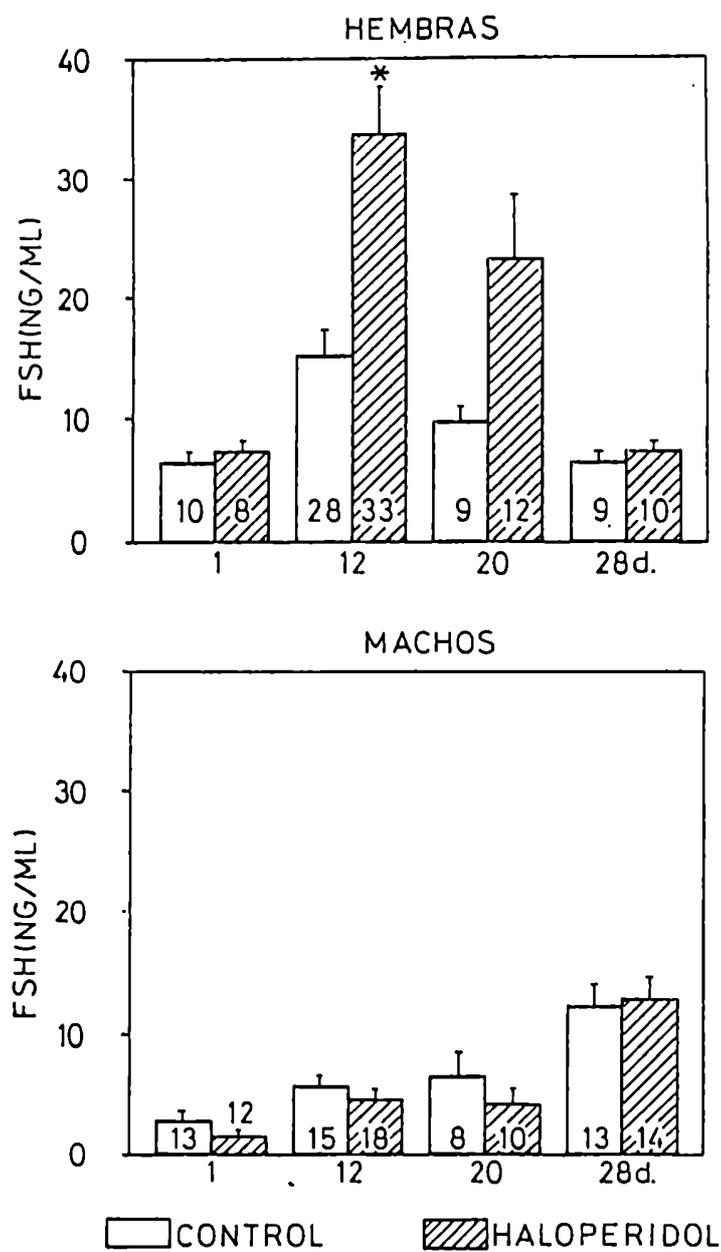


Figura III-1: Efecto de una inyección aguda de Haloperidol, en dosis de 0.25 mg/Kg, sobre los niveles séricos de FSH en ratas machos y hembras de 1, 12, 20 y 28 días de edad.
 * $p < 0.05$

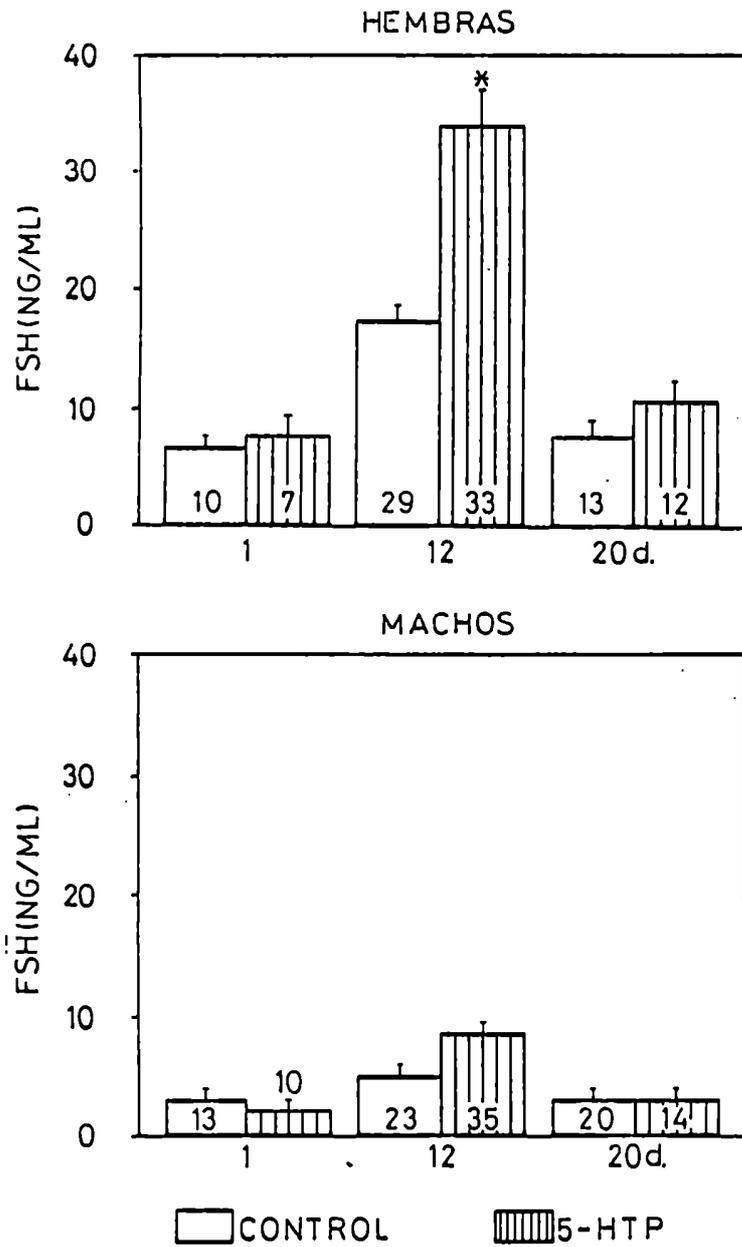


Figura III-2: Efecto de una inyección aguda de 5-hidroxitriptofano (50 mg/Kg), sobre los niveles de FSH de ratas machos y hembras de diferentes edades.

* $p < 0.05$

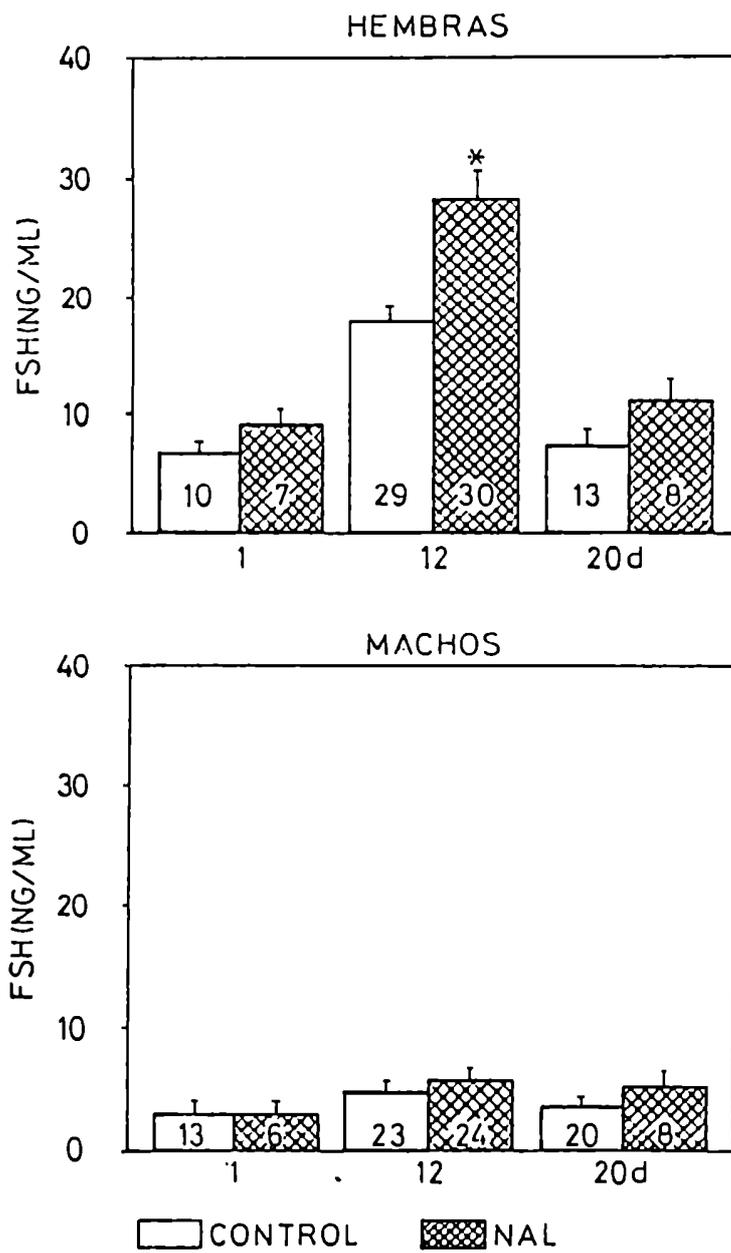


Figura III-3: Efecto del naloxone (2 mg/Kg) sobre la FSH de ratas machos y hembras al día de edad y a los 12 y 20 días.
* $p < 0.05$

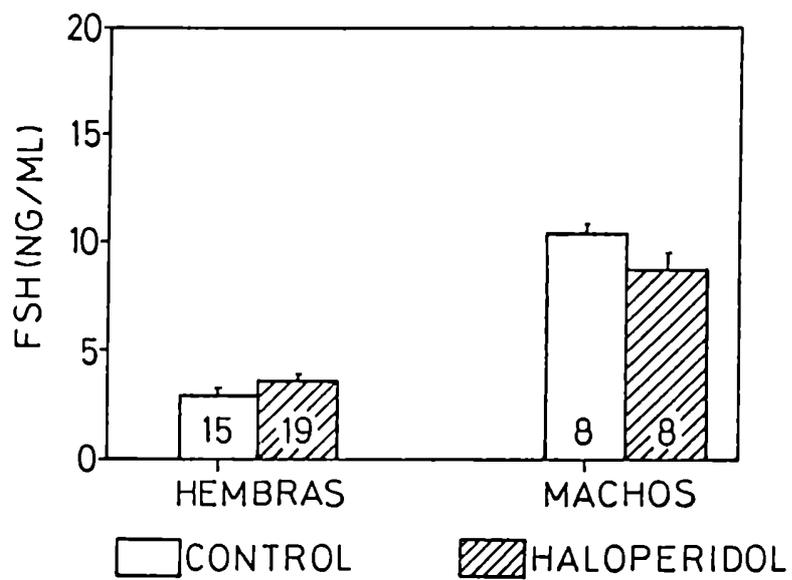


Figura III-4: Efecto del haloperidol (0.25 mg/Kg) sobre la FSH en ratas machos adultos y hembras adultas en diestro.

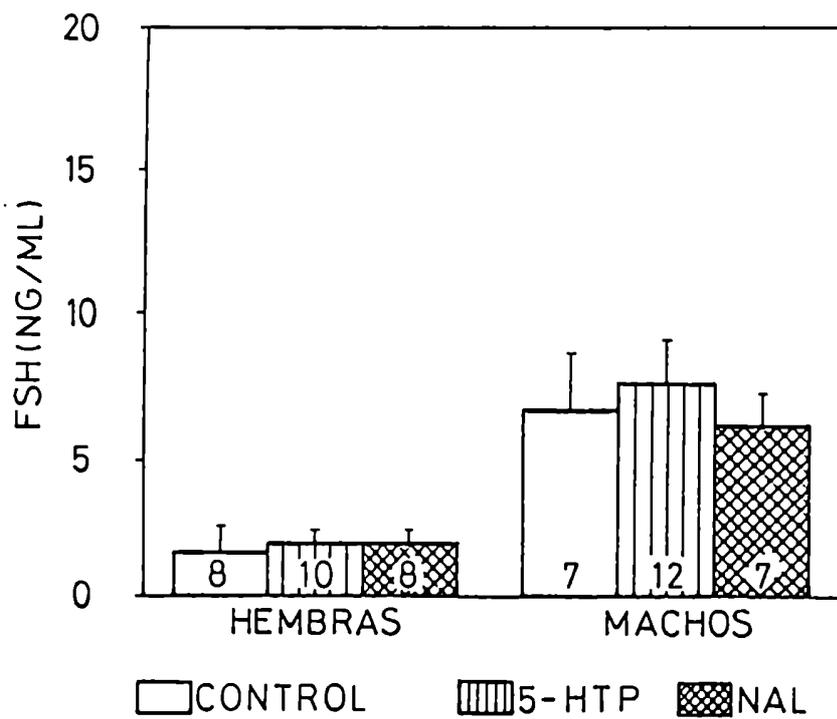


Figura III-5: Efecto del 5-hidroxitriptofano y el naloxone sobre la FSH sérica de ratas machos adultos y hembras adultas en diestro.

CAPITULO IV

DIAZEPAM Y HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS DURANTE EL DESARROLLO

Tal como vimos en la sección introductoria, el GABA participa en la regulación de la secreción adenohipofisaria. Se ha demostrado que las benzodiazepinas (BDZ), drogas ansiolíticas de gran difusión en medicina psiquiátrica, interaccionan con la transmisión GABAérgica (Haefely, 1984; Tallman y Gallager, 1985). Estas drogas se unen a un receptor específico (Braestrup y Squires, 1977; Mohler y Okada, 1977) que forma parte de un complejo macromolecular con un sitio de unión para GABA y un sitio de unión para BDZ acoplados a un ionóforo para el cloro. En la figura IV-1 se observa uno de los esquemas propuestos para este receptor (Thomas y Tallman, 1984). Este complejo ha sido aislado en varias oportunidades (Barnard y col, 1984; Thomas y Tallman, 1984) e inclusive fue reconstituído en vesículas fosfolipídicas (Sigel y col., 1985). También se han logrado anticuerpos monoclonales específicos antirreceptor de benzodiazepinas (DeBlas y col., 1985).

El ligando endógeno para este receptor no ha sido aún

establecido con certeza. Se han aislado diversos compuestos de varios tejidos capaces de interactuar con el receptor de BDZ: Proteínas, bases púricas, nucleótidos, derivados indólicos y, a veces, sustancias no identificadas (Hamon y Soubrié, 1985; Medina y col. 1986) con pesos moleculares entre 122 (nicotinamida) y 70000 daltons (ver tabla I, tomada de Hamon y Soubrié, 1985).

Se ha demostrado que existe heterogeneidad en los receptores de BDZ cerebrales. Existe un receptor de tipo central, con alta afinidad para el antagonista específico Ro 15-1788 y baja por el Ro 5-4864. Este receptor central ha sido subdividido, según la unión diferencial de triazolopiridazinas, en dos clases: de tipo 1 (con alta afinidad para las triazolopiridazinas) particularmente abundantes en cerebelo y córtex cerebral, probablemente relacionados con los efectos ansiolíticos y anticonvulsivos de las BDZ, y de tipo 2 (con baja afinidad para las triazolopiridazinas) ubicados preferencialmente en hipocampo y neostriatum e involucrados en la acción sedante de estas drogas (Klepner, 1979; Squires y col, 1980; Lippa y col, 1982). Ambos tipos estarían relacionados con el receptor GABAérgico. Además existe un tipo de receptor llamado "periférico" con baja afinidad por el Ro 15-1788 y alta por el Ro 5-4864, que se describió primeramente en tejidos periféricos, pero que posteriormente se encontró en sistema nervioso central (Shoemaker y col. 1981). Finalmente, Bowling y De Lorenzo (1982) describieron

una cuarta categoría de sitios de unión para BDZ con afinidad en el orden μM .

Mediante estudios autorradiográficos se han mapeado los receptores benzodiazepínicos en el sistema nervioso y se ha encontrado que el córtex cerebral y la capa molecular del cerebelo los contienen en alta densidad. Les siguen, en segundo lugar, el sistema límbico, el bulbo olfatorio, el núcleo trigémino espinal, la medula espinal y el hipotálamo (Young y Kuhar, 1980).

El estudio filogenético de Nielsen y col (1978) indicó la presencia de receptores para BDZ en el sistema nervioso central de todas las especies vertebradas estudiadas, excepto en Agnata, pero no en invertebrados. En cambio, cuando se estudiaron en forma comparada los receptores de tipo periférico en cerebro, no se encontraron en vertebrados no mamíferos, lo cual sugeriría una tardía aparición de este tipo de receptor (Bolger y col., 1985).

La ontogenia de estos receptores ha sido estudiada en cerebro total de rata (Braestrup y Nielsen, 1978) y en córtex cerebral y cerebelo (Candy y Martin, 1978). Además, se estudió el desarrollo de receptores de tipo 1 y tipo 2 en hipocampo, córtex cerebral, cerebelo y cerebro total de rata (Lippa y col., 1981; Chisholm y col., 1983; Garret y Tabakoff, 1985).

Con respecto a los efectos de las benzodiazepinas sobre

la secreción adenohipofisaria, no es mucho lo que se ha descrito. Se ha encontrado que algunas BDZ disminuyen los niveles basales de prolactina (Lotz, 1982) e inhiben la liberación de prolactina producida por estímulos farmacológicos o fisiológicos (Grandison, 1982). También se ha demostrado que si bien las BDZ no alteran los niveles basales de TSH, impiden la liberación de esta hormona por la exposición del animal al frío (Camoratto y Grandison, 1983). En humanos, se observó que un tratamiento con Diazepam estimula la secreción de somatotrofina, dependiendo de los niveles de estradiol circulantes (D'Armiento y col., 1984).

Estos experimentos fueron realizados siempre en adultos. Como en este trabajo nos hemos preocupado por la regulación endócrina durante el desarrollo, y los efectos de drogas neurotrópicas dependen del estado de maduración del animal (tal como hemos visto en las secciones anteriores), nos dedicamos al estudio de la ontogenia de los efectos del Diazepam sobre las secreciones adenohipofisarias, siempre en forma comparativa entre los sexos. Además medimos la evolución de los receptores benzodiazepínicos hipotalámicos considerándolos posible sitio de acción de la droga para ejercer su efecto neuroendócrino.

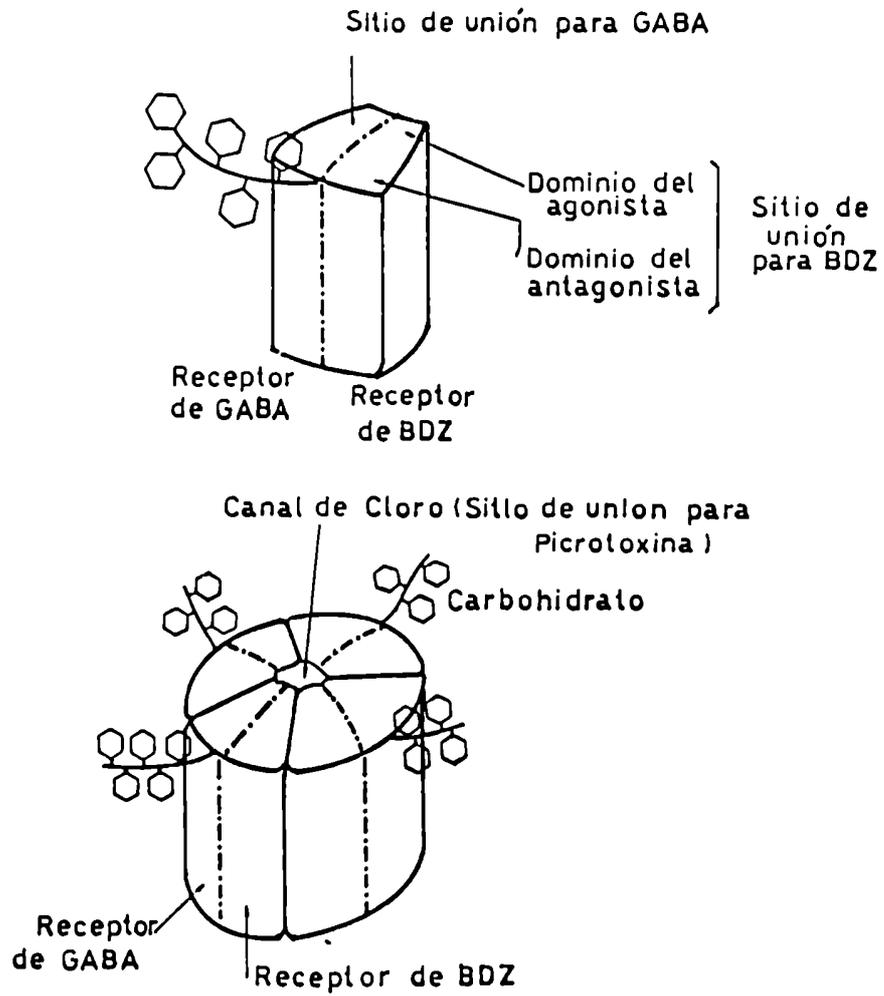


Figura IV-1: Esquema del complejo receptor GABA-benzodiazepina según Thomas y Tallman, 1984. En la parte superior se muestra una subunidad del complejo, cuya estructura tetramérica se observa en la parte inferior del esquema.

Posible ligando	Naturaleza	PM	Acción Farmacológica
GABAmodulina	proteína	16500	(antagonista)
BCF-1	proteína	10-70000	?
Fracción 1	?	700-30000	?
Inhibidor competitivo (fracción 5)	péptido	3000	(antagonista)
Nicotinamida	piridina	122	agonista
Inosina	purina	268	agonista
Hipoxantina	purina	136	agonista
Etil- α -carbolina-3-carboxilato	β -carbolina	228	antagonista
Harmame	β -carbolina	182	antagonista
Trp-gli	péptido	261	(agonista)
DIF (factor inhibidor de la unión del diazepam).	?	< 500	?
Tromboxano A ₂	lípidos	352	(antagonista)
Prostaglandina A ₁	lípidos	336	?
Prostaglandina A ₂	lípidos	334	?
L-tiroxina	aminoácido	777	?

Quando las propiedades farmacológicas se conocen parcialmente se muestran entre paréntesis. El signo de interrogación significa totalmente desconocido.

TABLA IV-I: Posibles ligandos endógenos para el receptor de benzodiazepinas, (tomada de Hamon y Soubrié, 1985).

MATERIALES Y METODOS

1) ANIMALES: MODELOS EXPERIMENTALES

A- ESTUDIOS ENDOCRINOS

a- Estudios ontogénicos

Se pusieron a aparear en jaulas 5 ratas hembras por macho. Las ratas preñadas se separaron en cajas individuales 48 horas antes del parto. Las crías permanecieron con sus madres hasta el momento del experimento o hasta cumplir los 22 días de vida. A esta edad fueron destetadas y agrupadas por sexo, hasta 10 ratas por jaula.

a₁- Ratas hembras y machos de 1, 4, 12, 20, 28 y 38 días de edad fueron inyectadas intraperitonealmente (ip) con solución salina o con Diazepam (2.5 mg/Kg).

a₂- Para evaluar el efecto del Diazepam sobre la hiperprolactinemia producida por Haloperidol (HP), ratas de las mismas edades que en a₁ se dividieron en tres grupos. El primer grupo fué inyectado ip dos veces con salina, el segundo con HP (0.25 mg/Kg) y salina y el tercero con Diazepam (2.5 mg/Kg) e inmediatamente con HP (0.25 mg/kg).

b- Estudios en animales adultos

b₁- Stress por éter: Machos adultos y hembras adultas en

diestro fueron inyectados con Diazepam (5 mg/Kg, ip) o salina y a los 30 minutos fueron sometidos a vapores de éter durante 10 minutos.

b₂ - Hiperprolactinemia por Serotonina o FK 33-824: Machos adultos fueron inyectados con Diazepam (5 mg/Kg, ip) o salina. A los 30 minutos fueron tratados con salina, serotonina (5 mg/Kg, ip) o FK 33-824 (1 mg/Kg, ip).

En todos los experimentos los animales, en desarrollo o adultos, fueron decapitados a los 50 minutos del tratamiento con Diazepam. Se recolectó sangre troncal, se separaron los sueros por centrifugación y se congelaron a -20°C para su posterior análisis por radioinmunoensayos. Para las ratas menores de 12 días fué necesario juntar el suero de hasta 5 de ellas para obtener una determinación por duplicado de cada hormona medida.

B- ESTUDIO DE LOS SITIOS DE UNION A BENZODIACEPINAS

a- animales adultos

a₁ - Machos adultos fueron decapitados e inmediatamente se extrajeron los cerebros que fueron apoyados sobre hielo molido. Se disecaron los hipotálamos, incluyendo el área supraquiasmática de la siguiente manera: se extrajo el área delimitada, anteriormente, por el quiasma óptico, lateralmente, por las fisuras hipotalámicas, y por un corte caudal a

los cuerpos mamilares y dorsalmente, por el surco subtalámico; luego se congelaron a -70°C hasta su procesamiento para la obtención de la fracción cruda de membranas.

a₂- Se castraron hembras adultas y se dividieron en dos lotes. Un lote fue inyectado, dos veces por semana durante dos semanas, con benzoato de estradiol disuelto en aceite (10 ug/rata) por vía subcutánea, y el otro, siguiendo el mismo patrón de tratamiento, con aceite. Los animales se decapitaron 48 horas después de la última inyección y se extrajeron los hipotálamos tal como se describe en el punto anterior.

En todos los casos de receptores en adultos se utilizaron 20 animales por Scatchard.

b- ontogenia

Se recolectaron hipotálamos de ratas de ambos sexos de 1, 4, 12, 20, 28 y 38 días tal como se describe para los animales adultos. Se utilizaron un total de 874 hipotálamos.

2) DROGAS UTILIZADAS

Diazepam: benzodiacepina provista por Roemmers Argentina, inyectado intraperitonealmente en dosis de 2.5 o 5 mg/Kg.

Haloperidol: antagonista dopaminérgico (Janssen), inyectado

intraperitonealmente en dosis de 0.25 mg/Kg.

Serotonina: 5-hidroxitriptamina (Sigma, Missouri), inyectada intraperitonealmente en dosis de 5 mg/Kg en solución salina.

FK 33-824: [D-Ala², MePhe⁴, Met(O)⁵-ol]encefalina, agonista opiáceo sintético de larga duración, inyectada en forma intraperitoneal en dosis de 1 mg/Kg en solución salina.

3) RADIOINMUNOENSAYOS

Se utilizaron los métodos descritos en las secciones anteriores para medir prolactina y LH. Las variantes del método de valoración de TSH se describe a continuación.

TSH: La hormona trazadora fué NIADDK-rTSH-I-8, con potencia biológica de 35 UI/mg (análisis de McKenzie en ratón) y con contaminación con rFSH menor al 1.5%, con rLH menor al 5% y con rPRL o rGH menor al 0.1%. El primer antisuero fué obtenido en conejos contra TSH de rata (NIADDK-anti-rTSH-S-5) siendo la dilución de trabajo de 1:7000 a 1:9000. El standard de referencia fué TSH purificado de rata (NIADDK-rTSH-RP-2) con una potencia de 176 x NIAMDD-rTSH-RP-1, y la curva patrón se extendía de 8 a 0.03125 ng por tubo .

4) ESTUDIO DE LOS SITIOS DE UNION PARA BENZODIACEPINAS

Se estudiaron los receptores de Benzodiazepinas en hipotálamo total de rata, obtenido según se detalla en el punto 1) inciso B de esta misma sección y descongelado en el momento de hacer la preparación de las membranas. Se utilizaron fracciones crudas de membranas preparadas de la siguiente forma: se homogeneizó el tejido en una solución de sacarosa 0.32M mediante un homogeneizador de vidrio-teflón. Los homogenatos se centrifugaron a 900 g durante 20 minutos y los sobrenadantes se recentrifugaron a 30000 g durante 30 minutos. Toda la preparación se realizó entre 0 y 4°C. Los precipitados finales fueron resuspendidos en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (a 0°C). Estas suspensiones fueron incubadas con el ligando radioactivo.

Se puso a punto el método de Braestrup y Squires (1977) con modificaciones de Komiskey y McFarlan (1983). Se incubaron 0.8 ml de la preparación de membranas de los animales adultos, conteniendo de 0.8 a 1 mg de proteínas por tubo, con 0.1 ml de metil-³H-Diazepam y 0.1 ml de: buffer (para determinar unión total) o Diazepam 3 µM (para determinar la unión inespecífica). La incubación se realizó a 0°C durante 30 minutos. El ligando radioactivo (metil-³H-Diazepam, New England Nuclear, con actividad específica de 76.6 Ci/mmol) se

utilizó en concentraciones de 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.265 nM. Para cada concentración del ligando, las determinaciones de unión total e inespecífica se realizaron por triplicado. La incubación se detuvo por filtrado al vacío a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B y se lavó dos veces con 2.5 ml de buffer tris-HCl frío. Los filtros se ubicaron en viales de centelleo, se dejaron secar al aire y después se les agregaron 7 ml de omnifluor-tritón-tolueno (3g : 250 ml :750 ml). Luego de aproximadamente 12 horas se leyó la radioactividad en un contador Beckman de centelleo líquido. Se midió la eficiencia para cada tubo por el método de standard externo.

Para la medición de los receptores en hipotálamos de ratas en desarrollo se adaptó la técnica anterior para usar un cosechador automático de células como elemento de filtración. Se redujo el volumen de incubación a 0.3 ml por tubo (0.2 ml de la preparación de membranas conteniendo entre 0.2 y 0.4 mg de proteínas, 0.05 ml de metil-³H-Diazepam y 0.05 ml de buffer con o sin Diazepam frío 3 μ M). El tiempo y la temperatura de incubación fueron los mismos que en el caso anterior. El ligando radioactivo (metil-³H-Diazepam con actividad específica de 85 Ci/mmol) se utilizó en concentraciones decrecientes desde 18 hasta 1 nM. La incubación se detuvo por filtración por medio de un "Cell Harvester Nunc" con filtro Whatman GF/B y se lavó dos veces con 0.3 ml de buffer tris-HCl frío. Los filtros se ubicaron en viales plásticos con 3.5 ml

de omnifluor-tritón-tolueno que a su vez se introdujeron en viales de centelleo apropiados para contar en el contador Beckman de centelleo líquido. La lectura de la radioactividad se realizó al día siguiente de la incubación y la eficiencia se midió por el método de standard externo.

En todos los casos los resultados se analizaron por el método de Scatchard (1949).

RESULTADOS

A- ESTUDIOS ENDOCRINOS

a- Ontogénicos:

a₁: El efecto de una inyección aguda de Diazepam en una dosis de 2.5 mg/Kg sobre la secreción de prolactina en ratas de ambos sexos en desarrollo se observa en la figura IV-2. Los niveles basales son similares a los normales descritos en el capítulo I. Se observó un efecto de la droga de tendencia inhibitoria a partir de los 12 días de edad en los machos y de los 4 días en las hembras, que alcanzó significación estadística solamente en los machos de 38 días de edad.

En cuanto a la TSH, los niveles basales también fueron similares a los normales, no teniendo efecto alguno el tratamiento con Diazepam (figura IV-3).

La droga tuvo un efecto liberador de LH a los 12 días de edad. Solamente en los machos alcanzó significación estadística (figura IV-4). En las hembras de 12 y 20 días se observa el efecto pero no es estadísticamente significativo. Cuando se duplicó la dosis de Diazepam (figura IV-5), el efecto es aún más marcado para las hembras pero tampoco llega a ser estadísticamente significativo.

a₂: El Haloperidol liberó prolactina en todos los casos. Esta liberación sólo fue inhibida por el Diazepam en los machos de 28 días (figura IV-6). En las hembras de 12 días el antidopaminérgico liberó LH tal como ya vimos en el capítulo II. El Diazepam no alteró esta liberación pero en los machos de la misma edad se observó un aumento de la hormona cuando se inyectaron ambas drogas (Haloperidol y Diazepam), aumento que seguramente se debió al efecto del Diazepam tal como mencionamos en el párrafo anterior (figura IV-7).

b- Animales adultos:

b₁: La hiperprolactinemia producida por stress por éter, mayor en machos que en hembras, fue completamente bloqueada por una previa inyección de Diazepam en los dos casos (figura IV-8).

b₂: Se observó que el Diazepam bloquea totalmente la hiperprolactinemia producida por serotonina (figura IV-9), y

parcialmente la producida por el agonista opiáceo FK 33-824 (figura IV-10).

B- ESTUDIO DE LOS SITIOS DE UNION A BENZODIACEPINAS

a- Animales adultos:

Se puso a punto la técnica para medición de receptores de BDZ en hipotálamo, utilizando (metil-³H)-Diazepam como ligando radioactivo. Analizando los datos por el método de Scatchard (1949) se determinó, en hipotálamos de machos adultos enteros la presencia de un sitio de unión con un K_D de 7.7 ± 3.7 nM y una máxima unión o número total de receptores de 772 ± 262 fmoles / mg de proteínas.

Al estudiar el efecto de los esteroides sexuales sobre los receptores benzodiazepínicos hipotalámicos se determinó comparativamente el K_D y el $B_{máx}$ en hembras castradas tratadas con aceite o con benzoato de estradiol (figura IV-11). No se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los dos parámetros.

b- Ontogenia:

Se midió la unión de (metil-³H)-Diazepam a membranas hipotalámicas desde el nacimiento (día 1) hasta el día 38 de vida en ratas de ambos sexos. En la figura IV-12 se muestran gráficos de Scatcard de un experimento representativo. Al

promediar los resultados de tres experimentos realizados separadamente, se observó que mientras la afinidad se mantuvo constante durante el desarrollo, el número de sitios fué en aumento hasta alcanzar una meseta a los 20 días de edad (figura IV-13). El número total de sitios en el nacimiento era un 23 % del B_{máx} del día 38 para las hembras y un 27% para los machos. No se observaron diferencias sexuales en el número total de sitios a ninguna edad. Aunque los valores de K_D fueron siempre menores en los machos que en las hembras, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas cuando se calcularon las medias de los tres experimentos (tabla II).

DISCUSION

Algunos autores habían descripto efectos hipoprolactinémicos de las BDZ en la rata adulta (Chieli y col, 1980; Grandison, 1981; Grandison, 1983). Estos efectos fueron atribuidos a la unión de la droga a receptores de tipo central, ya que se bloqueaban con el antagonista específico Ro 15-1788 (Lotz, 1982). Por otro lado, se demostró que las BDZ potencian *in vitro* el efecto estimulador de la secreción de prolactina del muscimol (agonista GABA_A), y no modifican la subsecuente inhibición. Dicha potenciación fue antagonizada por Ro 15-1788 demostrando la participación de receptores del

tipo central (Anderson y Mitchell, 1986). Nuestros resultados agregan evidencias al efecto hipoprolactinémico de las BDZ en las ratas adultas ya que el Diazepam bloquea la estimulación de la hormona por vapores de éter, serotonina y FK 33-824. Este efecto no parecería ser diferente en hembras y machos, por lo menos en el caso del éter, ya que los otros fueron probados sólo en machos.

La capacidad del Diazepam de inhibir en la secreción de prolactina se observa, en los machos, desde los 12 días de edad. El efecto alcanzó significación estadística recién a los 38 días. El antidopaminérgico Haloperidol, estimuló la secreción de prolactina en todos los casos, siendo siempre mayor la respuesta en hembras que en machos, tal como describiéramos anteriormente (Becú y Libertun, 1982). La inhibición estadísticamente significativa por Diazepam en estos animales se adelantó al día 28 de vida en los machos, indicando que el efecto hipoprolactinémico de la droga puede evidenciarse más tempranamente cuando los niveles de prolactina se encuentran elevados. El Diazepam no logró disminuir la prolactinemia de las hembras en forma significativa en el caso de ser valores basales ni en el caso de estar estimulados por el antidopaminérgico, indicando la existencia de diferencias sexuales en el control de la hormona.

Con respecto a la TSH, el Diazepam no alteró sus niveles en ninguno de los dos sexos a ninguna edad. Tampoco se habían

encontrado efectos de las BDZ sobre los niveles basales de esta hormona en machos adultos, pero sí se describió que el Diazepam impedía el aumento de TSH producido por frío (Camoratto y Grandison, 1983). Experimentos *in vitro* habían demostrado que también la estimulación de TSH por su factor liberador TRH, era inhibible por Diazepam (Roussel y col., 1986).

No se habían descripto, hasta ahora, efectos de las BDZ sobre la secreción de LH. M. Valli y col. (1985) probaron Clobazam en ratas machos adultas, en forma aguda y crónica, sin encontrar ninguna variación de la LH sérica. La liberación de LH por Diazepam que encontramos a los 12 días de edad en los machos fue muy llamativa. Resultados similares se habían encontrado con Clonidina, un agonista α -adrenérgico, en machos de la misma edad (Schultz y col., 1982). En las hembras el estímulo no logró resultados estadísticamente significativos, probablemente debido a los altos errores estándares ocasionados por los picos esporádicos de LH propios de esta edad. Estos resultados indicarían que, tal como en la hembra (cap. II), también en el macho existiría un período de especial sensibilidad de la LH a ciertas drogas neurotrópicas, entre los 10 y 20 días de edad.

Con relación a la unión del Diazepam tritiado a membranas hipotalámicas, encontramos que el 25 % del número de sitios existentes a los 38 días de edad estaba presente en el nacimiento. Al respecto, se ha postulado que los receptores

neonatales de BDZ son funcionales ya que se encuentran acoplados a los sitios de unión a GABA y son modulados por GABA (Smith y Gallager, 1987).

Hasta ahora no se había investigado la existencia de diferencias sexuales en los receptores benzodiazepínicos durante el desarrollo; sólo se habían descrito diferencias en el número de sitios para la unión de flunitrazepam en ciertas áreas del cerebro, entre ratas adultas de ambos sexos (Haefely y col., 1985). Nosotros no encontramos diferencias sexuales en la afinidad ni en el número total de sitios para la unión de Diazepam en membranas hipotalámicas, a ninguna edad. Tampoco encontramos que el estradiol produjera modificaciones de estos parámetros en hipotálamos de hembras adultas. Recientemente, Perez y col. (1988) encontraron que el tratamiento de hembras ovariectomizadas con estradiol produjo un aumento en el número total de sitios para la unión de Diazepam en hipocampo y cerebelo, sin variaciones en el KD, y que no se afectaron los mismos parámetros en cerebro medio ni en córtex frontal.

Los resultados de los efectos endócrinos del Diazepam y de la unión de ³H-Diazepam a membranas hipotalámicas durante el desarrollo, tomados en conjunto, sugieren que la maduración del efecto hipoprolactinéxico de la BDZ podría estar relacionado con el aumento de los sitios de unión observado. De todos modos, no se puede descartar un sitio de acción hipofisario (Grandison y col. 1982, Schettini y col. 1984).

Por otro lado, las diferencias sexuales observadas en el efecto del Diazepam sobre la prolactinemia a los 28 y 38 días de edad y sobre la LH a los 12 días no puede atribuirse a diferencias en los receptores benzodiazepínicos hipotalámicos. Estas diferencias se deben, posiblemente, a diferencias sexuales inherentes al control de la secreción de cada hormona.

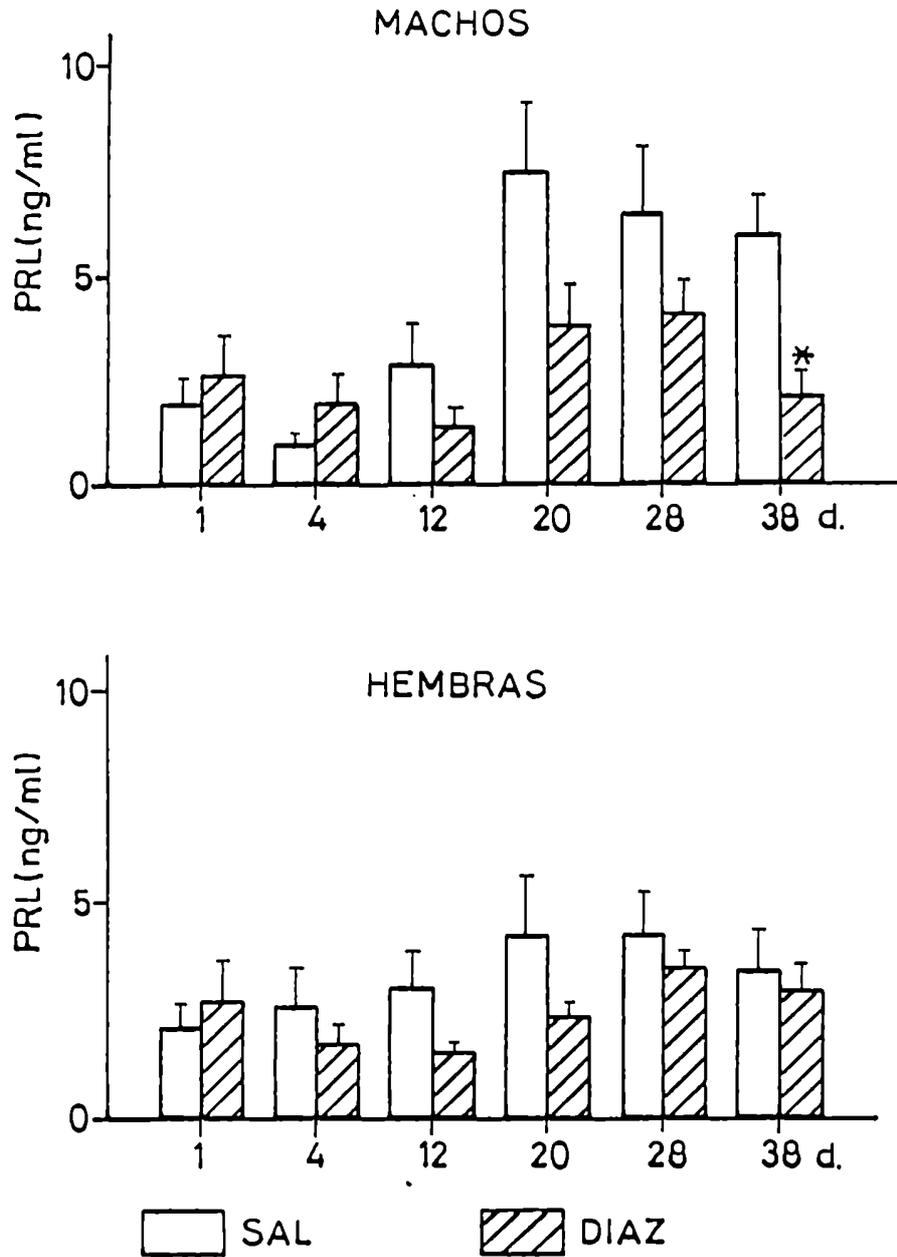


Figura IV-2: Efecto del Diazepam (2.5 mg/Kg, ip) sobre la prolactinemia de ratas machos y hembras de diferentes edades. * $p < 0.05$ con respecto al grupo control de la misma edad.

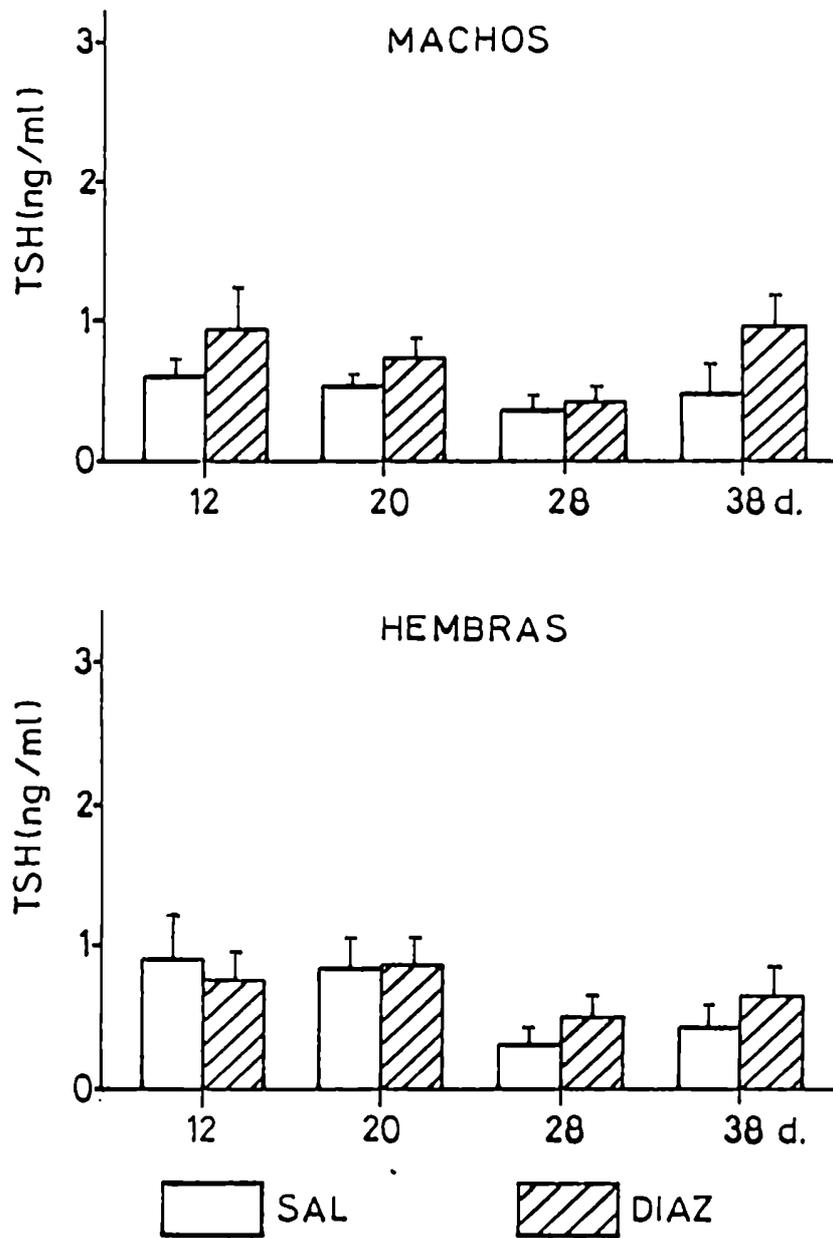


Figura IV-3: El Diazepam (2.5 mg/Kg, ip) no tuvo efecto sobre los niveles séricos de TSH en machos y hembras de diferentes edades.

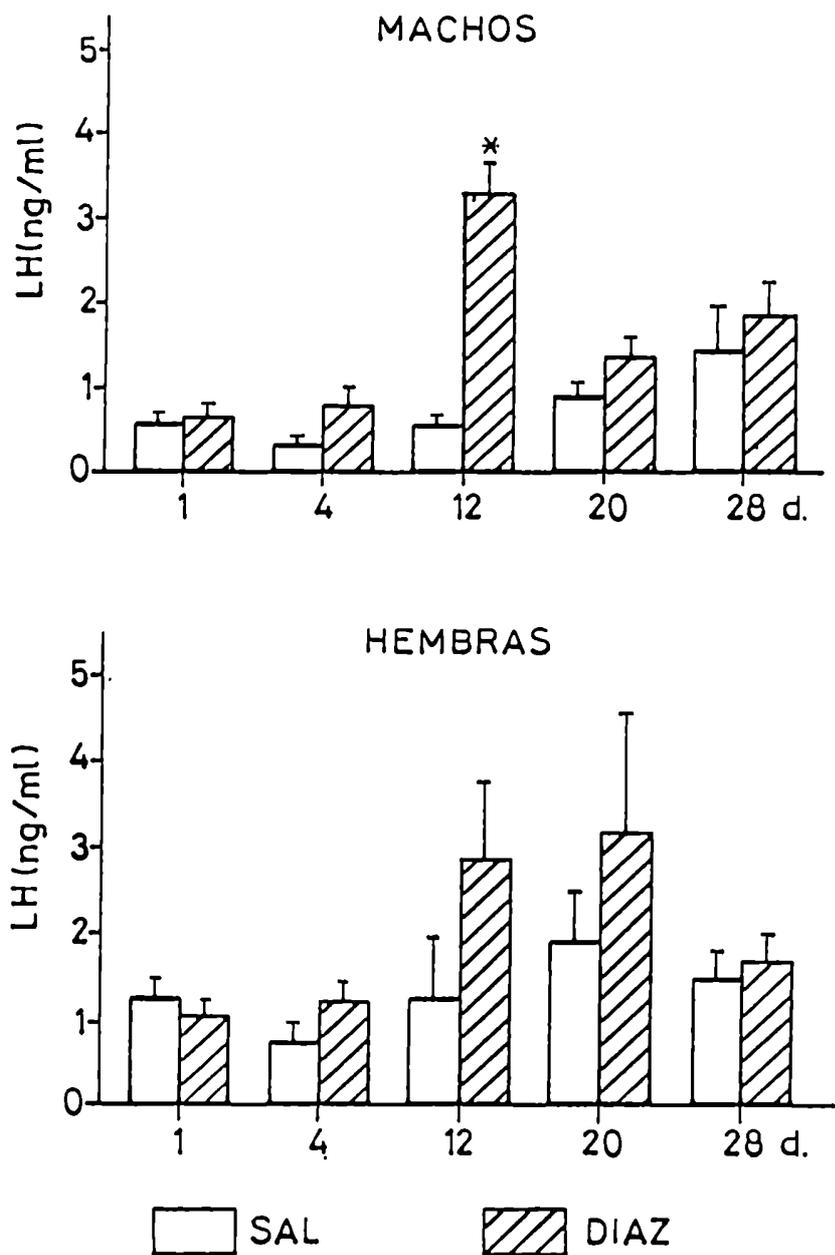


Figura IV-4: Efecto del Diazepam (2.5 mg/Kg) sobre la LH sérica de machos y hembras de 1, 4, 12, 20 y 28 días de edad. * $p < 0.05$ con respecto al grupo control de la misma edad.

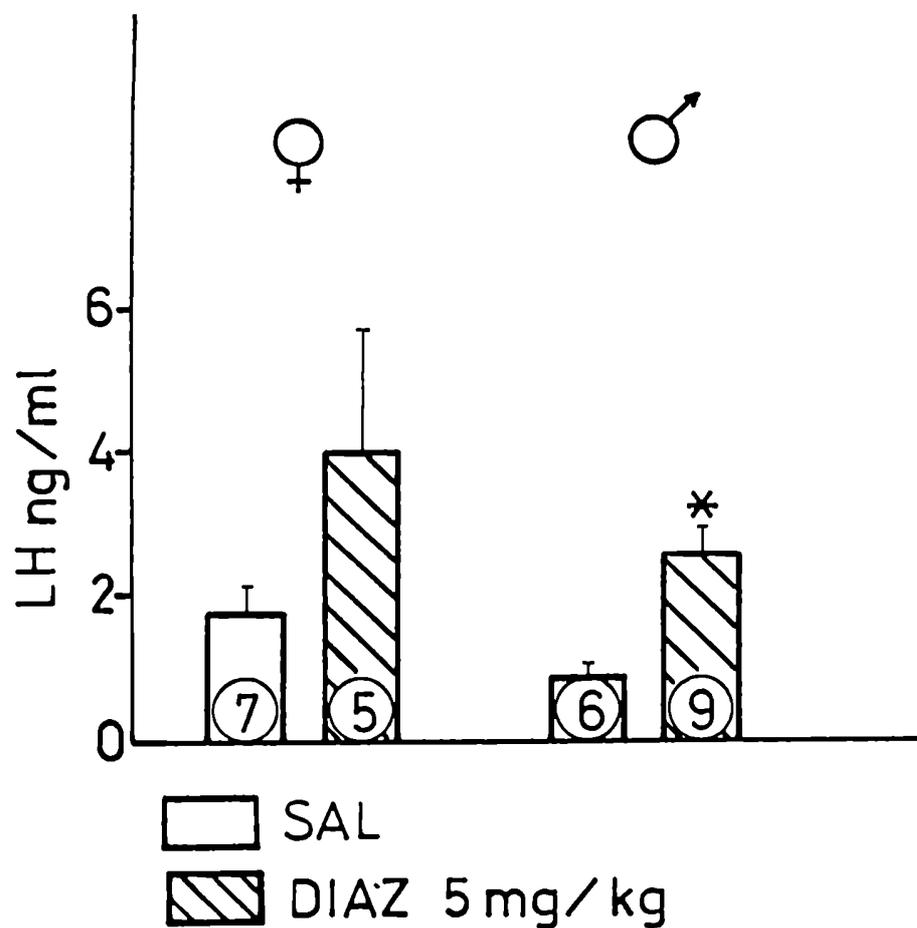


Figura IV-5: Efecto de una dosis de Diazepam de 5 mg/Kg sobre la LH de machos y hembras de 12 días de edad.
 * $p < 0.05$ con respecto al grupo control del mismo sexo.
 En las hembras el efecto no es estadísticamente significativo debido a los grandes errores estándares observados. Estos son causados por los picos de LH esporádicos característicos de la hembra a esta edad .

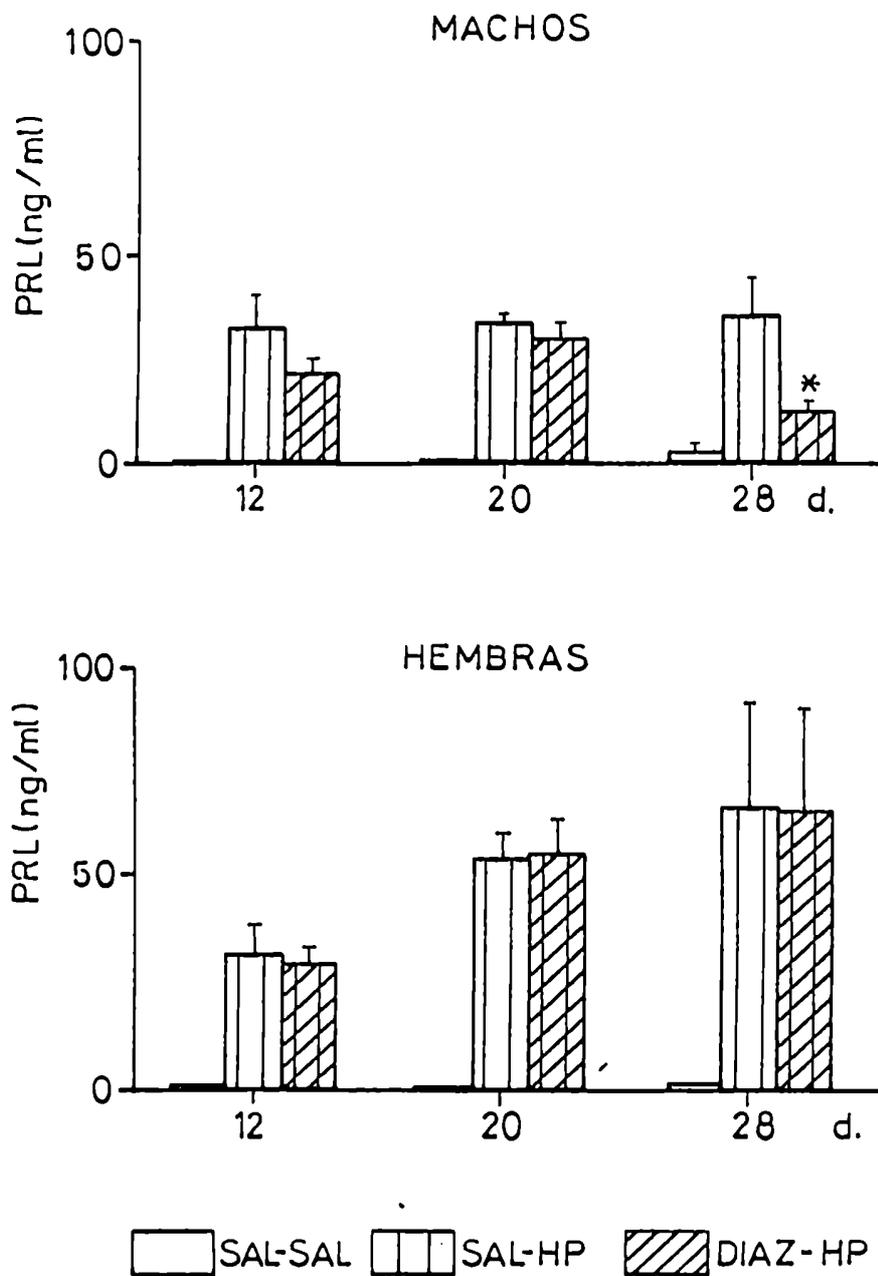


Figura IV-6: Efecto del Diazepam (2.5 mg/Kg) sobre la hiperprolactinemia producida por una inyección de haloperidol (0.25 mg/Kg) en machos y hembras en desarrollo.
 * $p < 0.05$ con respecto al grupo hiperprolactinémico de la misma edad.

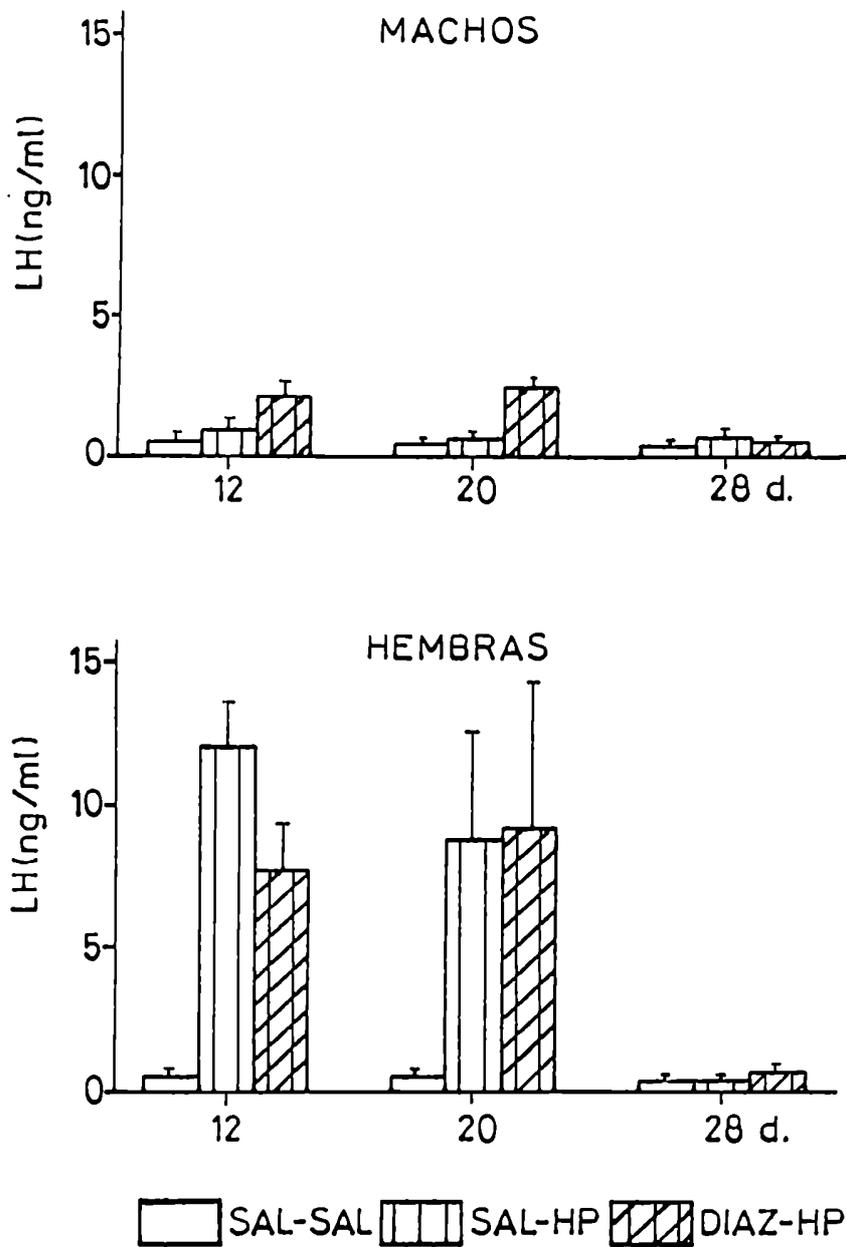


Figura IV-7: Efecto del Diazepam (2.5 mg/Kg) sobre la LH de ratas machos y hembras de diferentes edades tratadas con Haloperidol (0.25 mg/Kg).

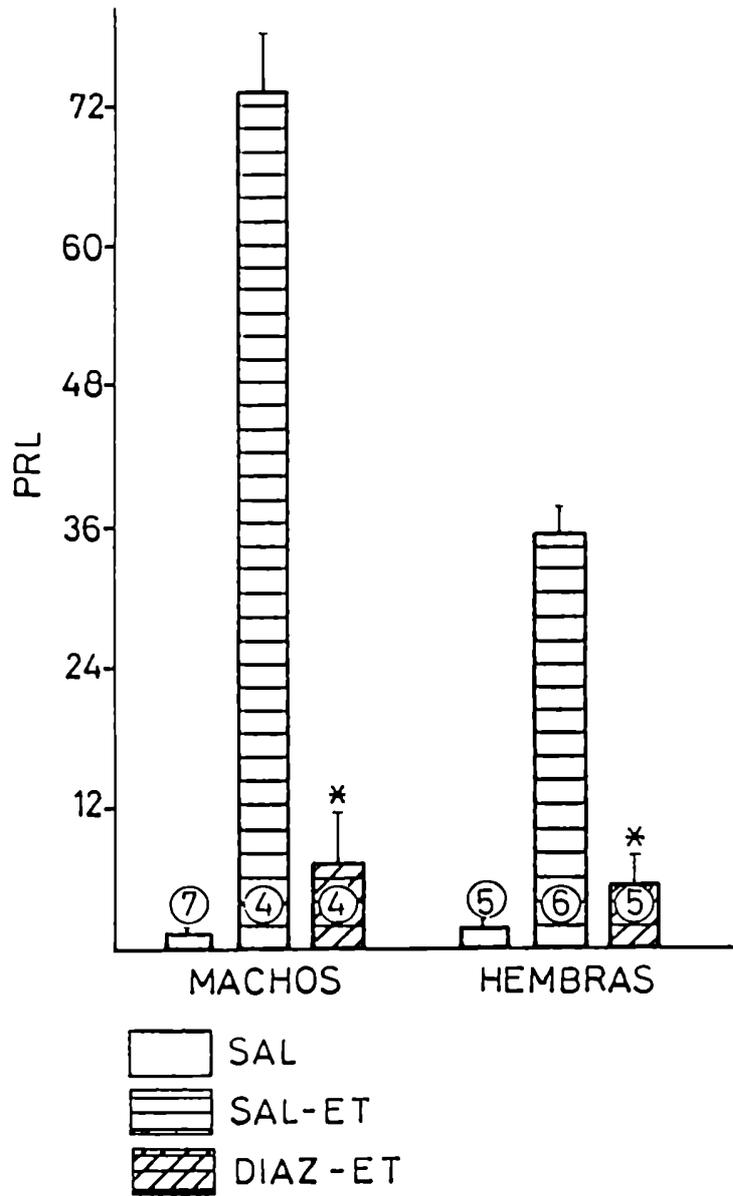


Figura IV-8: Efecto del Diazepam (5 mg/Kg) sobre la hiperprolactinemia producida por vapores de éter (ET) en machos adultos y hembras adultas en diestro.
 * $p < 0.05$ con respecto al grupo hiperprolactinémico.

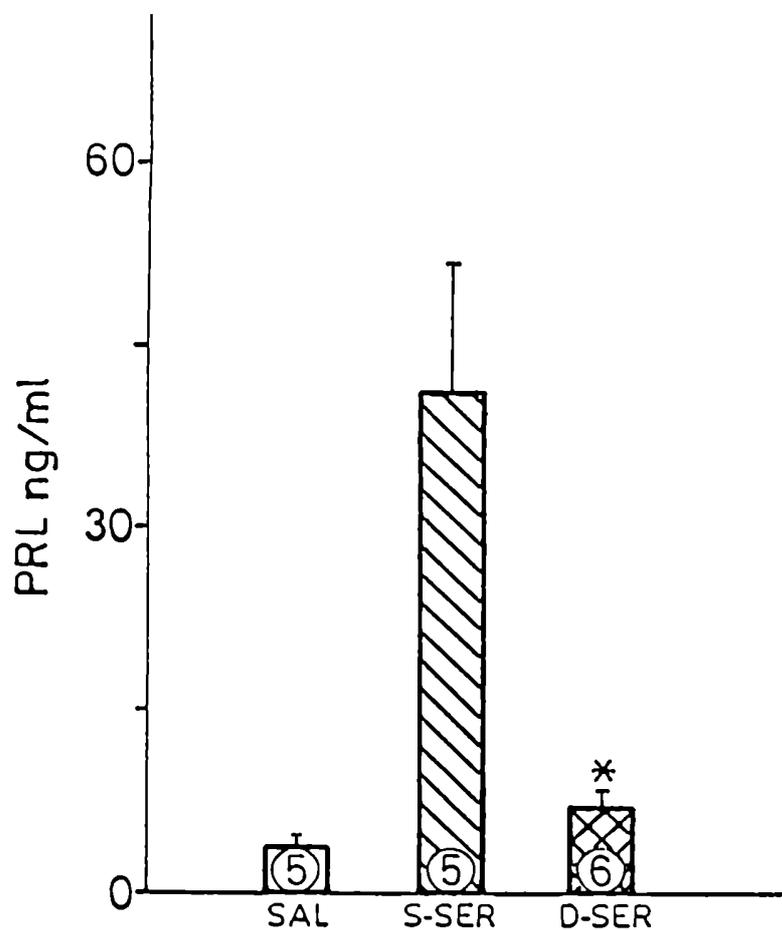


Figura IV-9: Efecto del Diazepam (5 mg/Kg) sobre la hiperprolactinemia producida por Serotonina (5 mg/Kg) en machos adultos. SAL: salina-salina, S-SER: salina-serotonina, D-SER: diazepam-serotonina.

* $p < 0.05$ con respecto al grupo hiperprolactinémico.

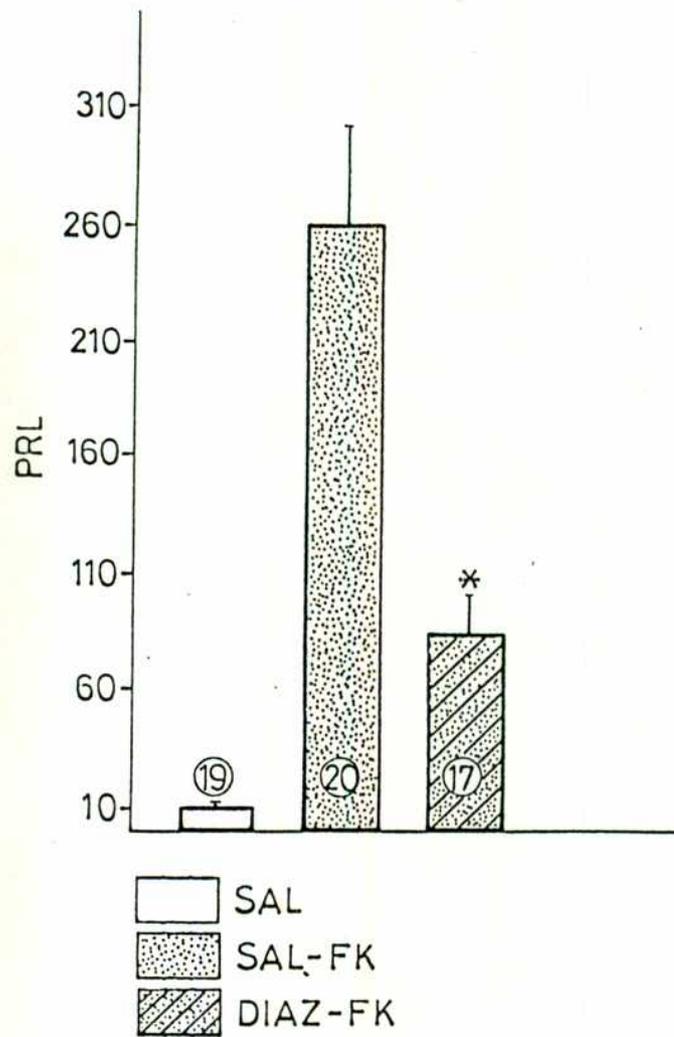


Figura IV-10: Efecto del Diazepam (5 mg/Kg) sobre la hiperprolactinemia producida por el agonista opiáceo FK 33-824 (1 mg/Kg) en machos adultos.
 * $p < 0.05$ con respecto al grupo hiperprolactinémico.

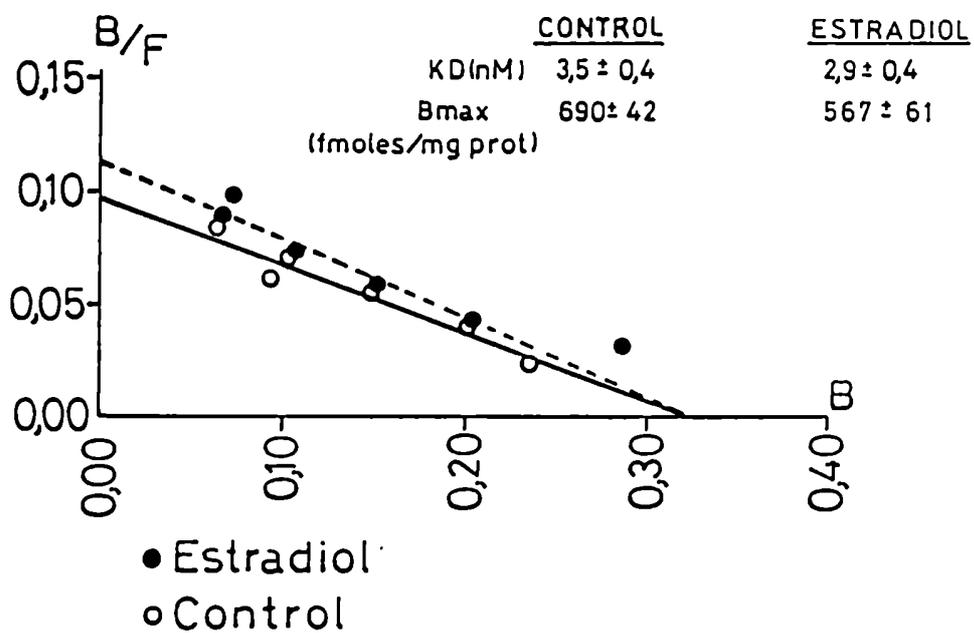
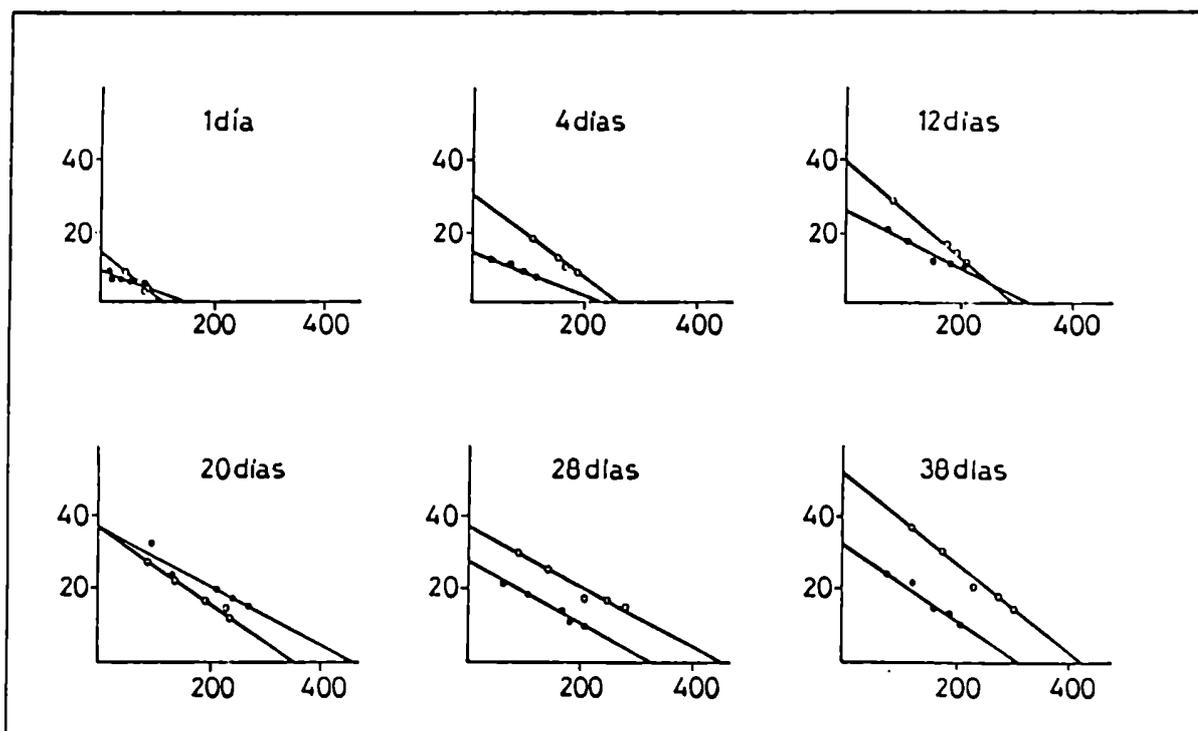


Figura IV-11: Gráficos de Scatchard para los sitios de unión a (metil-³H)-Diazepam en hipotálamo total de hembras castradas (control) y hembras castradas tratadas con estradiol (estradiol).



♂ MACHOS
 • HEMBRAS

Figura IV-12: Gráficos de Scatchard de un experimento para los sitios de unión a (metil-³H)-Diazepam en hipotálamo total de machos y hembras de 1, 4, 12, 20, 28 y 38 días de edad.

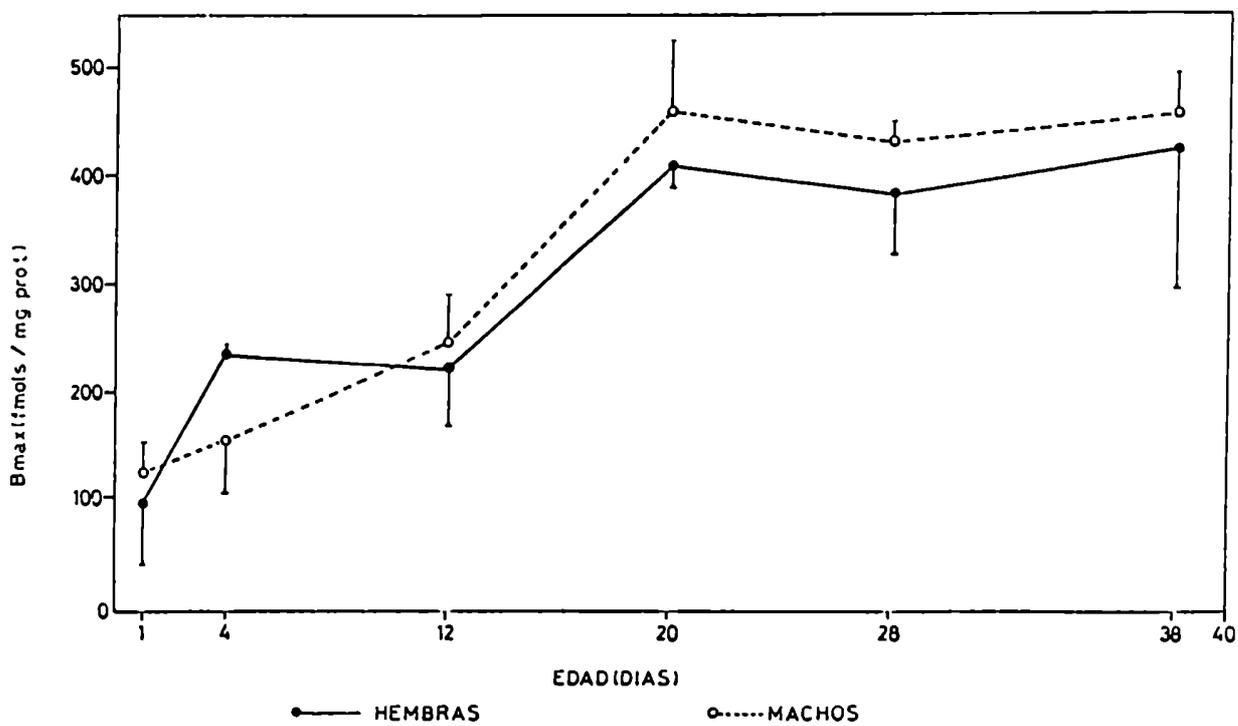


Figura IV-13: Evolución del número total de sitios de unión a (metil-³H)-Diazepam en hipotálamo total de ratas machos y hembras desde el nacimiento hasta los 38 días de edad.

Edad (días)	Machos		Hembras	
	K_D	B_{max}	K_D	B_{max}
1	8.6 ± 0.9	126 ± 29	11.2 ± 2.6	98 ± 51
4	8.2 ± 0.5	156 ± 50	12.8 ± 1.5	233 ± 11
12	13.4 ± 3.4	246 ± 46	11.1 ± 1.5	224 ± 56
20	8.8 ± 0.9	462 ± 65	13.2 ± 1.7	410 ± 22
28	14.4 ± 1.8	433 ± 19	14.3 ± 2.1	387 ± 59
38	11.0 ± 2.9	458 ± 42	11.6 ± 2.3	501 ± 103

Tabla IV-II: Unión máxima de (metil-³H)-Diazepam ($B_{m\acute{a}x}$) y constante de afinidad del receptor (K_D) en hipotálamo total de ratas machos y hembras en desarrollo. Los valores representan la media y el error estándar de tres experimentos realizados separadamente.

CAPITULO V

TRATAMIENTO CRONICO CON UN DOPAMINERGICO DURANTE EL PERIODO INFANTIL. EFECTO SOBRE LAS HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS Y SOBRE LA ECLOSION PUBERAL.

Tal como vimos anteriormente, el período infantil de la rata hembra tiene características especiales en cuanto a los niveles hormonales y a su regulación. Resumiendo lo ya expuesto: el período infantil se caracteriza por sus niveles altos de FSH (Dohler y Wuttke, 1975; Wuttke y col., 1980; MacKinnon y col., 1976) y por la presencia de picos espontáneos de LH similares a los preovulatorios (Dohler y Wuttke, 1975; Wuttke y col., 1980; Andrews y Ojeda, 1977; MacKinnon y col., 1976) inhibibles por altos valores de prolactina (Wuttke y col., 1976; Honma y col., 1979). Estos picos están acompañados por un alto turnover de norepinefrina (Honma y col., 1979) indicando que la norepinefrina podría estar involucrada en su regulación. Además, en este período, tanto LH como FSH tienen una sensibilidad aumentada a la LHRH (Ojeda y col., 1977) y a la serotonina (Becú-Villalobos y Libertun, 1986; Moguilevsky y col., 1987) y parecerían estar bajo control opiáceo (Blank y col., 1979; Ieri y col., 1979) y dopaminérgico (ver capítulos II y III).

A medida que avanza el desarrollo y termina el período infantil aumentan los niveles de inhibina (Rivier y Vale,

1987; Sander y col., 1985) y decrecen los de las alfa-fetoproteínas (Raynaud y col., 1971), disminuyendo concomitantemente los niveles de FSH y desapareciendo los picos de LH. A partir de este momento empiezan a aumentar los niveles de prolactina que se encontraban bajos durante el período infantil (Dohler y Wuttke, 1975).

Se sabe que los niveles altos de FSH del período infantil son fundamentales para el normal desarrollo de los folículos ováricos (Ojeda y col., 1980; Hage y col., 1978) pero todavía se desconoce la importancia de los picos de LH que ocurren a esta edad. Nosotros pensamos que podrían ser críticos para la normal eclosión puberal del animal y su posterior vida reproductiva.

Wuttke y col. (1980) postularon que existiría una relación entre el turnover de dopamina que aumenta a partir del día 20, cuando aumentan los niveles de prolactina, y el momento de eclosión puberal. Nosotros elegimos un agonista dopaminérgico de larga duración, el pergolide (L'Hermite y Debuschere, 1982) y tratamos ratas infantiles con el objeto de adelantar la activación de los receptores dopaminérgicos y observar las posibles alteraciones en el desarrollo de la pubertad. Además, ya que habíamos observado que las gonadotrofinas son sensibles al haloperidol en esta etapa (ver capítulos II y III), esperábamos encontrar una modificación de los niveles gonadotróficos con un tratamiento dopaminérgico a esta edad.

MATERIALES Y METODOS

1) ANIMALES: MODELOS EXPERIMENTALES

Se usaron ratas preñadas de la cepa Sprague-Dawley del IBYME. Después del parto y antes de las 48 horas de vida, se seleccionaron las crías hembras y se repartieron 8 por madre. Las camadas se dividieron en tres grupos que recibieron el tratamiento en distintos momentos de su desarrollo:

Grupo 1: fueron tratadas del día 1 al 10 de vida (período neonatal)

Grupo 2: tratadas del día 6 al 15 de edad (principio del período infantil)

Grupo 3: tratadas del día 11 al 20 de edad (período infantil).

Tratamiento:

En cada camada las crías se dividieron aleatoriamente en dos grupos: control y pergolide. El pergolide fue inyectado diariamente en forma subcutánea en una dosis de 0.05 mg/Kg.día

disuelto en agua destilada en un volumen de 0.1ml/10g. A las ratas controles se les inyectó agua destilada en un volumen equivalente y usando la misma vía de inyección.

Como con los primeros resultados observamos que el pergolide fue efectivo en adelantar la eclosión puberal solamente en el grupo 3, el resto de los experimentos se realizó en ratas tratadas en la etapa que va desde el día 11 al 20 de edad.

Determinación de apertura vaginal y posterior ciclicidad:

Las ratas inyectadas durante las tres etapas se revisaron diariamente a partir del día 30 de edad para ver apertura vaginal.

Cuando se repitieron los experimentos con ratas tratadas del día 11 al 20, se pesaron en el día de su apertura vaginal y se hicieron extendidos vaginales desde ese día hasta cumplir 8 ciclos consecutivos después del primer estro.

Toma de muestras: (de aquí en adelante, todos los experimentos se realizaron con ratas del grupo 3).

Las inyecciones se realizaron siempre entre las 9 y las 10 de la mañana. Los días 13, 16 y 19 (3°, 6° y 9° día de

tratamiento) por la tarde, se decapitó un grupo de animales y se recolectó sangre troncal. Otro grupo fue decapitado los días 21, 22, 23 y 25 de vida (1°, 2°, 3° y 5° posteriores a la finalización del tratamiento); y un tercer grupo a los 29, 33 y 36 días de edad. En este caso fueron descartadas las ratas que hubieran abierto vagina. De esta manera estudiamos los niveles hormonales durante y después del tratamiento y en el período prepuberal.

La sangre se centrifugó y se guardaron los sueros a -20°C hasta su procesamiento para medir FSH, LH y prolactina.

Test de sensibilidad al Haloperidol:

Se dejó llegar un grupo de animales tratados (siempre del día 11 al 20), hasta los tres meses de edad. Se los usó para determinar si los receptores dopaminérgicos involucrados en la regulación de prolactina habían sufrido alguna alteración permanente por el tratamiento crónico con el pergolide. Con este fin se realizó un test de sensibilidad al efecto prolactinoliberador del haloperidol. Las ratas, controles y pergolide, en diestro, fueron inyectadas con haloperidol en dosis de 0.25 o 1 mg/Kg o con solución salina. Los animales fueron decapitados 50 minutos después de la inyección y se recolectó sangre troncal.

Test de sensibilidad a la LHRH:

Se utilizaron ratas adultas del grupo 3 para ensayar la influencia del tratamiento crónico con pergolide durante la etapa infantil, sobre la sensibilidad de las gonadotrofinas a la LHRH durante la adultez. Las ratas, en proestro, se pesaron y anestesiaron con vapores de éter. Se tomó una muestra inicial de sangre de vena yugular y luego se inyectó LHRH disuelta en solución salina en una dosis de 0.5 ug/Kg en forma endovenosa. Después de 15 minutos, se obtuvo una segunda muestra de sangre y se inyectó LHRH en una dosis de 5 ug/Kg. Quince minutos después se decapitaron los animales y se recolectó sangre troncal. La mitad de los animales fueron inyectados con solución salina como control.

RESULTADOS

Efectividad del pergolide en adelantar la pubertad:

En el grupo 1 de animales, tratados en el período neonatal, del día 1 al 10 de vida, no se observaron diferencias significativas en la fecha de apertura vaginal entre los

animales controles y tratados con pergolide [**controles:** 39.2 ± 0.84 días de edad (n=12), **pergolide:** 39.8 ± 1.03 días (n=11); figura V-1]. Tampoco difirieron entre si las edades de apertura vaginal de los animales controles y pergolide del grupo 2, tratados del día 6 al 15 de vida, durante la etapa infantil temprana [**controles:** 40.3 ± 3.89 días (n=10), **pergolide:** 39.4 ± 2.77 días (n=11); figura V-2]. En el grupo 3, tratado entre los 11 y los 20 días de edad se observó un adelanto de la fecha de apertura vaginal (35.96 ± 0.49) y del primer estro (37.54 ± 0.57 , n=28) en las ratas tratadas con pergolide con respecto a las ratas control (ap.vag. 39.19 ± 0.60 y 1°estro 40.61 ± 0.76 , n=26; figura V-3). El peso corporal de las ratas el día de la apertura vaginal fue menor en las pergolide que en las control (**control:** 126.53 ± 2.55 g , **pergolide:** 114.67 ± 1.99 g).

Niveles séricos de gonadotrofinas y prolactina durante el tratamiento con pergolide.

El pergolide, inyectado por la mañana, inhibió en forma marcada ambas gonadotrofinas en la tarde de los días 13 y 16 de vida, siendo el efecto especialmente claro para la LH. A los 19 días de edad, ya no se observó el efecto (figuras V-4a y V-4b).

Por otro lado, los valores de prolactina fueron en

aumento en las ratas control y, aunque el pergolide disminuyó los valores de la hormona en las ratas tratadas, el efecto no alcanzó significación estadística, probablemente debido a los bajos niveles basales propios de esta edad (figura V-4c).

Niveles séricos de gonadotrofinas y prolactina inmediatamente después del tratamiento con pergolide.

Al día siguiente de la finalización del tratamiento con pergolide, los valores de LH aumentaron en forma significativa con respecto a los animales control (figura V-5a).

Los niveles de FSH también aumentaron pero la diferencia, cuando se tomaron en conjunto tres experimentos diferentes, no fue significativa (figura V-5b). Dos días después, los valores de LH y FSH fueron similares en ambos grupos (figuras V-5a y V-5b).

Los valores de prolactina no difirieron entre los grupos (figura V-5c).

Efecto del tratamiento crónico con pergolide sobre los niveles séricos prepuberales de gonadotrofinas y prolactina.

Cuando medimos LH, FSH y prolactina en la tarde de los días 29, 33 y 36 no encontramos diferencias significativas

entre los grupos (figuras V-6a, V-6b y V-6c). A los 36 días de edad dos de las nueve ratas tratadas con pergolide mostraban gonadotrofinas elevadas, aunque no habían abierto vagina. Estos animales fueron descartados ya que sus valores no se consideraron basales.

Ciclicidad post-puberal y niveles hormonales en diestro y proestro en animales con pubertad temprana inducida por pergolide y en animales controles.

En los dos grupos se encontraron ciclos regulares. En las ratas controles, el porcentaje de animales que mostraron ciclos regulares de 4 o de 5 días fue de 94% (15 de 16 animales), y en las pergolide fue de 83% (15 de 18). La diferencia no es estadísticamente significativa.

Tampoco difirieron entre los grupos, los niveles de LH, FSH y prolactina en la mañana del diestro ni del proestro (figura V-7).

Test de sensibilidad al haloperidol.

Para evaluar si el tratamiento con pergolide durante el período infantil produjo una alteración permanente de la sensibilidad en los receptores dopaminérgicos de los lac-

totropos, se inyectaron los animales adultos con haloperidol 0.25 o 0.1 mg/Kg, y se evaluaron los efectos sobre la prolactinemia. No se encontraron diferencias en los efectos hiperprolactinémicos de la droga entre el grupo control y el tratado con pergolide (figura V-8).

Test de sensibilidad a la LHRH.

Se estudió la respuesta de las gonadotrofinas a la LHRH en la adultez, en las ratas controles y pergolide. La LHRH en la dosis baja fue capaz de aumentar los niveles de LH, pero no los de FSH, en ambos grupos experimentales. Los niveles de FSH aumentaron, en los dos grupos, cuando se usó la dosis alta de LHRH. No se encontraron diferencias en la magnitud de las respuestas, entre los grupos (figura V-9).

DISCUSION

Estos resultados demuestran que un tratamiento crónico con pergolide durante el período infantil (días 11 al 20) pero no durante los períodos neonatal (1 al 10) o infantil temprano (6 al 15), es capaz de adelantar el momento de la eclosión puberal en la rata hembra. Aunque el grupo de Ojeda (Advis y col., 1981) demostró claramente que un tratamiento con otro

agonista dopaminérgico como la bromocriptina, a partir del día 22 hasta la apertura vaginal, producía un retraso de la pubertad, no hay contradicción entre estos resultados y los nuestros ya que se refieren a tratamientos en períodos totalmente distintos: ellos tratan en el período juvenil y prepuberal y nosotros en el infantil. Además, mientras que el tratamiento con bromocriptina en ratas juveniles y prepúberes produce importantes variaciones en la prolactinemia, el tratamiento con pergolide en las ratas infantiles modifica principalmente LH y FSH, sin alterar los niveles de prolactina.

Para una mejor comprensión de los efectos del dopaminérgico, es importante referirse a los niveles de gonadotrofinas y prolactina propios del período infantil. Los picos de LH entre los 10 y 20 días de edad en las hembras, ocurren principalmente durante la tarde, y su aparición en cada individuo es relativamente irregular (Dohler y Wuttke, 1975; Wuttke y col., 1980; MacKinnon y col., 1976). También hay un aumento de la sensibilidad de la LH a estímulos por diversos factores y fármacos (ver secciones anteriores y Ojeda y col., 1977; Becú-Villalobos y Libertun, 1986; Moguilevsky y col., 1987; Blank y col., 1979; Ieri y col., 1979). Alrededor del día 20 dejan de aparecer los picos de LH y disminuye la sensibilidad de sus mecanismos de control. Los niveles altos de prolactina inhiben la aparición de los picos de LH en las hembras infantiles (Wuttke y col., 1976). Se sugirió que el

aumento de la prolactinemia que ocurre durante la tercera semana de vida, estaría produciendo un aumento del turnover de dopamina, que inhibiría los picos de LH (Wuttke y col., 1980).

Tal como expusimos, el tratamiento con el dopaminérgico pergolide disminuye claramente los niveles de LH a los 13 y 16 días de vida. Esto coincide con los resultados presentados por Beck y col. (1978) que muestran que los dopaminérgicos piribedil y apomorfina inhiben los valores de LH en las hembras de 15 días pero no en las adultas. Las neuronas que poseen receptores dopaminérgicos y que participan en la regulación de la LH pueden ser "desensibilizadas" por una exposición crónica a un alto turnover de dopamina (Beck y Wuttke, 1977), producido ya sea por altos valores de prolactina (Honma y col., 1979; Beck y Wuttke, 1977; Advis y col., 1981) o por un tratamiento crónico con un dopaminérgico (Beck y col., 1978). Entonces, la acción inhibitoria de los agentes dopaminérgicos sobre la secreción de LH disminuye. Esta desensibilización de los receptores de dopamina que ocurre normalmente, estaría relacionada con el momento de la eclosión puberal (Wuttke y col., 1980). Como vimos en el capítulo II de este trabajo, el haloperidol deja de liberar LH a los 20 días de edad, y en estos resultados, el pergolide deja de inhibir la secreción de la hormona el día 19 de edad, después de 9 días de tratamiento. Estas observaciones estarían de acuerdo con una desensibilización de los receptores dopaminérgicos. La posibilidad de que el pergolide sea in-

capaz de disminuir los niveles de LH a los 19 días debido a que los valores basales de la hormona están bajando a esa edad, no puede ser descartada.

Todavía no ha sido establecido con certeza, el rol de la dopamina en la regulación de la secreción de FSH. En las ratas adultas se han descrito acciones tanto inhibitorias como excitatorias (Weiner y Ganong, 1978; Steger y Morgan, 1985; Kamberi y col., 1971; Clayton y Bailey, 1984; Beatie y col., 1976). En la rata infantil, en cambio, la regulación de la hormona tiene características particulares (ver capítulo III). El haloperidol, antagonista dopaminérgico, incrementa los niveles ya altos de la hormona en una forma muy clara (capítulo III). La apomorfina, pero no el piribedil, inhiben los niveles de FSH en las hembras de 15 días pero no en las adultas (Beck y col., 1978). En estos experimentos, el pergolide fue capaz de disminuir los niveles altos de FSH a los 13 y 16 días sugiriendo que el mecanismo regulador de FSH es más sensible a estímulos dopaminérgicos en la rata inmadura. También los receptores de dopamina que regulan FSH se van desensibilizando, ya que el efecto del pergolide desaparece a los 9 días de tratamiento.

En conjunto, los resultados con respecto a LH y FSH sugieren que el pergolide estaría actuando sobre los receptores dopaminérgicos de las células liberadoras de LHRH, los cuales son especialmente sensibles en las ratas infantiles y se van desensibilizando precozmente por una exposición crónica

al agente dopaminérgico.

Aunque parecería difícil conciliar los niveles bajos de FSH y LH con una pubertad precoz, no es la primera vez que esto se observa. Inyecciones de prolactina (MacKinnon y col., 1976) o transplantes de hipófisis bajo la cápsula renal (Beck y col., 1984) disminuyeron los niveles de LH y produjeron un adelanto de la pubertad. Hemos expuesto que la desensibilización de los receptores dopaminérgicos estaría relacionada con el momento de la eclosión puberal, y que si aquella se adelanta como en el caso de hiperprolactinemia (Wuttke y col., 1976; Advis y col., 1981) o del tratamiento con pergolide durante el período infantil, se adelanta el momento de eclosión puberal. De todos modos, es necesario tener en cuenta el rebote de LH y FSH que ocurre al interrumpir el tratamiento. Shaban y Terranova (1986) observaron un rebote de LH inmediatamente después de un tratamiento crónico con el agonista dopaminérgico bromocriptina. En este caso la bromocriptina retrasó la eclosión puberal cuando se trató a los animales a partir del día 31 hasta la apertura vaginal, y la adelantó cuando el tratamiento se realizó antes y se interrumpió el día 30. Es probable que la pubertad temprana esté relacionada, además de con la desensibilización temprana de los receptores de dopamina, con el rebote de gonadotrofinas observado al interrumpir el tratamiento con el dopaminérgico. Por supuesto que no se puede descartar la posibilidad de que los dos eventos estén relacionados entre sí.

En el caso de nuestros experimentos, es poco probable que la prolactina esté involucrada en el adelanto puberal, ya que no se observaron modificaciones en sus niveles ni durante ni después del tratamiento con pergolide.

Los niveles hormonales en la prepubertad fueron similares en los grupos de animales tratados y no tratados, apoyando la hipótesis de que las alteraciones tempranas en los niveles gonadotróficos estarían relacionadas con el momento de eclosión puberal. En la rata ya adulta, no hubo diferencias en el desarrollo de los ciclos estrales ni en los valores hormonales en los distintos momentos del ciclo entre las ratas pergolide y controles. La respuesta de prolactina al haloperidol fue similar en ambos grupos, sugiriendo que los receptores dopaminérgicos involucrados en la regulación de la secreción de prolactina no sufrieron alteraciones a largo plazo debidas al tratamiento. Además, la respuesta de las gonadotrofinas a un estímulo con LHRH fue similar en las ratas de ambos grupos, indicando que también se mantiene la respuesta de los gonadotrofos a su factor estimulador.

Estos resultados muestran que la activación crónica de los receptores dopaminérgicos durante el período infantil, produce una respuesta específica sobre la secreción de gonadotrofinas y adelanta la edad de eclosión puberal. Este adelanto puede relacionarse con una temprana desensibilización de los receptores dopaminérgicos que regulan LHRH y con cam-

bios en la secreción gonadotrófica durante y después de la activación de los receptores. En general, los estudios sobre el momento de eclosión puberal habían sido realizados modificando los niveles hormonales en las etapas juvenil y prepuberal (Advis y col., 1981 a y b; Shaban y Terranova, 1986; Ramaley, 1982; González y col., 1986). Es evidente que también alteraciones en las etapas neonatales (Sirinathsinji y col., 1984) e infantiles, deben ser tomadas en cuenta.

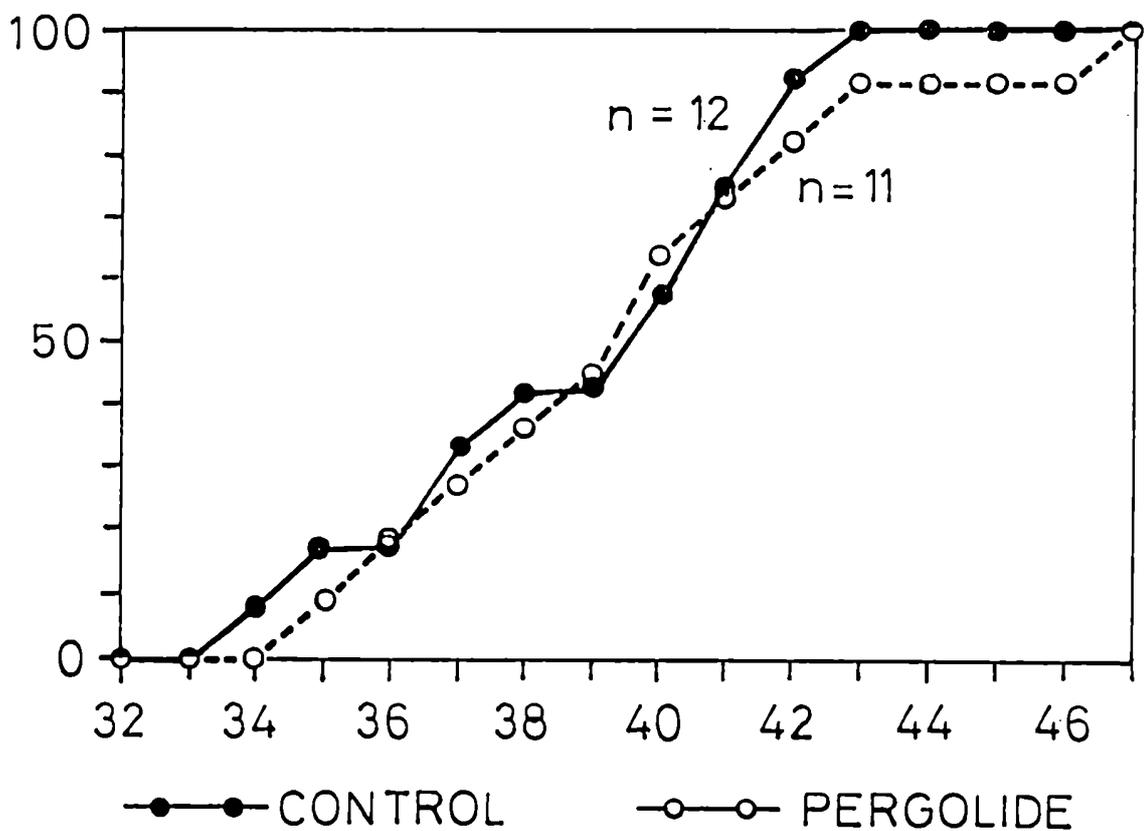


Figura V-1: Porcentaje de ratas con vagina abierta en función de la edad, para los animales que recibieron el tratamiento del día 1 al 10 de vida. En esta figura y las dos siguientes (V-2 y V-3) el eje de las ordenadas representa porcentaje de ratas con vagina abierta y el de las abscisas, edad de las ratas en días.

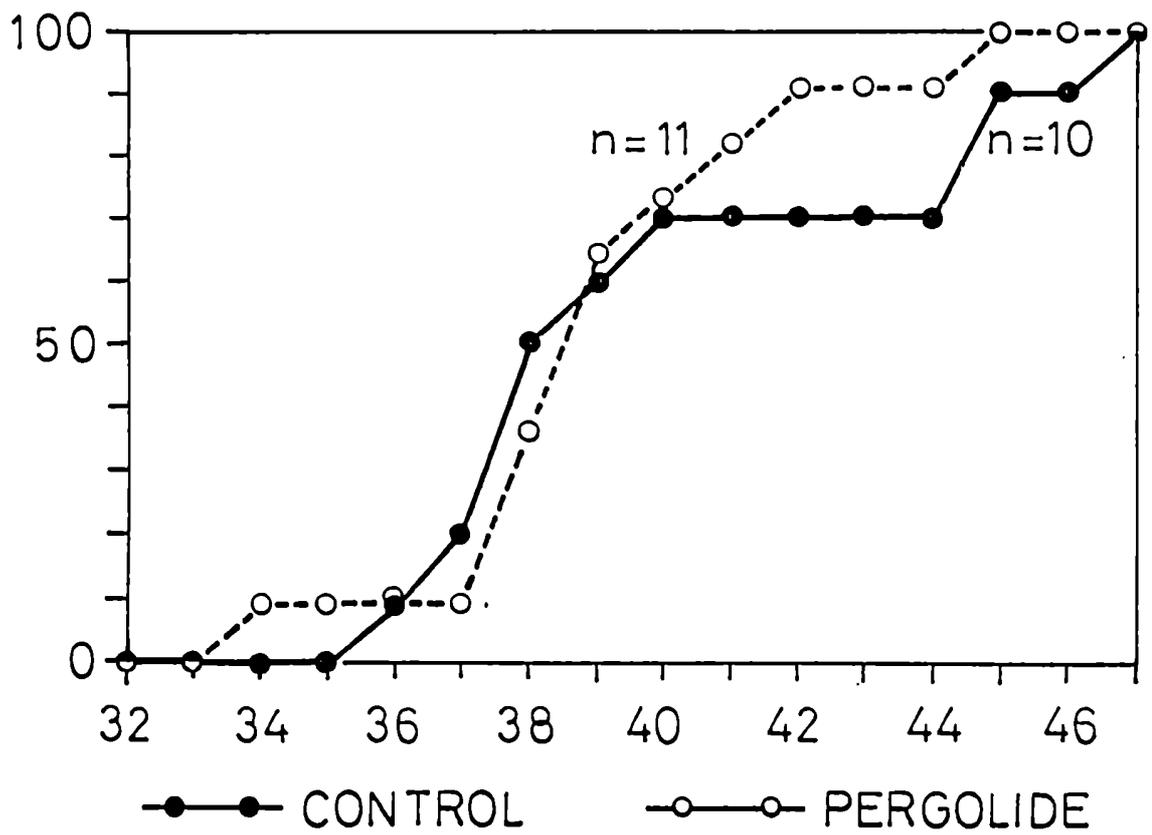


Figura V-2: Porcentaje de ratas con vagina abierta en función de la edad, para los animales que recibieron el tratamiento desde el día 6 al 15 de vida.

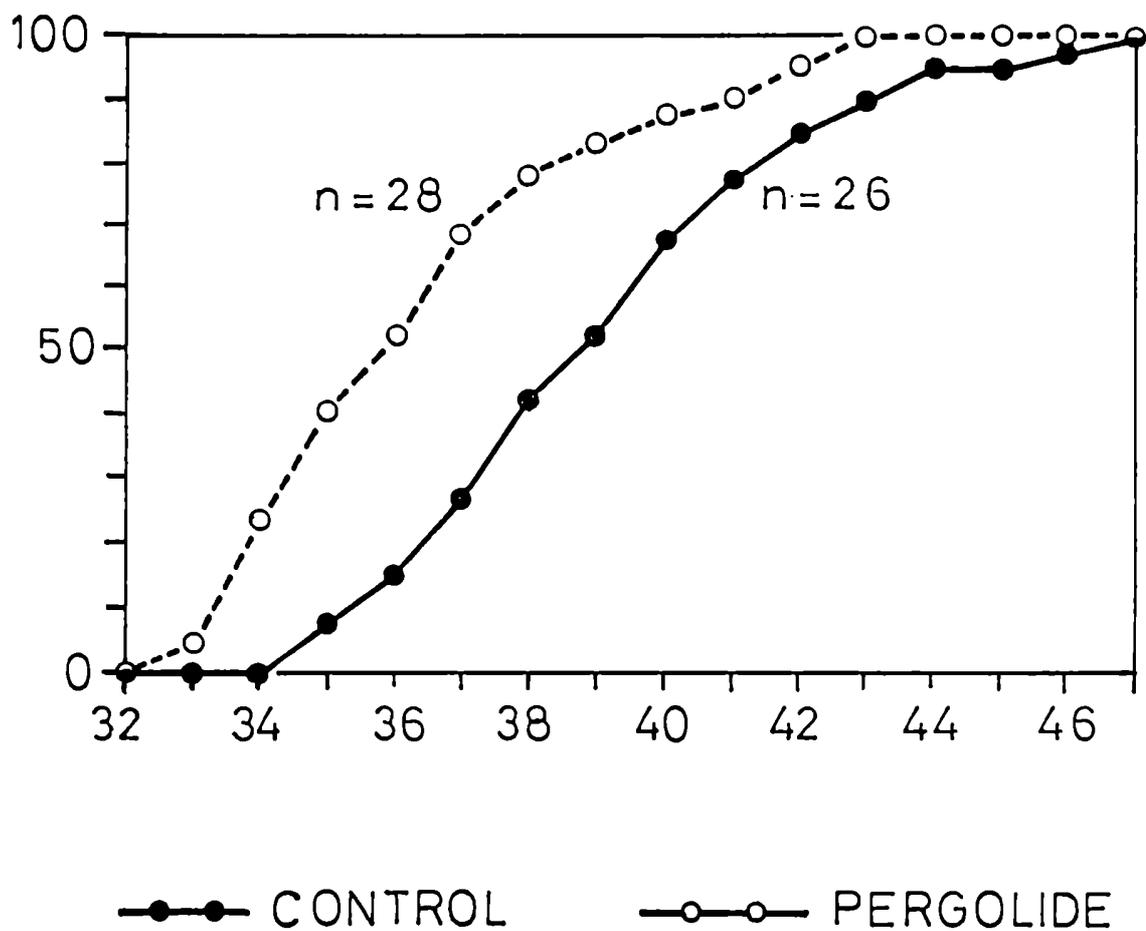


Figura V-3: Porcentaje de ratas con vagina abierta en función de la edad, para los animales que recibieron el tratamiento desde el día 11 al 20 de vida.

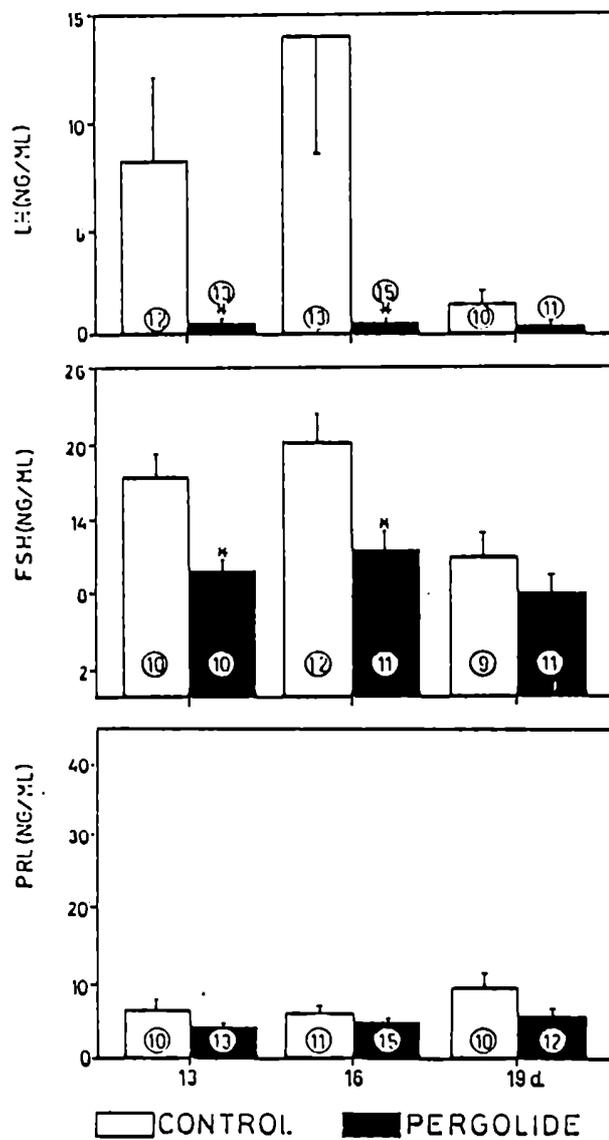


Figura V-4: Niveles hormonales durante el tratamiento realizado desde el día 11 al 20 de vida.
 * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

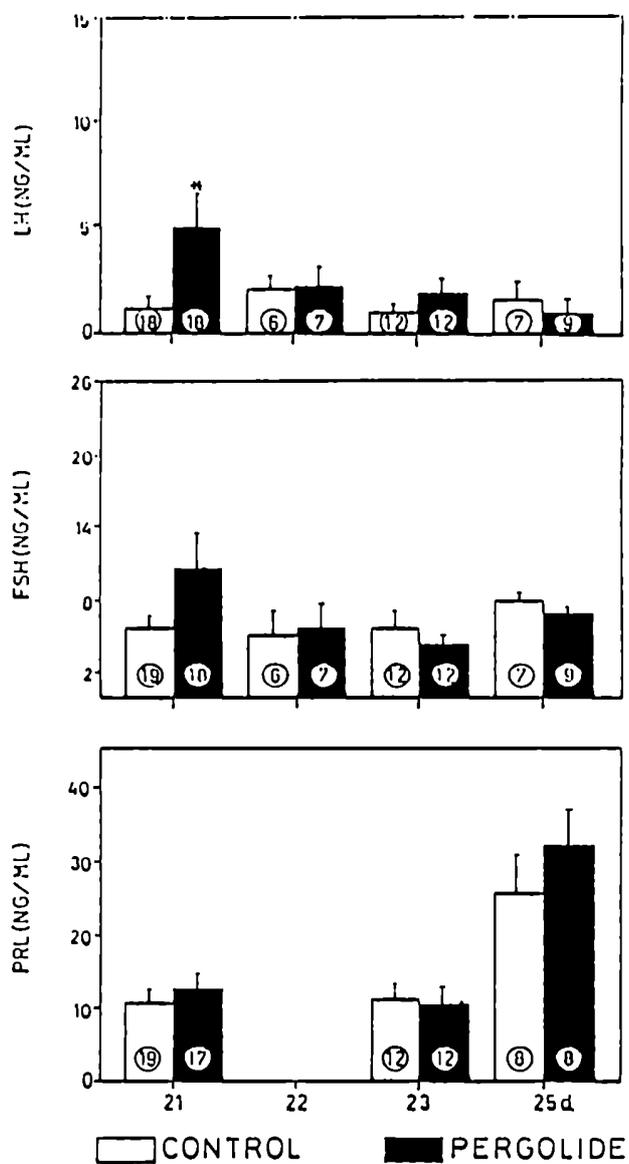


Figura V-5: Niveles hormonales a los 21, 22, 23 y 25 días de edad, una vez finalizado el tratamiento realizado del día 11 al 20 de vida.
 * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

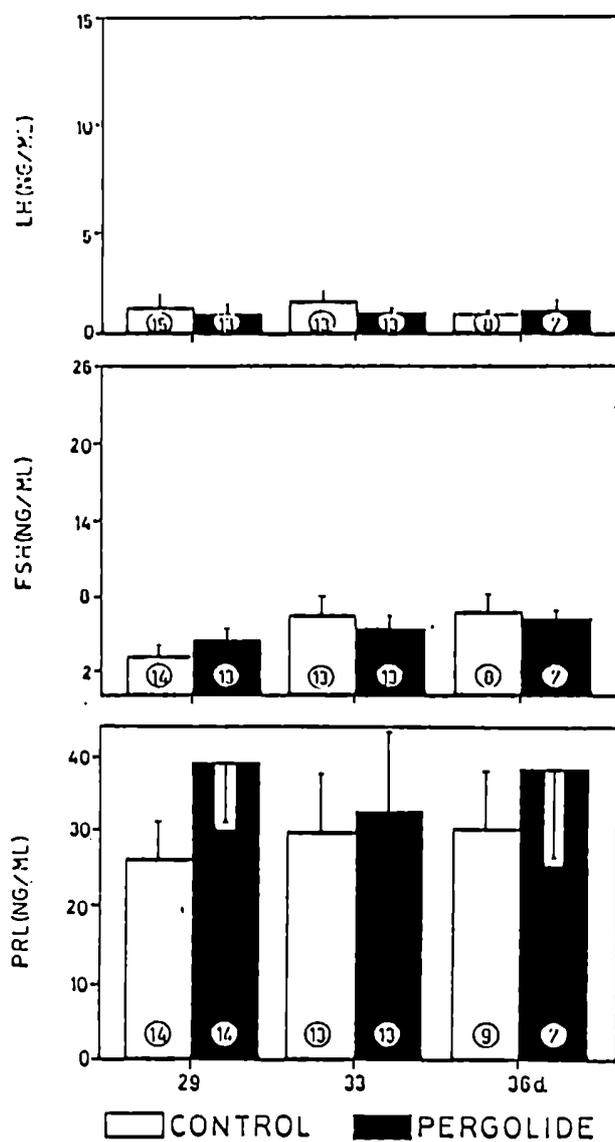


Figura V-6: Niveles hormonales en la prepubertad (a los 29, 33 y 36 días de edad), en las ratas que recibieron el tratamiento entre los 11 y 20 días de edad. Las ratas que habían abierto vagina fueron descartadas.

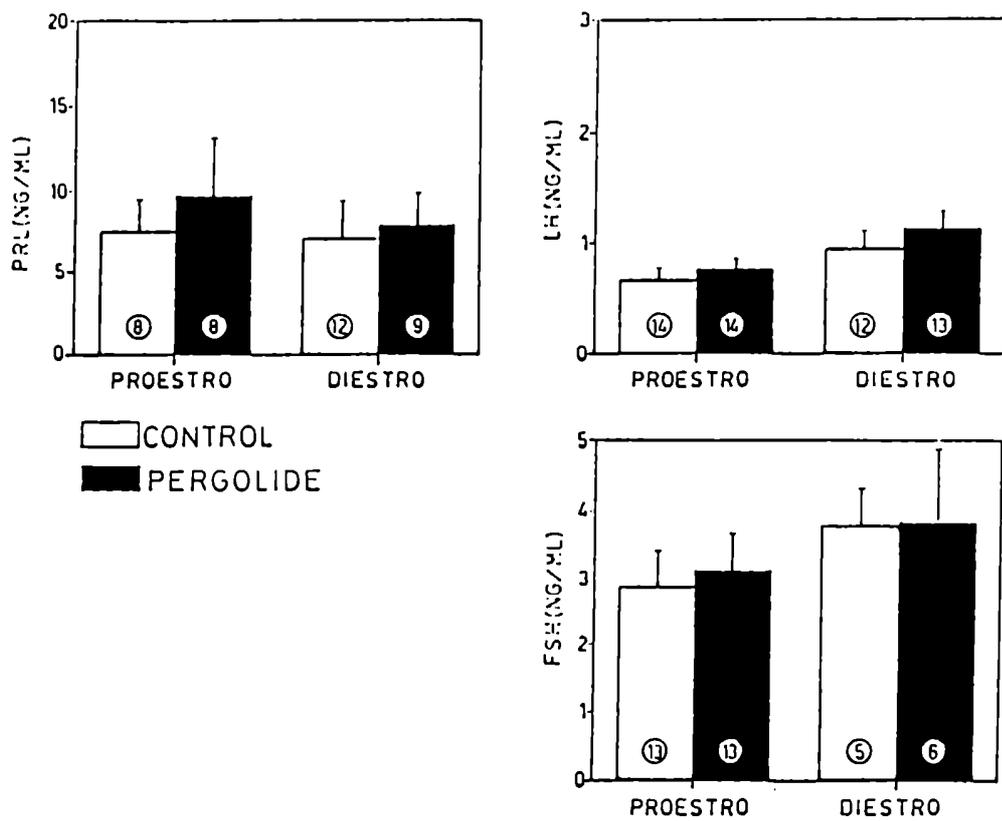


Figura V-7: Niveles hormonales en las ratas adultas, en diestro o en proestro, que recibieron el tratamiento entre los 11 y 20 días de edad.

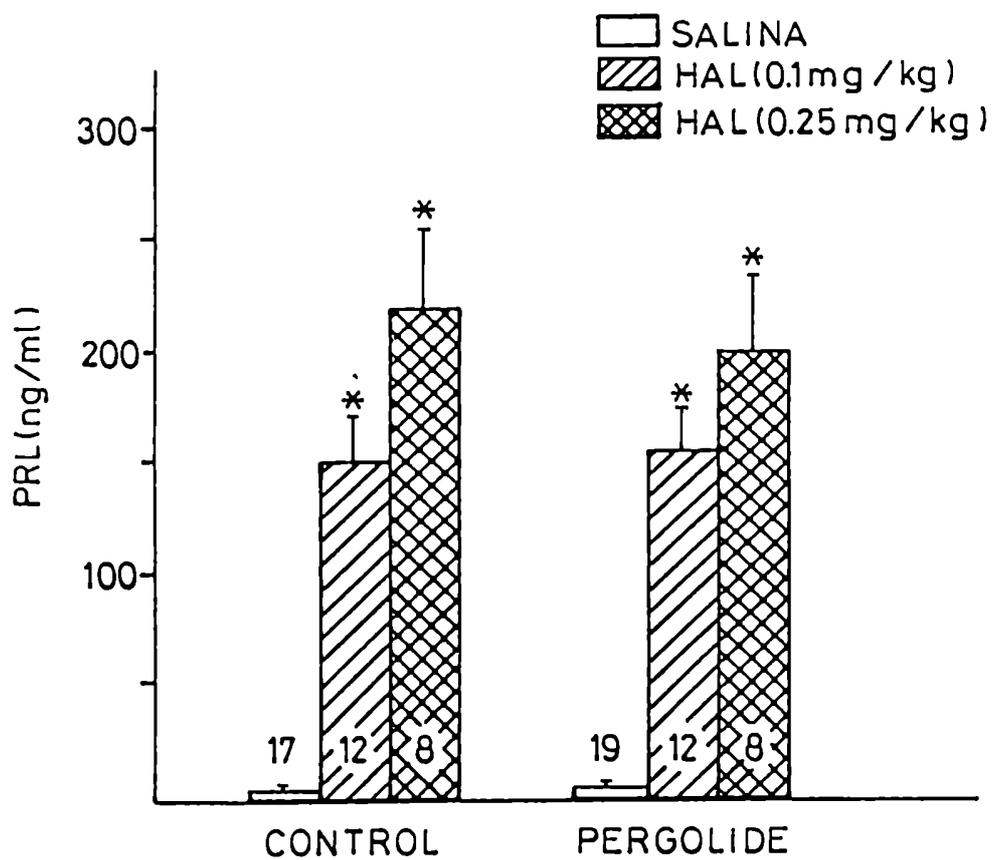


Figura V-8: Respuesta de la secreción prolactínica al haloperidol (0.1 y 0.25 mg/Kg) en ratas adultas en diestro que habían recibido el tratamiento con pergolide entre los 11 y 20 días de edad.

* $p < 0.05$ con respecto a los animales tratados con salina.

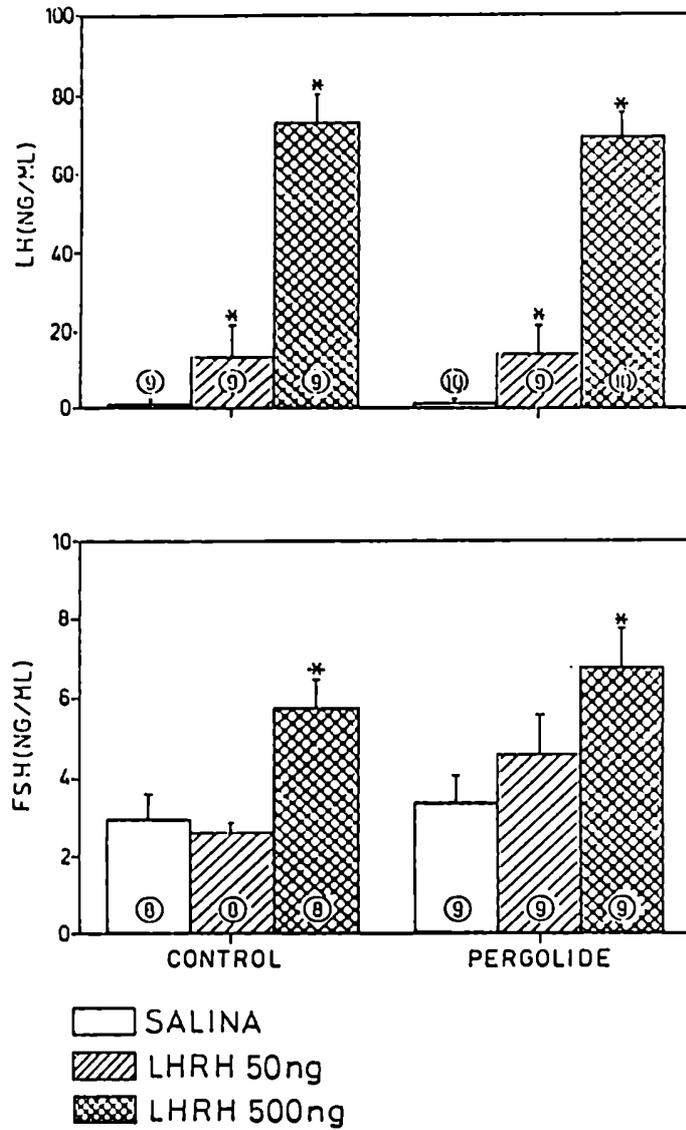


Figura V-9: Respuesta de LH y FSH al LHRH en ratas adultas en proestro que habían recibido el tratamiento con pergolide entre los 11 y 20 días de edad.
 * $p < 0.05$ con respecto a los animales tratados con salina
 Nótese que FSH responde sólo a la dosis alta de LHRH en los dos grupos.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

La regulación fisiológica del proceso de reproducción sexual, está a cargo del sistema neuroendócrino regido por el hipotálamo. En este trabajo nos ocupamos del estudio de algunos aspectos del proceso de maduración del mismo, en la rata *Rattus norvegicus*. Al evaluar los resultados obtenidos podemos extraer numerosas conclusiones:

1) En la rata hembra existe un período, alrededor del día 12 de vida, especialmente sensible en cuanto a la regulación de la secreción gonadotrófica (figuras VI-1 y VI-2).

a- Es el período de máxima sensibilidad al LHRH.

b- en este momento ambas gonadotropinas están sometidas a un fuerte control dopaminérgico inhibitorio, ya que el antidopaminérgico haloperidol produce liberación de LH y FSH. Este efecto no se ve a otras edades y depende de la diferenciación sexual del encéfalo (Caps. II y III).

- c- El control inhibitorio por opiáceos es máximo a esta edad, ya que la respuesta al antagonista opiáceo naloxone es una liberación de LH y FSH mayor a esta edad que a otras (Cap. III).
- d- la sensibilidad del sistema de secreción gonadotrófica a la estimulación por el sistema serotoninérgico también es máxima a esta edad. Un tratamiento con el precursor 5-hidroxitriptofano produce una mayor liberación gonadotrófica en este momento que en otros (Cap. III).

2) Los efectos del Diazepam (Cap. IV) sobre la secreción adenohipofisaria durante el desarrollo son los siguientes :

- a- alrededor de los 12 días de edad, en el macho, el Diazepam produce una liberación significativa de LH, demostrando que esta etapa del desarrollo también presenta características especiales en los machos.
- b- el Diazepam inhibe la prolactinemia solamente en los machos de 38 días de edad. Este efecto se adelanta cuando la misma se estimula con el antidopaminérgico haloperidol.
- c- Los receptores para benzodiazepinas en el hipotálamo aumentan en número, sin variar su afinidad, desde el nacimiento hasta alcanzar una meseta a los 20 días de edad. No se encuentran diferencias entre machos y hembras para ninguno de los dos parámetros.

3) La activación crónica de los receptores dopaminérgicos con pergolide en la hembra, durante el período de regulación gonadotrófica especialmente sensible, produce un adelanto significativo de la pubertad cuando el tratamiento se aplica del día 11 al 20 y no del 1 al 10 o del 6 al 15 de vida (Cap. IV).

Este efecto puede relacionarse con:

- a- la temprana desensibilización de los receptores dopaminérgicos,
- b- la inhibición de las gonadotrofinas durante el tratamiento seguida por el rebote de las mismas al suspenderlo.

Estos resultados son de gran interés porque ayudan a comprender el desarrollo de los mecanismos que regulan la reproducción sexual y su puesta en marcha, y demuestran que los eventos que ocurren durante el período infantil en la rata hembra, son de extrema importancia en este tema.

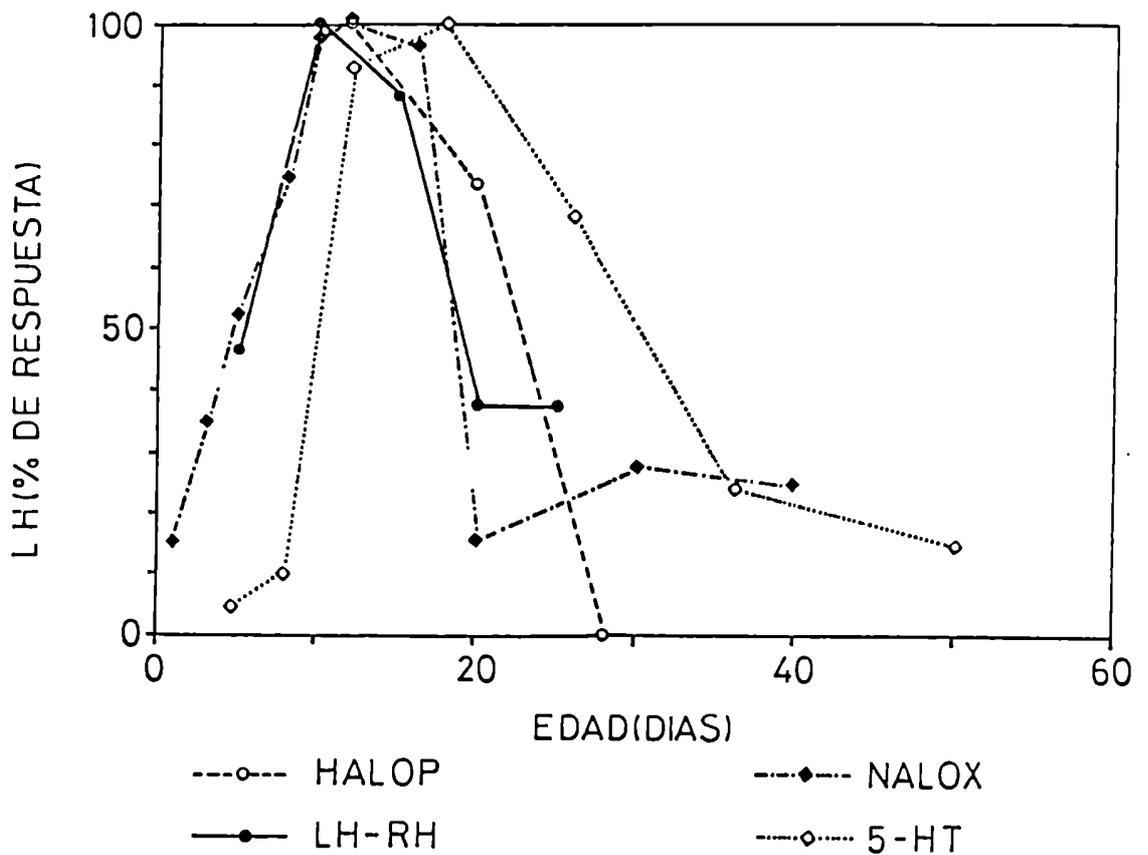


Figura VI-1: Porcentaje de respuesta de LH a distintos factores liberadores, en función de la edad, en la rata hembra. HALOP: haloperidol (capítulo II); LH-RH: LHRH (Ojeda y col., 1977); NALOX: naloxone (Blank y col., 1979); 5-HT: serotonina (Becú-Villalobos y Libertun, 1986). Para calcular el porcentaje de respuesta se tomó como 100% la respuesta máxima obtenida en cada caso.

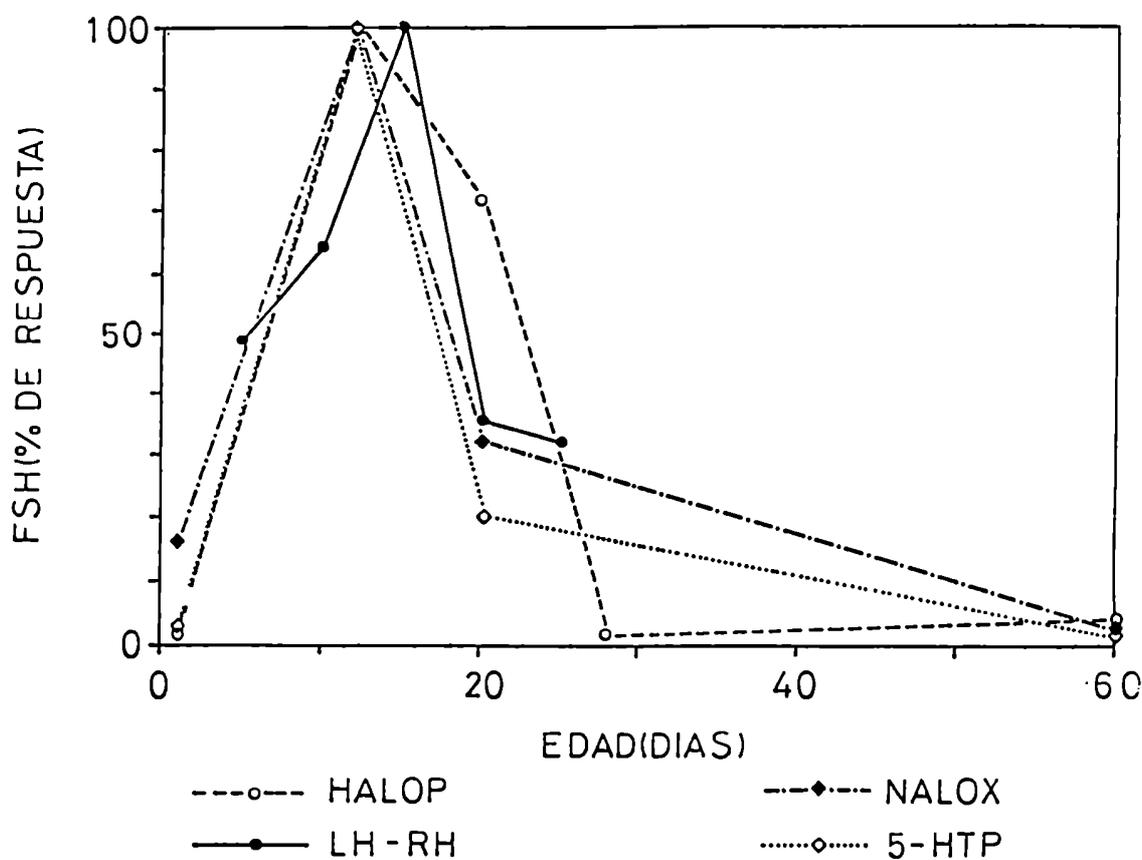


Figura VI-2: Porcentaje de respuesta de FSH a distintos factores liberadores, en función de la edad, en la rata hembra. HALOP: haloperidol (capítulo III); LH-RH: LHRH (Ojeda y col., 1977); NALOX: naloxone (capítulo III); 5-HTP: 5-hidroxitriptofano (capítulo III). Para calcular el porcentaje de respuesta se tomó como 100% la respuesta máxima obtenida en cada caso.

RESUMEN

En los vertebrados superiores, la regulación de la función reproductiva está a cargo del sistema neuroendócrino regido por el hipotálamo. Distintos sistemas neurosecretores interactúan entre sí, y sobre la hipófisis para regular la secreción de las hormonas hipofisarias. Estos mecanismos se ponen en marcha durante la vida embrionaria y se van desarrollando a medida que el animal madura, hasta establecer su completo funcionamiento en la pubertad. En este trabajo, nos propusimos estudiar el control neurológico de la secreción de LH, FSH, prolactina y TSH, en la rata de laboratorio *Rattus norvegicus* (cepa Sprague-Dawley, Holtzman), en el período que transcurre entre el nacimiento y la pubertad.

Encontramos que existe un período de especial sensibilidad gonadotrófica, alrededor de los 12 días de edad (período infantil). En la rata hembra de esta edad, el haloperidol produce una marcada liberación de LH y FSH, y el naloxone y el 5-hidroxitriptofano, que ya se había demostrado que liberaban más LH a esta edad que a otras, también liberan FSH en mayor proporción a esta edad. Es decir que, en este período las gonadotrofinas estarían bajo un fuerte control dopaminérgico y opiáceo que se va debilitando con la edad, y serían especialmente sensibles al efecto liberador de la

serotonina. Estos efectos no se observan en los machos. En éstos encontramos que el Diazepam, libera LH a esta edad y no a otras, cosa que parece observarse en las hembras aunque no alcanza significación estadística. Por otro lado, el diazepam inhibió la prolactinemia solamente en los machos de 38 días de edad, y este efecto se adelantó a los 28 días cuando se estimuló la secreción prolactínica con haloperidol.

A partir de la determinación de la existencia de un control dopaminérgico en la secreción gonadotrófica de la rata hembra durante el período infantil, ensayamos un tratamiento crónico durante este período y controlamos sus efectos endócrinos y sobre la eclosión puberal. Se inyectaron ratas hembras con pergolide en tres momentos distintos de su desarrollo: desde el día 1 al 10 de vida, del 6 al 15 y del día 11 al 20. Solamente en las ratas inyectadas según el tercer modelo se observó un adelanto significativo de la pubertad. Los efectos endócrinos de este tratamiento fueron: las gonadotrofinas se encontraron inhibidas durante el tratamiento sin observarse variaciones en la prolactinemia; al suspender el tratamiento se observó un "rebote" de las gonadotrofinas en las ratas tratadas; no se observaron cambios en los niveles hormonales en la prepubertad ni en la adultez, ni en las respuestas de prolactina al haloperidol ni de gonadotrofinas a la LHRH. Por otro lado, no se observaron diferencias en la ciclicidad de las ratas tratadas con pergolide con respecto a las controles.

Concluimos que la etapa infantil en la rata hembra es un período crítico en cuanto a la regulación de la secreción de gonadotrofinas, y que la activación de los receptores dopaminérgicos en este período, produce un adelanto de la eclosión puberal que podría relacionarse con una temprana desensibilización de los receptores dopaminérgicos que regulan la secreción de LHRH y con cambios en la secreción de LH y FSH durante e inmediatamente después del tratamiento.

SUMMARY

The system which controls reproductive functions in higher vertebrates is the hypothalamo-hypophyso-gonadal axis. This system develops from embryonic life to the onset of puberty, when functional fertility is established. The neurological mechanisms involved are different neurotransmitters systems which interact with each other and influence hypophyseal secretions.

In this work we studied the neurological control of LH, FSH, prolactin and TSH secretion in the rat *Rattus norvegicus*, Sprague-Dawley, Holtzman, from birth to puberty. We describe a critical period in the female rat, with regard to LH and FSH regulation: at 12 days of life, haloperidol markedly released LH and FSH, and there was an increased sensitivity to the FSH-releasing effect of naloxone and 5-hydroxytryptophan. This means that, in this period, a strong dopaminergic and opioid inhibitory control on gonadotropin secretion exists. This control decreases with age. These effects are not observed in the males. In this sex, Diazepam released LH at the same critical age, while the effect was not statistically significant in females.

On the other hand, Diazepam inhibited the prolactin levels in 38 day-old males. This effect was seen earlier, at

28 days, when prolactinemia was stimulated with haloperidol.

As we described a special period in the female rat with regard to gonadotropin secretion, around 12 days of age, it was of interest to treat rats chronically with a dopaminergic agent within this period, and to evaluate its endocrine effect as well as its effect on puberty onset. We tried three different schedules of daily injections with pergolide: a) on days 1 to 10 of life, b) on days 6 to 15 and c) on days 11 to 20. Only the c) group showed an advance in the age of vaginal opening and first oestrus. In this group, we observed that LH and FSH were diminished during the treatment and they increased one day after the end of daily injections. Prolactin did not change throughout the treatment. There were no differences in gonadotropin levels in prepubertal or adult animals between pergolide and saline treated rats. Adult rats of both groups cycled regularly and there were no differences in the haloperidol-induced hyperprolactinemia and in gonadotropin response to LHRH.

We conclude that the infantile period in the female rat is special with regard to gonadotropin regulation, and that chronic activation of dopamine receptors during this period evokes an advance on puberty onset. This advance could be related to an earlier desensitization of dopamine receptors involved in LHRH regulation, and to changes in gonadotropin secretion during and after treatment.



Il de Pergido

BIBLIOGRAFIA

- Advis, J.P. y Ojeda, S.R., 1978, Hyperprolactinemia-induced precocious puberty in the female rat: ovarian site of action, *Endocrinology* 103, 924.
- Advis, J.P., Richards, J.S. y Ojeda, S.R., 1981a, Hyperprolactinemia-induced precocious puberty: studies on the mechanism(s) by which prolactin enhances ovarian progesterone responsiveness to gonadotropins in prepubertal rats, *Endocrinology* 108, 1333.
- Advis, J.P., Smith-White, S.S. y Ojeda, S.R., 1981b, Delayed puberty induced by chronic suppression of prolactin release in the female rat, *Endocrinology* 109, 1321.
- Advis, J.P., Simpkins, J.W., Chen, H.T. y Meites, J., 1978, Relation of biogenic amines to onset of puberty in the female rat, *Endocrinology* 103, 11.
- Anderson, R.A. y Mitchell, R., 1986, Benzodiazepine and barbiturate interactions with GABA_A receptor responses on lactotrophes, *Brain Res.* 371, 287.
- Andrews, W.W. y Ojeda, S.R., 1977, On the feedback actions of estrogen on gonadotropins and prolactin release in infantile female rats, *Endocrinology* 101, 1517.
- Andrews, W.W. y Ojeda, S.R., 1978, Control of luteinizing hormone release in prepubertal female rats: evidence for an enhanced ability of the hypothalamus to release luteinizing hormone-releasing hormone as the pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone declines, *J. Endocrinol.* 78, 281.
- Andrews, W.W. y Ojeda, S.R., 1981a, A quantitative analysis of the maturation of steroid negative feedbacks controlling gonadotropin release in the female rat: the infantile-juvenile periods, transition from an androgenic to a predominantly estrogenic control, *Endocrinology* 108, 1313.
- Andrews, W.W. y Ojeda, S.R., 1981b, A detailed analysis of the serum luteinizing hormone secretory profiles in conscious, free-moving female rats during the time of puberty, *Endocrinology* 109, 2032.
- Andrews, W.W., Advis, J.P. y Ojeda, S.R., 1980, The first proestrus in the female rat: circulating steroid levels preceding and accompanying the preovulatory LH surge, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 163, 305.

Andrews, W.W., Mizejewski, G.J. y Ojeda, S.R., 1981b, Development of estradiol positive feedback on luteinizing hormone release in the female rat: a quantitative study, *Endocrinology* 109, 1404.

Andrews, W.W., Heiman, M., Porter, J.R. y Ojeda, S.R., 1981a, The infantile female rat: *in vivo* ovarian and adrenal steroidogenic response to exogenous administration or to endogenously induced elevations of gonadotropins and ACTH, *Biol. Reprod.* 24, 597.

Arendash, G.W. y Gallo, R.V., 1978, Serotonin involvement in the inhibition of episodic luteinizing hormone release during electrical stimulation of the midbrain dorsal raphe nucleus in ovariectomized rats, *Endocrinology* 102, 1199.

Aubert, M.L., Begeot, M., Winiger, B.P., Morel, G., Sizonenko, P.C. y Dubois, P.M., 1985, Ontogeny of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) and pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal rats, *Endocrinology* 116, 1565.

Barnard, E.A., Stephenson, F.A., Sigel, E., Mamalaki C. y Bilbe, G., 1984, The purified GABA/Benzodiazepine complex: retention of multiple functions, *Neuropharmacology* 23, 813.

Barraclough, C.A. y Wise, P.M., 1982, The role of catecholamines in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion, *Endocrine Rev.* 3, 91.

Beatie, C.W., Gluckman, M.I. y Corbin, A., 1976, A comparison of γ -butyrolactone and pimozide in serum gonadotropins and ovulation in the rat, *Proc. soc. exp. biol. med.* 153, 147.

Beck, W. y Wuttke, W., 1977, Desensitization of the dopaminergic inhibition of pituitary luteinizing hormone release by prolactin in ovariectomized rats, *J. Endocrinol.* 74, 67.

Beck, W., Hancke, J.L. y Wuttke, W., 1978, Increased sensitivity of dopaminergic inhibition of luteinizing hormone release in immature and castrated female rats, *Endocrinology* 102, 837.

Beck, W., Engelbart, S., Gelato, M. y Wuttke, W., 1984, Antigonadotrophic effect of prolactin in adult castrated and in immature female rats. *Acta Endoc* 84:62

Becú-Villalobos, D. y Libertun, C., 1986, Ontogenesis of [3 H] serotonin binding sites in the hypothalamus of the female rat:

relation to serotonin-induced LH release in moxestrol-pretreated rat, *Develop. Brain Res.* 25, 111.

Becú-Villalobos, D. y Libertun, C., 1982, Comparative maturation of the regulation of prolactin and thyrotrophin by serotonin and thyrotrophin releasing hormone in male and female rats, *Endocrinology* 110, 1879.

Becú-Villalobos, D., Lacau de Mengido, I.M. y Libertun, C., 1984, Sexual differences in the serotonergic control of prolactin and luteinizing hormone secretion in the rat, *Endocrinology* 115, 84.

Bennett, G.W., Edwardson, J.A., Holland, D., Jeffcoat, S.L. y White, N., 1975, Release of immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone from hypothalamic synaptosomes, *Nature (Lond.)* 257, 323.

Bergland, R. y Page, R., 1979, Pituitary-brain vascular relation: a new paradigm, *Science* 204, 18.

Bhanot, R. y Wilkinson, M., 1983, Opiatergic control of gonadotropin secretion during puberty in the rat: a neurochemical basis for the hypothalamic 'gonadostat'?, *Endocrinology* 113, 596.

Blank, M.S., Panerai, A.E. y Friesen, H.G., 1979, Opioid peptide modulate luteinizing hormone secretion during sexual maturation, *Science* 203, 1129.

Bolger, G.T., Weissman, B.A., Lueddens, H., Basile, A.S., Mantione, C.R., Barrett, J.A., Witkin, J.M., Paul, S.M. y Skolnick, P., 1985, Late evolutionary appearance of peripheral-type binding sites for benzodiazepines, *Brain Res.* 338, 366.

Bowling, A.C. y De Lorenzo, R.J., 1982, Micromolar affinity benzodiazepine receptors: identification and characterization in the central nervous system, *Science* 216, 1247.

Braestrup, C. y Nielsen, M., 1978, Ontogenetic development of benzodiazepine receptors in the rat brain, *Brain Res.* 147, 170.

Braestrup, C. y Squires, R.F., 1977, Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high affinity ³H-diazepam binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3805.

Bronson, F.H. y Rissman, E.F., 1986, The biology of puberty, *Biol. Rev.* 61, 157.

- Bruni, J.F., Van Vugt, D., Marshall, S. y Meites, J., 1977, Effects of naloxone , morphine and methionine enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone, *Life Sci.*, 21, 461.
- Cacicedo, L. y Sánchez Franco, F., 1986, Direct action of opioid peptides and naloxone on gonadotropin secretion by cultured rat anterior pituitary cells, *Life Sci.* 38, 618.
- Caligaris, L., Astrada, J.J. y Taleisnik, S., 1973, Development of the mechanisms involved in the facilitatory and inhibitory effects of ovarian steroids on the release of follicle-stimulating hormone in the immature rat, *J. Endocrinol.* 58, 547.
- Camoratto, A.M. y Grandison, L., 1983, Inhibition of cold-induced TSH release by Benzodiazepines, *Brain Res.* 265, 339.
- Candy, J.M. y I.L. Martin, 1978, The postnatal development of the benzodiazepine receptor in the cerebral cortex and cerebellum of the rat, *J. Neurochem.* 32, 655.
- Carter, D.A., Pennington, J.M. y Whitehead, S.A., 1982, In vivo and in vitro effects of domperidone on the release of prolactin and LH in male and female rats, *J. Reprod. Fertil.* 64, 191.
- Chappel, S.C., 1985, Neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and follicle stimulation hormone: A review, *Life Sci.* 36, 97.
- Chen, C.L., Amenomori, Y., Lu, K.H., Voogt, J.L y Meites, J., 1970, Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions, *Neuroendocrinology* 6, 220.
- Chiappa, S.A. y Fink, G., 1977, Releasing factor and hormonal changes in the hypothalamic-pituitary gonadotrophin and adrenocorticotrophin systems before and after birth and puberty in male, female and androgenized female rats, *J. Endocrinol.* 72, 211.
- Chieli, T. , D. Cocchi, G. B. Fregnan y E. E. Muller, 1980, Neuroleptic-induced prolactin rise : Influence of pharmacological alterations of different neurotransmitter systems, *Experientia* 36, 463.
- Chiocchio, S., 1988, Mediadores fisiológicos de la liberación de prolactina, XVI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas, Simposio n°5, Resumen n°165.

Chisholm, J., Kellogg, C. y Lippa, A., 1983, Development of benzodiazepine binding subtypes in three regions of rat brain, *Brain Res.* 267, 388.

Clayton, R.N. y Bailey, L.C., 1984, Dopamine agonist- and antagonist- induced modulation of pituitary gonadotropin releasing hormone receptors are independent of changes in serum prolactin, *J. Endocrinol.* 102,215.

D'Armiento, M., Bigi, F., Pontecorvi, A., Centanni, M. y Reda, G., 1984, Diazepam-stimulated GH secretion in normal subjects: relation to oestradiol plasma levels, *Horm. Metab. Res.* 16, 155.

Dada, M.O., Rodríguez-Sierra, J.F. y Blake, C.A., 1985, Sex differences in the anterior pituitary gland. En: Gilles, R., y Balthazart, J. (editores), *Neurobiology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 220.

Daniel, P., 1966, The blood supply of the hypothalamus and pituitary gland, *Brit. Med. Bull.* 22, 202.

Debeljuk, L., Arimura, A. y Schally, A.V., 1972, Studies on the pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in intact male rats of different ages, *Endocrinology* 90, 585.

Debeljuk, L., Arimura, A. y Schally, A.V., 1972, Pituitary responsiveness to LH-releasing hormone in intact female rats of different ages, *Endocrinology* 90, 1499.

De Blas, A.L. , Sangameswaran, L., Haney, S.A., Park, D., Abraham, C.J. y Rayner, C.A., 1985, Monoclonal antibodies to benzodiazepines, *J. Neurochem.* 45, 1748.

De Feudis, F.V., 1984, Review: GABA and endocrine regulation. Relation to neurologic-psychiatric disorders, *Neurochem. Int.* 6, 1.

De Nicola, A.F., Weisenberg, L.S., Arakelian, M.C. y Libertun, C., 1981, Effects of bromocriptine on ³H-Estradiol binding in cytosol of anterior pituitary, *Endocrinology* 109, 83.

Del Pozo, E. y Lancranjan, I., 1978, Clinical use of drugs modifying the release of anterior pituitary hormones. En: *Frontiers in Neuroendocrinology*, Ganong, W.F. y Martini, L. (editores), Raven Press, New York, p.207.

Demeneix, B.A., P.Feltz y J.P. Loeffler, 1986, GABAergic mechanisms and their functional relevance in the pituitary. En:

- GABAergic mechanisms in the mammalian periphery, Erdo, S.L. y Bowery, N.G. (editores), Raven Press, New York, p. 261.
- Deyo, S.N., Swift, R.M., Miller, R.J. y Fang, V.S., 1980, Development of tolerance to the prolactin releasing action of morphine and its modulation by hypothalamic dopamine, *Endocrinology* 106, 1469.
- Dickerman, S., Kladzik, G., Gelato, M., Chen, H.J. y Meites, J., 1974, Effects of haloperidol on serum and pituitary prolactin, LH and FSH and hypothalamic PIF and LRF, *Neuroendocrinology* 15, 10.
- Dohler, K.D. y Wuttke, W., 1974, Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats, *Endocrinology* 94, 1003.
- Dohler, K.D. y Wuttke, W., 1975, Changes with age in levels of serum prolactin, gonadotropin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats, *Endocrinology* 97, 898.
- Donoso, A.O. y Banzán, A.M., 1984, Effects of increase of brain GABA levels on the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis in rats, *Acta endocrinologica* 106, 298.
- Doughty, C., Booth, J.E. McDonald, P.G. y Parrot, R.F., 1975, Effect of oestradiol-17 β , oestradiol-benzoate and the synthetic oestrogen Ru-2858 on sexual differentiation in the neonatal female rat, *J. Endocrinol.* 67, 95.
- Drouva, S.V. y Gallo, R.V., 1977, Further evidence for inhibition of episodic luteinizing hormone release in ovariectomized rats by stimulation of dopamine receptors, *Endocrinology* 100, 792.
- Dullaart, J., 1977, Immature rat pituitary glands *in vitro*: age- and sex-related changes in luteinizing hormone releasing hormone- stimulated gonadotrophin release, *J. Endocrinol.* 73, 309.
- Enjalbert, A., Epelbaum, J., Arancibia, S., Tapia-Arancibia, L., Bluet-Pajot, M. y Kordon, C., 1982, Reciprocal interactions of somatostatin with thyrotrophin-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide on prolactin and growth hormone secretion *in vitro*, *Endocrinology* 111, 42.
- Erickson, G.F. y Hsueh, A.J.W., 1978, Secretion of "inhibin" by rat granulosa cells *in vitro*, *Endocrinology* 103, 1960.
- Franks, S., McElhone, J., Young, S.N., Kraulis, I. y Ruf, K.B., 1980, Factors determining the diurnal variation in

progesterone-induced gonadotropin release in the ovariectomized rat, *Endocrinology* 107, 353.

Fuller, R.W., Clemens, J.A., Kornfeld, E.C., Snoddy, H.D., Smalstig, E.B. y Bach, N.J., 1979, Effects of (8 β)-8-[(methylthio)methyl]-6-propylergoline on dopaminergic function and brain dopamine turnover in rats, *Life Sci.* 24, 375.

Fuller, R.W. y Snoddy, H.D., 1981, Elevation of serum corticosterone concentrations in rats by pergolide and other dopamine agonists, *Endocrinology* 109, 1026.

Funkenstein, B., Nimrod, A. y Lindner, H.R., 1980, The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotropins in cultured neonatal rat ovaries, *Endocrinology* 106, 98.

Gallo, R.V., 1981a, Pulsatile LH release during period of low level LH secretion in the rat estrous cycle, *Biol. Reprod.* 24, 771.

Gallo, R.V., 1981b, Pulsatile LH release during the ovulatory LH surge on proestrous in the rat, *Biol. Reprod.* 24, 100.

Gallo, R.V. y Drouva, S.V., 1979, Effects of intraventricular infusion of catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized and ovariectomized steroid-primed rats, *Neuroendocrinology* 29, 149.

Garret, K.M. y Tabakoff, B., 1985, The development of type I and type II benzodiazepine receptors in the mouse cortex and cerebellum, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22, 985.

George, F.W. y Wilson, J.D., 1986, Hormonal control of sexual development, *Vitamins and hormones* 43, 145.

González, D., López, F., Sánchez Criado, J.E. y Aguilar, E., 1986, Two possible mechanisms for precocious puberty induced in female rats by pituitary grafts, *Neuroendocrinology* 42, 323.

Gorbman, A., Dickhoff, W.W., Vigna, S.R., Clarck, N.B. y Ralph, C.L. (editores), 1983, *Comparative Endocrinology*, John Wiley & Sons Inc., New York.

Grandison, L., 1981, Further characterization of Benzodiazepine inhibition of prolactin secretion, *Fed. Proc.* 40, 415.

Grandison, L., 1982, Suppression of prolactin secretion by benzodiazepines *in vivo*, *Neuroendocrinology* 34, 369.

- Grandison, L., 1983, Actions of Benzodiazepines on the neuroendocrine system, *Neuropharmacology* 22, 1505.
- Grandison, L., F. Cavagnini, R. Schmid, C. Invitti y A. Guidotti, 1982, γ -aminobutyric acid- and benzodiazepine-binding sites in human anterior pituitary tissue, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54, 59.
- de Greef, W.J. y van der Schoot, P., 1985, Some recent developments in the study of prolactin in mammals, *Front. Horm. Res.* 14, 70.
- Haefely, W., Kyburz, E., Gerecke, M. y Mohler, H., 1985, Recent advances in the molecular pharmacology of benzodiazepine receptors and in the structure activity relationships of their agonists and antagonists. En: *Advances in drug research*, Vol 14, B. Testa (editor), Academic Press, Londres, p. 165.
- Haefely, W., Benzodiazepine interactions with GABA receptors, 1984, *Neuroscience Letters* 47, 201.
- Hage, A.J., Groen-Klevant, A.C. y Welschen, R., 1978, Follicle growth in the immature rat ovary, *Acta endocrinol.* 88, 375.
- Hamon, M. y Soubrié, P., 1985, Searching for endogenous ligand(s) of central benzodiazepine receptors. En: *Selected topics from Neurochemistry*, N.N. Osborne (editor), Pergamon Press, Oxford, p.275.
- Harris, G.W., 1964, Sex hormones, brain development and brain function, *Endocrinology* 75, 627.
- Harris, A.R.C., Christianson, D., Smith, M.S., Fang, S.L., Braverman, L.E. y Vagenakis, A.G., 1978, The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat, *J. Clin. Invest.* 61, 441.
- Hery, M., LaPlante, E. y Kordon, C., 1978, Participation of serotonin in the phasic release of luteinizing hormone. II. Effects of lesions of serotonin-containing pathways in the central neuron system, *Endocrinology* 102, 1019.
- Hokfelt, T., Everitt, B., Meister, B., Melander, T., Schalling, M., Johansson, O., Lundberg, J.M., Hulting, A.L., Werner, S., Cuello, C., Hemmings, H., Ouimet, C., Walaas, I., Greengard, P. y Goldstein, M., 1986, Neurons with multiple messengers with special references to neuroendocrine systems, *Rec. Prog. Horm. Res.* 42, 1.

- Hompes, P.G.A., Vermes, I. y Tilders, F.J.H., 1982, *In vitro* release of LHRH from the hypothalamus of female rats during prepubertal development, *Neuroendocrinology* 35, 8.
- Honma, K., Hohn, K.G. y Wuttke, W., 1979, Involvement of catecholamines in eliciting LH peaks in 15 day old female rats: effect of treatment with prolactin, *Brain. Res.* 779, 277.
- Houssay, B., Biassotti, A. y Sammartino, R., 1935, Modifications fonctionnelles de l'hypophyse après les lésions infundibulo-tubériennes chez le crapaud, *Compte Rend. Soc. Biol.* 120, 725.
- Ieri, T., Chen, H.T. y Meites, J., 1979, Effects of morphine and naloxone on serum levels of luteinizing hormone and prolactin in prepubertal male and female rats, *Neuroendocrinology* 29, 288.
- Ieri, T., Chen, H.T., Campbell, G.A. y Meites, J., 1980, Effects of naloxone and morphine on the proestrous surge of prolactin and gonadotropins in the rat, *Endocrinology* 106, 1568.
- Jimenez, A. y Walker, R.F., 1985, The serotonergic system. En: Steger, R.W. y Johns, A. (editores), *Handbook of pharmacologic methodologies for the study of the neuroendocrine system*, CRC Press, Boca Ratón Florida, p 109.
- de Jong, F.H., Sander, H.J., Ultee-Van Gessel, A.M. y Van der Molen, H.J., 1985, Specific regulation of the secretion of follicle-stimulating hormone from the pituitary gland: the inhibin concept, *Front. Horm. Res.* 14, 53.
- Kamberi, I.A., Mical, R.S. y Porter, J.C., 1971, Effect of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines on FSH release, *Endocrinology* 88, 1003.
- Kamberi, I.A., Mical, R.S. y Porter, J.C., 1971, Effects of melatonin and serotonin on the release of FSH and prolactin, *Endocrinology* 88, 1288.
- Kato, Y., Hiroto, S., Katakami, H., Matsushita, N., Shimatsu, A. e Imura, H., 1982, Effects of a synthetic met⁵-enkephalin analogue on plasma luteinizing hormone and prolactin levels in conscious orchidectomized rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 169, 95.
- Ketelslegers, J.M., Hetzel, W.D., Sherins, R.J y Catt, K.J., 1978, Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat,

Endocrinology 103, 212.

Kimura, F. y Kawakami, M., 1980, Two daily surges of prolactin secretion in the immature female rat, *Endocrinology* 107, 172.

Klepner, C.A., Lippa, A.S., Benson, D.I., M.C. Sano y B. Beer, 1979, Resolution of two biochemically and pharmacologically distinct benzodiazepine receptors, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11, 457.

Komiskey, H.L. y MacFarlan, M.F., 1983, Aging: effect on neuronal and non-neuronal benzodiazepine binding sites, *Neurochem. Res.* 8, 1135.

Koves, K., Marton, J., Molnar, J. y Halasz, B., 1981, (D-Met², Pro⁶)-enkephalinamide-induced blockage of ovulation and its reversal by naloxone in the rat, *Neuroendocrinology* 32, 82.

Krieg, R.J. y Cassidy, J.R., 1984, Counteraction of the haloperidol blockade of ovulation by bromocriptine, and the effect of bromocriptine on LH and prolactin secretion, *Neuroendocrinology* 38, 371.

Krieg, R.J. y Johnsson, J.H., 1981, Differential time- and dose-dependent effects in the haloperidol blockade of luteinizing hormone release and ovulation, *Neuroendocrinology* 33, 372.

Krulich, L., Giachetti, A., Marchlewska-Koj, A., Hefco, E. y Jameson, H.E., 1977, On the role of the central noradrenergic and dopaminergic systems in the regulation of TSH secretion in the rat, *Endocrinology* 100, 496.

Krulich, L., Vijayan, E., Coppings, R.J., Giachetti, A., McCann, S.M. y Mayfield, M.A., 1979, On the role of the central serotonergic system in the regulation of the secretion of thyrotropin and prolactin: thyrotropin-inhibiting and prolactin-releasing effects of 5-hydroxytryptamine and quipazine in the male rat, *Endocrinology* 105, 276.

Kun, I., Simionescu, L., Oprescu, M. y Feszt, G., 1985, Differential effects of some predominantly antiadrenergic and antidopaminergic neuroleptics on the preovulatory surge of FSH, LH and prolactin in the rat, *Exp. clin. endocrinol.*, 85, 269.

Lescoat, G., 1983, A sex related difference in gonadotropin response to castration in the rat, *Experientia* 39, 205.

Leung, P.C.K., Arendash, G., Whitmoyer, D.I., Gorski, R.A. y Sawyer, C.H., 1982, Differential effects of central adrenocep-

- tor agonists on luteinizing hormone release, *Neuroendocrinology* 34, 207.
- L'Hermite, M. y Debuschere, P., 1982, Potent 48 hours inhibition of prolactin secretion by pergolide in hyperprolactinemic women, *Acta endocrinol* 101: 481.
- Libertun, C., Arakelian, M.C., Larrea, G.A. y Foglia, V.G., 1979, Inhibition of prolactin secretion by GABA in female and male rats, *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 161, 28.
- Libertun, C., Arakelian, M.C., Larrea, G.A., Gorriño, L. y Becú, D., 1980, Neurotransmisores, neurohormonas y prolactina, *Acta physiol. latinoam.* 30, 275.
- Libertun, C. (Editor), 1980, Radioinmunoanálisis, López Editores, Buenos Aires.
- Liebeburg, I., Wallach, G. y McEwen, B.S., 1977, The effect of an inhibitor of aromatization (1,4,6-androstatriene-3,17 dione) and an antiestrogen (C-1628) on *in vivo* formed testosterone metabolites recovered from neonatal brain tissues and purified cell nuclei. Implications for sexual differentiation of the rat brain, *Brain Res.* 128, 176.
- Lippa, A.S., Meyerson, L.R. y Beer, B., 1982, Molecular substrates of anxiety: clues from the heterogeneity of benzodiazepine receptor, *Life Sci.* 31, 1409.
- Lippa, A.S., Beer, B., Sano, M.C., Vogel, R.A. y Meyerson, L. R., 1981, Differential ontogeny of type 1 and type 2 benzodiazepine receptors, *Life Sci.* 28, 2343.
- Lotz, W., 1982, Benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 counteracts the prolactin-lowering effects of other benzodiazepines in rats, *Neuroendocrinology* 35, 32.
- MacKinnon, P.C.B., Mattock, J.M. y TerHaar, M.B., 1976, Serum gonadotrophin levels during development in male, female and androgenized female rats and the effect of general disturbance of high luteinizing hormone levels, *J. Endocrinol.* 70, 361.
- MacLeod, R.M., 1976, Regulation of prolactin secretion. En "Frontiers in Neuroendocrinology" Martini, L. y W.F. Ganong (editores), Raven Press, New York, vol. 4, p.169.
- MacLuskey, N.J. y Naftolin, F., 1981, Sexual differentiation of the central nervous system, *Science* 211, 1294.
- Marini, R., Attanasio, A., Burg, P. y Gupta, D., 1984, Modulation of LHRH and gonadotropin secretion by naloxone in male

- rats during development. En: Muller E.E. y Genazzani A.R. (editores), Central and Peripheral endorphins: Basic and Clinical Aspects, Raven Press, New York, p. 175.
- Martini, L., 1969, Action of hormones on the central nervous system, General and Comparative endocrinology suppl 2, 214.
- Mazey, E. y Palkovits, M., 1982, Two way transport in the hypothalamic-hypophyseal system. En Frontiers in Neuroendocrinology, Martini y Ganong (editores), vol.7, pag. 1.
- McCann, S.M., Ojeda, S.R., Libertun, C., Harms, P.G. y Krulich, L., 1974, Drug induced alterations in gonadotropin and prolactin release in the rat. En: Narcotic and the hypothalamus, Zimmerman, E. y R. George (editores), Raven Press, New York, p.121.
- McCann, S.M., Lumpkin, M.D., Mizunuma, H., Khorram, O., Ottlecz, A. y Samson, W.K., 1984, Peptidergic and dopaminergic control of prolactin release, Trends Neurosci. 7, 127.
- McEwen, B.S., 1981, Neural gonadal steroid action, Science 211, 1303.
- Medina, J.H., Novas, M.L., De Robertis, E., Pena, C. y Paladini, A.C., 1986, Identification of a potent endogenous benzodiazepine binding inhibitor from bovine cerebral cortex. En: GABA and endocrine function, G. Racagni y A.O. Donoso (editores), Raven Press, New York, p.
- Mizunuma, H., Samson, W.K., Lumpkin, M.D. y McCann, S.M., 1983, Evidence for an FSH-releasing factor in the posterior portion of the rat median eminence, Life Sci. 33, 2003.
- Moguilevsky, J.A., Faigón, M.R., Scacchi, P. y Szwarcfarb, B., 1985, Effect of the serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats, Neuroendocrinology 40, 135.
- Moguilevsky, J.A., Faigón, M.R., Scacchi, P. y Szwarcfarb, B., 1987, Role of sexual differentiation of the hypothalamus in the differential effect of the serotonergic system on LH in prepubertal male and female rats, Neuroendocrinology 45, 274.
- Mohler, H. y Okada, T., 1977, Benzodiazepine receptor demonstration in the central nervous system, Science 198, 849.
- Mori, M., Kobayashi, I. y Wakabayashi, K., 1978, Suppression of serum thyrotropin (TSH) concentrations following thyroidectomy and cold exposure by passive immunization with an

antiserum to thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rats, *Metabolism* 27, 1485.

Muraki, T., Nakdate, H., Tokunaga, Y., Kato, R. y Makino, T., 1979, Effect of narcotic analgesics and naloxone on proestrus surges of LH, FSH and prolactin in rats, *Neuroendocrinology* 28, 241.

Negro-Vilar, A. y Ojeda, S.R., 1978, Catecholaminergic and steroidal modification of LHRH and somatostatin (SRIF) release by median eminence *in vitro*, *Endocrinology* 102, 459.

Negro-Vilar, A., Ojeda, S.R. y McCann, S.M., 1979, Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals *in vitro*, *Endocrinology* 104, 1749.

Negro-Vilar, A., Advis, J.P., Ojeda, S.R. y McCann, S.M., 1982, Pulsatile luteinizing hormone (LH) patterns in ovariectomized rats: involvement of norepinephrine and dopamine in the release of LH-releasing hormone and LH, *Endocrinology* 111, 932.

Niaraki, M.A., Subramanian, M.G. y Moghissi, K.S., 1982, Effects of serotonin on reproductive hormone levels and testis morphology in adult male rats, *Proc. soc. exp. biol. med.* 170, 464.

Nielsen, M., Braestrup, C. y Squires, R.F., 1978, Evidence for a late appearance of brain specific benzodiazepine receptors: an investigation of 18 vertebrate and 5 invertebrate species, *Brain Res.* 141, 342.

Niswender, G.D., Midgley, A.R., Monroe, S.E. y Reichert, L.E., 1968, Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH ^{125}I , *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 807.

Oliver, C., Mical, R. y Porter, J., 1977, Hypothalamic pituitary vasculature: evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk, *Endocrinology* 101, 598.

Ojeda, S.R. y McCann, S.M., 1973, Evidence for participation of catecholaminergic mechanism in the post-castration rise in plasma gonadotropins, *Neuroendocrinology* 12, 295.

Ojeda, S.R. y McCann, S.M., 1974, Development of dopaminergic and estrogenic control of prolactin release in the female rat, *Endocrinology* 95, 1499.

Ojeda, S.R. y Ramírez, V.D., 1972, Plasma LH and FSH in matur-

- ing rats: response to hemigonadectomy, *Endocrinology* 90, 466.
- Ojeda, S.R. y Ramírez, V.D., 1973/1974, Short-term steroid treatment on plasma LH and FSH in castrated rats from birth to puberty, *Neuroendocrinology* 13, 100.
- Ojeda, S.R., Jameson, H.E. y McCann, S.M., 1977, Developmental changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the female rat: ovarian-adrenal influence during the infantile period, *Endocrinology* 100, 440.
- Ojeda, S.R., Urbanski, H.F. y Ahmed, C.E., 1986, The onset of female puberty: studies in the rat, *Rec. Prog. Horm. Res.* 42, 385.
- Ojeda, S.R., Andrews, W.W., Advis, J.P. y Smith White, S.S., 1980, Recent advances in the endocrinology of puberty, *Endocrine Rev.* 1, 228.
- Perez, J., Zucchi, I. y Maggi, A., 1988, Estrogen modulation of the γ -aminobutyric acid receptor complex in the central nervous system of the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 1005.
- Petraglia, F., Locatelli, V., Peñalva, A., Cocchi, D., Genazzani, A.R. y Muller, E.E., 1984, Gonadal steroid modulation of naloxone-induced LH secretion in the rat, *J. Endocrinol.* 101, 33.
- Pilotte, N.S. y Porter, J.C., Circulating luteinizing hormone and prolactin concentration in intact or castrated male rats treated with 5-hydroxytryptamine, *Endocrinology* 105, 875.
- Piva, F., Limonta, P., Maggi, R. y Martini, L., 1986, Stimulatory and inhibitory effects of the opioids on gonadotropin secretion, *Neuroendocrinology* 42, 504.
- Piva, F., Maggi, T., Limonta, P., Motta, M. y Martini, L., 1985, Effect of naloxone on luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin secretion in the different phases of the estrous cycle, *Endocrinology* 117, 766.
- Porter, J.C., Mical, R.S. y Cramer, O.M., 1971/1972, Effect of serotonin and other indoles on the release of LH, FSH and prolactin, *Gynecol. Invest.* 2, 13.
- Ramaley, J.A., 1982, Pituitary gonadotropin-releasing hormone responsiveness in the prepubertal period: effect of delayed puberty onset, *Neuroendocrinology* 34, 387.
- Raynaud, J.P., Mercier-Bodard, C. y Beaulieu, E.E., 1971, Rat estradiol binding plasma protein (EBP), *Steroids* 18, 767.

Rivier, C. y Vale, W., 1987, Inhibin: measurement and role in the immature female rat, *Endocrinology* 120, 1688.

Rivier, C., Cajander, S., Vaughan, J., Hsueh, A.J.H. y Vale, W., 1988, Age dependent changes in physiological action, content, and immunostaining of inhibin in male rats, *Endocrinology* 123, 120.

Rotsztein, W.H., Charli, J.L., Pattou, E. y Kordon, C., 1977, Stimulation by dopamine of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) release from the mediobasal Hypothalamus in male rats, *Endocrinology* 101, 1475.

Root, A.W., Shaprio, B.H., Duckett, G.E. y Goldman, A.S., 1975, Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone in newborn rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 631.

Roselli, C.E., Horton, L.E. y Resko, J.A., 1985, Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system, *Endocrinology* 117, 2471.

Roussel, J.P., Astier, H. y Tapia-Arancibia, L., 1986, Benzodiazepines inhibit thyrotropin (TSH)-releasing hormone-induced TSH and growth hormone release from perfused rat pituitaries, *Endocrinology* 119, 2519.

Ruzsas, C., Limonta, P. y Martini, L., 1982, Role of serotonergic neurones in the control of gonadotrophin and prolactin secretion in the rat, *J. Endocrinol.* 94, 83.

Salisbury, R.L., Dudley, S.D. y Weisz, J., 1982, Effect of gonadotrophin-releasing hormone on circulating levels of immunoreactive luteinizing hormone in fetal rats, *Neuroendocrinology* 35, 265.

Sander, H.J., van Leeuwen, E.C.M., de Jong, F.H. y Meijs-Roelofs, H.M.A., 1984, Ovarian inhibin-like activity: presence in granulosa cell conditioned medium of cyclic rats and evidence of secretion in prepubertal female rats, *J. Endocrinol.* 102: S29.

Sander, H.J., Meijs-Roelofs, H.M.A., Kramer, P., van Leeuwen, E.C.M., 1985, Inhibin-like activity in ovarian homogenates of prepubertal female rats and its physiological significance, *J. Endocrinol.* 107, 251.

Sarkar, D.K. y Fink, G., 1979, Mechanism of the first spontaneous gonadotrophin surge and that induced by pregnant mare serum and effects of neonatal androgen in rats, *J. Endocrinol.* 83, 339.

- Scatchard, B., 1949, The attraction of protein for small molecules and ions, *Ann. N. Y. Sci.* 51, 660.
- Schettini, G., Cronin, M.J., O'Dell, S.B. y MacLeod, R.M., 1984, The benzodiazepine diazepam inhibits basal and secretagogue-stimulated prolactin release in vitro, *Brain Res.* 291, 343.
- Schneider, H.P.G. y McCann, S.M., 1970, Mono- and indolamines and control of LH secretion, *Endocrinology* 86, 1127.
- Schultz, R., Wilhelm, A., Pirke, C.M. y Herz, A., 1982, Regulation of luteinizing hormone secretion in prepubertal male and female rats, *Life Sci.* 31, 2167.
- Schulz, R., Wilhelm, A., Pirke, K.M. y Herz, A., 1985, Sex-dependent endorphinergic and adrenergic control mechanisms of luteinizing hormone secretion in immature rats, *Acta endocrinol.* 109, 198.
- Setalo, G., Vigh, S., Schally, A. Arimura, A. y Flerko, B., 1975, LHRH-containing neural elements in the rat hypothalamus, *Endocrinology* 96, 135.
- Shaban, M.A. y Terranova, P.F., 1986, 2-Bromo- β -Ergocryptine mesylate (CB-154) inhibits prolactin and luteinizing hormone secretion in the prepubertal female rat, *Biol. Reprod.* 34, 788.
- Shoemaker, H., Bliss, M. y Yamamura, H., 1981, Specific high affinity saturable binding of ^3H -Ro 5-4864 to benzodiazepine receptor sites in rat cerebral cortex, *Eur. J. Pharmacol.* 71, 173.
- Sigel, E., Mamalaki, C. y Barnard, E. A., 1985, Reconstitution of the purified γ -aminobutyric acid-benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex into phospholipid vesicles, *Neurosci. Lett.* 61, 165.
- Simpkins, J.W., Kalra, S.P. y Kalra, P.S., 1983, Variable effects of testosterone on dopamine activity in several microdissected regions in the preoptic area and medial basal hypothalamus, *Endocrinology* 112, 177.
- Sirinathsingji, D.J.S., Motta, M. y Martini, L., 1984, Induction of precocious puberty in the female rat after chronic naloxone administration during the neonatal period: the opiate 'brake' on prepubertal gonadotropin secretion, *J. Endocrinol.* 104, 299.

- Smith-White, S.S. y Ojeda, S.R., 1981a, Changes in ovarian LHRH receptor content during the onset of puberty in the female rat, *Endocrinology* 108, 347.
- Smith-White, S.S. y Ojeda, S.R., 1981b, Changes in ovarian luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor content and in gonadotropin induced ornithin decarboxilase activity during prepubertal and pubertal development of the female rat, *Endocrinology* 109, 152.
- Smith, D. y Gallager, D., 1987, GABA, benzodiazepine and serotonergic receptor development in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological studies, *Dev. Brain Res.* 35, 191.
- Spencer, G.M. y Whitehead, S.A., 1986, A comparison of the effects of gonadal steroids on naloxone-induced LH secretion in gonadectomized rats, *J. Endocrinol.* 110, 327.
- Squires, R.F., Klepner, C.A. y Benson, D.I., 1980, Multiple benzodiazepine receptor complexes: some benzodiazepine recognition sites are coupled to GABA receptors and ionophores. En: *Receptors for neurotransmitters and peptide hormones*, G. Pepeu, M.J. Kuhar y S.J. Enna (editores), Raven Press, New York, p. 285.
- Steger, R.W. y Morgen, W., 1985, Dopaminergic control of pituitary hormone release. En: *Handbook of pharmacologic Methodologies for the study of neuroendocrine system*, Steger, R.W. y Johns, A. (editores), CRC Press, Boca Ratón, Florida, p. 65.
- Steinberger, A. y Steinberger, E., 1976, Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells, *Endocrinology* 99, 918.
- Sylvester, P.W., Sarkar, D.K., Briski, K.P. y Meites, J., 1985, Relation of gonadal hormones to differential LH response to naloxone in prepubertal male and female rats, *Neuroendocrinology* 40, 165.
- Sylvester, P.W., VanVugt, D.A., Aylsworth, C.A., Hansen, E.A. y Meites, J., 1982, Effects of morphine and naloxone on inhibition by ovarian hormones of pulsatile release of LH in ovariectomized rats, *Neuroendocrinology* 34, 269.
- Szabo, M., Kovathana, N., Gordon, K. y Forman, L.A., 1978, Effect of passive immunization with an antiserum to thyrotropin (TSH)-releasing hormone on plasma TSH levels in thyroidectomized rats, *Endocrinology* 102, 799.
- Tallman, J.F. y D.W. Gallager, 1985, The GABAergic system: a

locus of benzodiazepine action, *Ann. Rev. Neurosci.* 8, 21.

Thomas, J.W. y Tallman, J.F., 1984, Solubilization and characterization of brain receptor methodologies, En: *Neurobiological Research (Pt A)*, P.J. Marangos, I.C. Campbell y R.M. Cohen (editores), Academic Press, Orlando, p. 95.

Tuomisto, J. y Mannisto, P., 1985, Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones, *Pharmacological Reviews* 37, 249.

Urbansky, H.F. y Ojeda, S.R., 1985a, The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion, *Endocrinology* 117, 644.

Urbansky, H.F. y Ojeda, S.R., 1985b, *In vitro* stimulation of prepubertal changes in pulsatile luteinizing hormone release enhances progesterone and 17 β -estradiol secretion from immature rat ovaries, *Endocrinology* 117, 638.

Valli, M., Jadot, G., Courtiere, A., Tamalet, C. y Baret, A., 1985, Effects of the 1,5-benzodiazepine clobazam on pituitary hormones in the male rat, *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.* 7, 179.

VanRees, G.P, de Koning, J., 1985, Regulation of the release of LH and FSH. A releasing factor, *Front. Horm. Res.* 14, 1.

Vijayan, E. y McCann, S.M, 1978, Re-evaluation of the role of catecholamines in control of gonadotropin and prolactin release, *Neuroendocrinology* 25, 150.

Walker, P., Coulombe, P. y Dussault, J.H., 1980, Effects of triiodothyronine on thyrotropin-releasing hormone-induced thyrotropin release in the neonatal rat, *Endocrinology* 107, 1731.

Weiner, R.I. y Ganong, W.F., 1978, Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion, *Physiol. Rev.* 58, 905.

Weisz, J. y Ward, I.L., 1980, Plasma testosterone and progesterone of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring, *Endocrinology* 106, 306.

Welschen, R., Hermans, W.P. y de Jong, F.H., 1980, Possible involvement of inhibin in the interrelationship between members of antral follicles and peripheral FSH concentrations in female rats, *J. Reprod. Fertil.* 60, 485.

Wildt, L., Hausler, A., Marshall, G., Hutchinson, J.S., Plant, T.M., Belchetz, P.E. y Knobil, E., 1981, Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the Rhesus monkey, *Endocrinology* 109, 376.

Woolf, P.D. y Lee, L., 1977, Effect of the serotonin precursor, tryptophan, on pituitary hormone secretion, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45, 123.

Wuttke, W., Dohler, K.D. y Gelato, M., 1976, Oestrogens and prolactin as possible regulators of puberty, *J. Endocrinol.* 68, 391.

Wuttke, W., Hancke, J.L., Hohn, K.G. y Baumergarten, H.G., 1978, Effect of intraventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine on serum gonadotropins and prolactin, *Ann. NY Acad. Sci.* 305, 423.

Wuttke, W., Honma, K., Lamberts, R. y Hohn, K.G., 1980, The role of monoamines in female puberty, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 39, 2378.

Young, W.S. y Kuhar, M.J., 1980, Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in the rat brain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212, 337.