

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**TRANSFORMACION MORFOFUNCIONAL  
DEL TRANSPLANTE DE PAROTIDA EN LA SILLA TURCA  
TRAS HIPOFISECTOMIA EN LA RATA**

**Pilar Alvarez Vega**

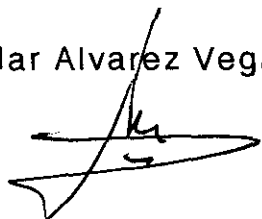
Madrid, 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

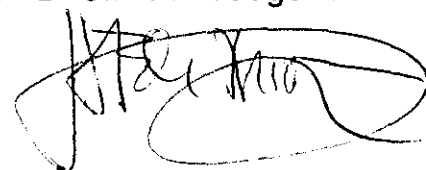
FACULTAD DE MEDICINA

TRANSFORMACION MORFOFUNCIONAL  
DEL TRANSPLANTE DE PAROTIDA EN LA SILLA TURCA  
TRAS HIPOFISECTOMIA EN LA RATA

Pilar Alvarez Vega



Vº Bº J.A.F. Tresguerres.



TESIS DOCTORAL

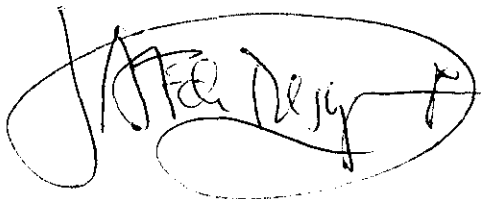
Madrid, 1994

JESUS A. F. TRESGUERRES, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, con el título "TRANSFORMACION MORFOFUNCIONAL DEL TRANSPLANTE DE PAROTIDA EN LA SILLA TURCA TRAS HIPOFISECTOMIA EN LA RATA", presentada por Pilar Alvarez Vega para optar al Grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y hallándose concluida autorizo su presentación a fin de que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Madrid, Septiembre de 1994

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature is cursive and appears to read 'Jesus A.F. Tresguerres'.

JESUS A.F. TRESGUERRES

Director de la Tesis Doctoral

A María, Alberto y José Luís.

Ellos han sabido comprender con cariño  
y ternura el largo tiempo que no he  
podido dedicarles.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi padre "in memoriam" a quien prometí constancia y fe en mí misma para salvar todas las dificultades.

Al Profesor Jesús A.F. Tresguerres con quien me inicié en la investigación básica. Mi gratitud plena por su dedicación en la elaboración y dirección de esta tesis.

Al Doctor A. Gómez-Pan, mi maestro, a quien siempre he admirado y cuya ayuda y consejos han supuesto para mí un gran estímulo en mi trabajo.

Al Doctor P. Gil-Lozaga por su valiosa e imprescindible colaboración en el estudio de inmunohistoquímica.

A la Doctora M<sup>a</sup> Angeles Villanúa, por su ayuda, por su comprensión, "gracias mil". Así como también a todos los compañeros del Departamento que de alguna manera han colaborado para poner punto final a esta tesis. Muy especialmente a mi querida Luci por su incondicional e insustituible ayuda.

A Nacho Hernández Colau por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

A Raúl M. Muñoz cuya inestimable ayuda en la elaboración informática del texto jamás podré olvidar.

## INDICE

<b>1 INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.1 Estructura funcional del sistema hipotálamo-hipofisario: Antecedentes históricos . . . . .	1
1.2 Embriología de la hipófisis . . . . .	4
1.3 Hipófisis faríngea . . . . .	7
1.4 Anatomía de la hipófisis . . . . .	8
1.5 Circulación hipofisaria . . . . .	11
1.6 Métodos de estudio de los tipos celulares en la adenohipófisis . . . . .	14
1.7 Neuroregulación de la hormona del crecimiento . . . . .	21
1.7.1 Vía $\alpha$ -adrenérgica . . . . .	24
1.7.2 Vía $\beta$ -adrenérgica . . . . .	25
1.7.3 Vía dopaminérgica . . . . .	26
1.7.4 Vía colinérgica . . . . .	27
1.8 Regulación de la secreción de gonadotropinas . . . . .	32
1.8.1 El pico ovulatorio de LH y FSH . . . . .	33
1.8.2 Liberación basal de gonadotropinas . . . . .	35
1.9 Regulación de la secreción de prolactina . . . . .	38
1.9.1 Liberación pulsátil de PRL . . . . .	38
1.9.2 El pico preovulatorio de PRL . . . . .	42
1.9.3 Control paracrino de la liberación de PRL . . . . .	44
1.10 Estructura funcional de la glándula parótida en la rata . . . . .	47
1.11 Diferenciación celular . . . . .	48
<b>2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO</b>	<b>51</b>
<b>3 DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>56</b>
<b>4 MATERIALES</b>	<b>58</b>
4.1 Instrumentos quirúrgicos . . . . .	58
4.2 Animales de experimentación . . . . .	63
4.3 Soluciones tampón . . . . .	64
4.4 Reactivos para el radioinmunoensayo: Antígenos y anticuerpos . . . . .	65
4.5 Reactivos para inmunocitoquímica: tinciones y anticuerpos . . . . .	66
<b>5 METODOS EXPERIMENTALES</b>	<b>67</b>
5.1 Hipofisectomía parafaríngea . . . . .	67
5.1.1 Procedimiento quirúrgico . . . . .	67
5.1.2 Transplante de parótida . . . . .	71
5.1.3 Cuidados postoperatorios . . . . .	73
5.2 Pautas de tratamiento . . . . .	74
5.2.1 Toma de muestras . . . . .	74
5.2.2 Estímulo con LHRH y TRH . . . . .	74
5.2.3 Estímulo con GRF-post-piridostigmina . . . . .	74
5.3 Obtención de órganos . . . . .	75

<b>6</b>	<b>METODOS ANALITICOS</b>	<b>76</b>
6.1	Radioinmunoanálisis .....	76
	6.1.1 Radioinmunoanálisis de LH .....	76
	6.1.2 Radioinmunoanálisis de PRL .....	77
	6.1.3 Radioinmunoanálisis de GH .....	78
	6.1.4 Radioinmunoanálisis de corticosterona .....	79
6.2	Cuantificación de proteínas en tejido hipofisario y parotídeo .....	84
	6.2.1 Fundamento teórico del método .....	84
6.3	Estudio inmunohistoquímico del trasplante .....	85
	6.3.1 Perfusión vascular .....	85
	6.3.2 Técnica de inmunohistoquímica .....	86
6.4	Análisis estadístico de los resultados .....	86
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>87</b>
7.1	Técnica quirúrgica: hipofisectomía parafaríngea-trasplante de parótida .....	87
7.2	Frotis vaginal .....	87
7.3	Supervivencia .....	88
7.4	Pesos .....	90
7.5	Medidas hormonales .....	95
	7.5.1 LH .....	95
	7.5.2 GH .....	95
	7.5.3 PRL .....	96
	7.5.4 Corticosterona .....	97
	7.5.5 Análisis histológico e inmunohistoquímico .....	110
<b>8</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>116</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>145</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>147</b>

## ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa o corticotropa.
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico.
ANP	Péptido Natriurético Atrial.
BDNF	Factor de crecimiento Neural Derivado de Cerebro.
BSA	Albúmina sérica bovina.
CPB	Competitive Binding Protein.
CRH	Hormona liberadora de corticotropina.
DA	Dopamina.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
FSH	Hormona folículo estimulante.
GABA	Acido gamma-aminobutírico.
GAP	Péptido asociado al LHRH.
GH	Hormona del crecimiento.
GHF-1	Factor inductor de la expresión del gen de GH o Pit-1.
GHRH	Hormona liberadora de hormona del crecimiento o GRH.
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas o LHRH.
hCG	Gonadotropina coriónica humana.
HSR	Ritmo somatotropo hipotalámico.
Hpx-Tp	Hipofisectomía-Transplante de parótida.
Hpx-Tg	Hipofisectomía-Transplante de grasa.
Hpx-C	Hipofisectomía-Cemento.
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina.
LH	Hormona luteinizante.
LHRH	Hormona liberadora de hormona luteinizante o GnRH.
MET/S	Línea de estudio de mecanismos de diferenciación celular "in vitro".



mRNA	Acido ribonucleico mensajero.
MSH	Hormona estimuladora de los melanocitos.
NIADDK	National Institute for Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney diseases.
NGF	Factor de crecimiento neural.
NPY	Neuropéptido Y.
OT	Oxitocina.
PAS	Periodic Acid-Schiff.
PBS	Tampón fosfato salino.
PIF	Factor inhibidor de la secreción de prolactina.
Pit-1	Factor de transcripción que regula la expresión del gen de GH o GHF-1.
POMC	Proopiomelanocortina.
PRL	Prolactina.
PRF	Factor liberador de prolactina.
PTH	Paratohormona.
Q	Quiasma.
RIA	Radioinmunoanálisis.
RNA	Acido ribonucleico.
s.c.	Subcutáneo.
S.N.C.	Sistema nervioso central.
SS	Somatostatina.
TBE	Tribromoetanol.
TGFβ	Factor transformante del crecimiento β.
TIDA	Sistema tuberoinfundibular dopaminérgico.
TM	Tubérculo mamilar.
TRH	Hormona liberadora de la hormona tirotrópica.
TSH	Hormona tirotrópica.
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo.

## **1.INTRODUCCION**

## **1.1. ESTRUCTURA FUNCIONAL DEL SISTEMA HIPOTALAMO HIPOFISARIO: ANTECEDENTES HISTORICOS**

El Sistema hipotálamo-hipofisario es el elemento más claro de relación neuroendocrina a pesar de que a la adenohipófisis no llegan fibras nerviosas.

Ramón y Cajal (1894) demostró la ausencia de conexiones axónicas entre hipotálamo y adenohipófisis, sugiriendo así una relación morfofuncional vascular entre estas dos estructuras.

La conexión vascular entre hipotálamo e hipófisis no fue conocida hasta 1930, año en que Popa y Fielding descubren el plexo vascular portal, ya reconocido en 1634 por Willis con el nombre rete mirabilis.

La dirección de la sangre en el sistema porta en sentido exclusivamente craneo-caudal fue postulado en 1936 por Wislocki, aunque la inicialmente concebida por sus descubridores Popa y Fielding (1930) era en dirección ascendente.

Recientemente, el flujo exclusivamente craneo-caudal del sistema porta-hipotálamo-hipofisario ha sido cuestionado y hoy se admite, que en determinadas circunstancias puede tener dirección retrógrada hipófiso-hipotalámica. Esto explicaría la influencia que las hormonas adenohipofisarias ejercen sobre las hormonas hipotalámicas, autoregulando su propia actividad (feed-back de asa corta).

El reconocimiento del control hipotalámico de la actividad adenohipofisaria fue postulado por Geoffrey Harris y su grupo en 1937.

Unos años más tarde, en 1952, Harris y Jacobson demostraron que la relación anatómica hipotálamo-hipofisaria es esencial para la integridad funcional de la adenohipófisis.

El carácter secretor de las neuronas hipotalámicas fue reconocido por Bargmann (1949) y los esposos Scharrer (1954).

La búsqueda de extractos hipotalámicos con actividad hipofisotropa así como su ulterior caracterización y síntesis fue una de las metas de los grupos de Roger Guillemin y Andrew V. Schally quienes fueron galardonados con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1977, por su gran contribución al conocimiento de la estructura de las hormonas hipotalámicas y de la interrelación entre el cerebro y el sistema endocrino (Guillemin 1978, Schally y cols., 1978).

La primera hormona hipotalámica conocida fue la hormona liberadora de tiotropina (TRH) (Schally y cols., 1966).

En 1971 se identificó la hormona liberadora de gonadotropinas o LHRH (Matsuo y cols. 1971).

La estructura de la somatostatina (SS), inhibidora de la secreción de hormona del crecimiento (GH) fue comunicada por Brazeau en 1973.

En 1981 se identificó la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Vale, 1981).

La última de las hormonas hipotalámicas conocidas fue la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) en 1982 (Guillemin y cols., 1982).

Además de estas hormonas, el hipotálamo ejerce una acción inhibidora sobre la secreción de prolactina (PRL) y en menor grado sobre la TSH, mediante la dopamina (DA), cuya actividad como factor inhibidor de la secreción de prolactina (PIF) fue demostrada por MacLeod y Lehmeyer en 1974.

<u>AÑO</u>	<u>HORMONA</u>	<u>AMINOACIDOS</u>
1966	TRH (Schally)	3
1971	LHRH (Matsuo, Schally)	10
1973	SS (Brazeau)	14, 28
1974	DA (MacLeod)	---
1981	CRH (Vale)	41
1982	GHRH (Guillemin, Vale)	44, 40, 37

El hipotálamo, por tanto regula la función de la adenohipófisis mediante la producción de una serie de mensajeros químicos que se sintetizan en los somas neuronales de los núcleos hipotalámicos así como también en otras áreas extrahipotalámicas de S.N.C.

Estas hormonas son vehiculadas por el flujo axonal a la eminencia media donde se almacenan en terminales nerviosas en íntimo contacto con otras terminales catecolaminérgicas y con una profusa red de capilares que constituyen el extremo craneal del plexo portal hipotálamo-hipofisario. A través de este plexo, estas hormonas hipotalámicas llegan a la adenohipófisis, su órgano diana, para ejercer allí el efecto modulador de la síntesis y secreción de hormonas tróficas anterohipofisarias.

## 1.2. EMBRIOLOGIA DE LA HIPOFISIS

La porción glandular de la hipófisis (adenohipófisis) surge de la bolsa de Rathke, una evaginación del ectodermo de la orofaringe que entra en contacto con el diencéfalo primitivo en el embrión humano. El área del sistema nervioso central en contacto con la bolsa de Rathke se diferencia en el lóbulo posterior o neurohipófisis (figura 1).

El crecimiento de esa porción de la bolsa de Rathke en contacto directo con la neurohipófisis es mucho menos extenso que la parte opuesta de la pared de la bolsa. La primera porción será la pars intermedia de la adenohipófisis. En algunos animales, como la rata y el perro, la pars intermedia mantiene su forma embriológica en el adulto y es una zona separada de fácil reconocimiento. En el hombre, sin embargo, las células adenohipofisarias de la pars intermedia se dispersan por la pars anterior. Se utiliza el nombre de pars distalis para esta forma combinada (Purves, 1966). La función que se postuló para las células de la pars intermedia era producir la hormona estimulante de los melanocitos (MSH), aunque después se ha visto que esta es parte de proopiomelanocortina (POMC).

La porción de la bolsa de Rathke que no está en contacto con el diencéfalo crece rápidamente hasta formar la pars anterior. En su desarrollo temprano, crecen lateralmente dos alas de tejido desde la pars anterior, se fusiona cruzando la línea media, y crece a lo largo del tallo hipofisario. Esta estructura constituye la pars tuberalis, para la cual no se ha establecido una función endocrina determinada. El resto de las células de la pars anterior secretan gonadotropinas (FSH y LH), TSH, ACTH, GH y PRL.

El destino del lumen de la bolsa de Rathke varia con la especie. En unas permanece intacto y en otras está completamente obliterado. En el hombre, algunas partes persisten en la unión de la neurohipófisis. Es más prominente en las hipófisis de niños y jóvenes que en adultos y puede tomar forma de hendidura o de una colección de pequeñas vesículas llenas de coloide.

La parte superior de la bolsa de Rathke se separa pronto de su conexión con la orofaringe por una falta de desarrollo del mesénquima. Sin embargo, unas pocas células de la porción inferior de la bolsa quedan embebidas en el canal cranofaríngeo y se rodean eventualmente del hueso esfenoides, constituyendo la hipófisis faríngea humana.

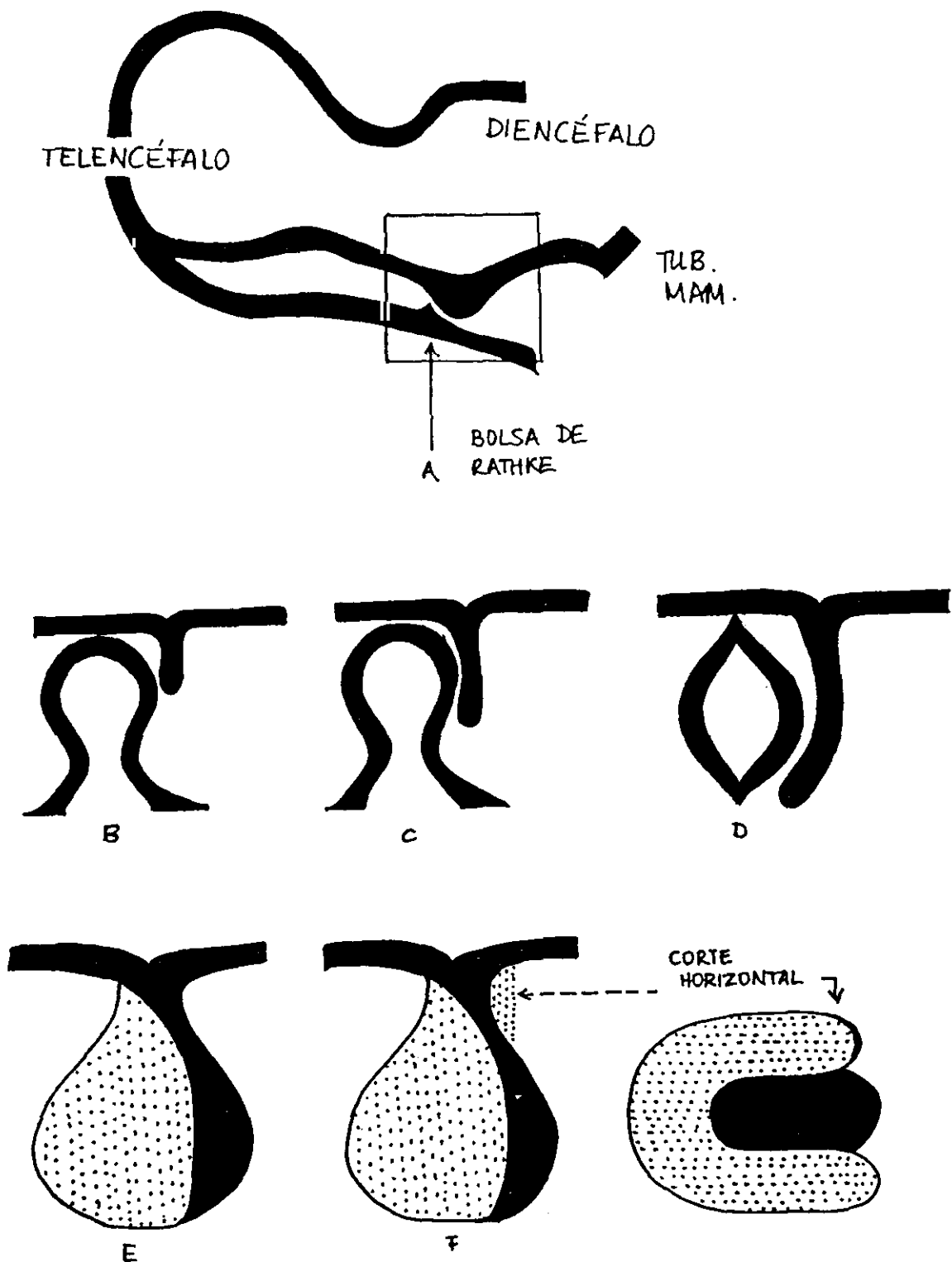


Figura 1.- Embriología de la hipófisis.



### 1.3. HIPOFISIS FARINGEA

Está constituida por pequeños restos de tejido derivados de la bolsa de Rathke. Generalmente tiene más de 4 mm de diámetro (Boyd, 1956; McPhie y Beck, 1973) y está enclavada en el hueso esfenoides. Consiste en pequeños racimos de células cromóforas poco diferenciadas y ocasionales células acidófilas y basófilas.

A diferencia de la pars distalis, tiene una rica inervación que procede del ganglio esfeno-palatino pero no cuenta con irrigación sanguínea portal, es decir que la sangre que circula por la hipófisis faríngea no contiene hormonas reguladoras hipotalámicas.

Aunque técnicas inmunocitológicas han detectado la presencia de hormonas hipofisarias (GH y PRL) en el citoplasma de estas células y aunque se ha dicho que pueden hacerse cargo de parte de la función de la adenohipófisis en caso de hipofisectomía o hipopituitarismo no hay pruebas directas de que la hipófisis faríngea desempeñe una función importante en la secreción endocrina (Boyd, 1956; McPhie y Beck, 1973).

Las células epiteliales que constituyen la mucosa de revestimiento de la faringe tienen una vida limitada a 2 ó 3 semanas. Durante un periodo ontogénico también muy breve, las alteraciones de este epitelio modifican el mensaje genético dando como resultado los cambios funcionales que lo convierten en el epitelio secretor de la adenohipófisis adulta.

#### 1.4. ANATOMIA DE LA HIPOFISIS

La hipófisis rodeada por el hueso esfenoides y abierta por el diafragma selar, está situada en la silla turca, cerca del hipotálamo y del quiasma óptico (Bergland y cols., 1968).

La silla turca se halla separada por arriba de la cavidad craneal por una fuerte deflexión de la duramadre, el diafragma selar, a través del cual el tallo hipofisario y sus respectivos vasos sanguíneos llegan al cuerpo principal de la glándula.

La hipófisis es un pequeño órgano que mide 10 x 13 x 6 mm y pesa unos 0,5 g, se agranda durante el embarazo (Goluboff y Ezrin, 1969) y puede pesar 1 g o más en las mujeres multíparas.

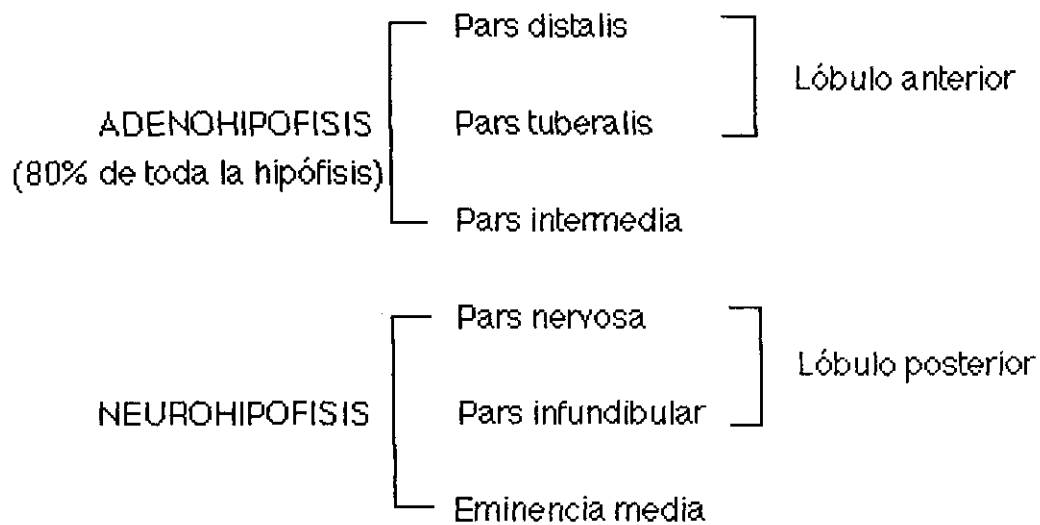
En la rata la hipófisis mide 3,5 x 5,5 x 1,5 mm y tiene un peso de alrededor de 8 mg para la rata macho y 14 mg para la rata hembra.

El 80% del volumen de la hipófisis de la rata corresponde a la adenohipófisis, el 9% a la pars intermedia y el 11% a la neurohipófisis.

Durante la lactación, la adenohipófisis de la rata se incrementa el 85% mientras que la pars intermedia se reduce el 5% y la pars nervosa el 9% (Conklin, 1968).

Debido a la falta de una terminología uniforme, las descripciones anatómicas previas crearon una considerable confusión. Actualmente, con algunas modificaciones, la terminología propuesta por Rioch y cols. (1940) es de uso general.

La hipófisis humana desde el punto de vista embriológico se divide en dos partes (figura 2):



**Figura 2.-Anatomía de la hipófisis**

1.-ADENOHIPOFISIS que deriva de la evaginación del ectodermo bucal conocida como bolsa de Rathke.

2.-NEUROHIPOFISIS que surge del ectodermo neural del piso del prosencéfalo de una evaginación del suelo del tercer ventrículo.

La pars intermedia de la hipófisis humana (Sheehan, 1968) es una estructura rudimentaria, poco desarrollada y sin significado endocrino aparente.

Se encuentra entre los lóbulos anterior y posterior y consiste en unas pocas cavidades quísticas tapizadas por un epitelio cuboide y llenas de material coloidal.

La pars tuberalis es la extensión hacia arriba de la pars distalis a lo largo del tallo hipofisario. Se compone de algunas capas de células cromóforas entremezcladas con ocasionales células basófilas y acidófilas. Aunque técnicas inmunocitológicas revelaron la presencia de hormonas en el citoplasma de las células de la pars tuberalis (Baker y Jaffe, 1975) se presume que esta parte de la hipófisis no tiene una función importante en la secreción adenohipofisaria.

Las células adenohipofisarias pueden encontrarse en dos regiones fuera de la adenohipófisis, en el lóbulo posterior y en la hipófisis faríngea.

La invasión de células basófilas (Rasmussen, 1958, Sheehan, 1968) en el lóbulo posterior se observa en más del 50% de las autopsias de adultos. No se hace evidente antes de la pubertad y es más frecuente en los varones y al avanzar la edad.

Estas células son PAS positivas pero más pequeñas y granulares que las del lóbulo anterior. La invasión de células basófilas no se asocia a ninguna enfermedad, terapia o anomalía endocrina específica.

La pars distalis es la más grande y desde el punto de vista funcional la más importante.

El lóbulo intermedio deriva de la pared posterior de la bolsa de Rathke.

Conexiones hipotálamo-hipofisarias:

- NEUROHORMONAL: Hipotálamo-lóbulo anterior.
- NERVIOSA: Hipotálamo-lóbulo posterior.
- HUMORAL: Lóbulo posterior-lóbulo anterior.

## 1.5. CIRCULACION HIPOFISARIA

El conocimiento sustancial de la circulación hipofisaria (Sheehan y Stanfield, 1961, Daniel y Prichard, 1975) es de fundamental importancia para poder comprender las correlaciones funcionales entre el hipotálamo y la hipófisis y también los detalles de como la actividad secretora adenohipofisaria está regulada por el área hipofisotrópica del hipotálamo.

La hipófisis recibe su irrigación sanguínea de las arterias hipofisarias superiores e inferiores (figura 3).

La arteria hipofisaria superior nace de la carótida interna. Algunas de sus ramas penetran en el infundíbulo y terminan en gomitolos o en la red capilar a los mismos.

Los gomitolos están en el piso del hipotálamo, concretamente en la eminencia media. Estos gomitolos consisten en unas cortas arterias terminales rectas de paredes musculosas rodeadas por una densa red capilar.

Su función no se conoce claramente, pero al parecer pueden regular la circulación sanguínea en el lóbulo anterior y también en la red capilar adyacente, afectando de esta manera, la entrada de hormonas reguladoras hipotalámicas en el torrente circulatorio.

Dichas hormonas producidas en diferentes partes del hipotálamo, fluyen hacia abajo a lo largo de las fibras nerviosas hasta el infundíbulo. La red capilar perigomitolar es el lugar por donde entra la sangre.

Estos capilares forman venas paralelas grandes: son los vasos porta largos que corren hacia abajo por el tallo hipofisario y terminan en los capilares del lóbulo anterior. llevando consigo en concentraciones elevadas las hormonas reguladoras hipotalámicas hasta la adenohipófisis.

También puede ocurrir un flujo retrógrado de la adenohipófisis a la eminencia media, si este flujo existe, llevaría hormonas hipofisarias que podrían influir en la función hipotalámica.

La irrigación sanguínea del lóbulo posterior se origina en las arterias hipofisarias inferiores y en gran medida es independiente de la que baña al lóbulo anterior. La sangre venosa que proviene de los lóbulos hipofisarios desagua en el seno cavernoso mediante gran cantidad de venas.

Los vasos porta cortos, originados en la pars distalis del tallo y en el lóbulo posterior también penetran en el lóbulo anterior y transportan sustancias desde la hipófisis posterior hasta la pars distalis. Datos recientes parecen indicar que el 70-90% de la sangre hipofisaria viene de los grandes vasos porta y el resto de los vasos porta cortos. La organización vascular detallada del interior de la hipófisis se pudo definir gracias a la microscopía electrónica. Los senos hipofisarios están revestidos de endotelio. Entre la membrana basal del endotelio sinusoidal y las células parenquimatosas, existe un espacio perisinusoidal dentro del cual se liberan los gránulos secretorios antes de su disolución y entrada en los sinusoides.

Los neuropéptidos hipotalámicos transportados por el sistema porta son los factores determinantes de los cambios que convierten al epitelio faríngeo de la bolsa de Rathke en adenohipófisis (Dawson, 1948, Pateels, 1960).

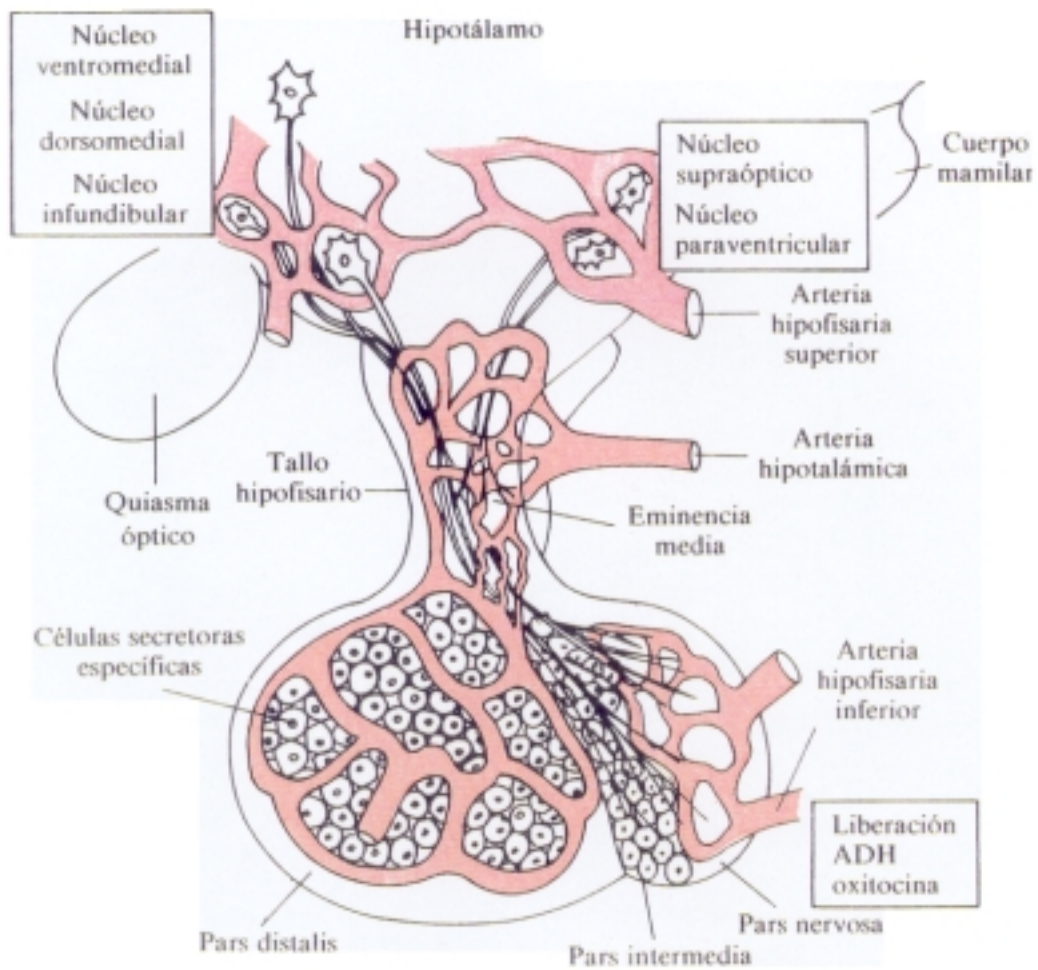


Figura 3.- Circulación hipofisaria

## 1.6. METODOS DE ESTUDIO DE LOS TIPOS CELULARES EN LA ADENOHIPOFISIS

Más que en ningún otro órgano endocrino, la interpretación de las patologías hipofisarias depende de la técnica de tinción utilizada. Los tipos celulares demostrables no dependen de la que se les aplique, sino también del tipo de fijación, del uso de agentes oxidantes y de la naturaleza química de las hormonas hipofisarias, la cual varía de unas especies a otras.

### Basófilos.

El histoquímico inglés, Pearson, demostró que los basófilos podían teñirse por la técnica PAS (periodic acid-Schiff), sugiriendo que contenían una glicoproteína. Se sabe que las tres hormonas trópicas; FSH, TSH y LH presentan un alto contenido en carbohidratos, por lo que se esperaba que provinieran de células Schiff-positivas. Pearson encontró que la técnica PAS no solo demostraba la existencia de los basófilos granulados por hematoxilina, a los que llamó células mucoides, sino también un gran número de células granuladas dispersas. Estas células granuladas PAS-positivas se han llamado células mucoides intermedias por Pearse o anfófilas (Burt y cols., 1954).

En ratas ha sido posible demostrar unas correlaciones precisas entre los basófilos granulados PAS-positivos y las variaciones fisiológicas en las gonadotropinas y tirotropinas (Purves y Griesbach, 1951, 1954). Estos descubrimientos no se han confirmado en el hombre, aunque, se sabe que las células granuladas PAS-positivas del hombre se incrementan en estados de deficiencia de las gónadas, tiroides o adrenales. Esto puede deberse a que en los roedores las células del lóbulo intermedio productoras de MSH, las cuales son también basófilas,



están localizadas en una zona discreta que no puede confundirse con el lóbulo anterior. En el hombre, están dispersas en la pars distalis y a menudo comprenden el mayor grupo de células PAS-positivas granuladas presentes (Purves, 1966).

Existen muchos métodos para diferenciar los basófilos del lóbulo intermedio en las glándulas humanas. El más utilizado es una tinción aldehído G-PAS-naranja-tionina (Paget y Eccleston, 1960) con el cual las células del lóbulo intermedio aparecen frecuentemente irregulares, basófilos (PAS-positivos) rojos. Estas células son más numerosas alrededor del borde rostral de la pars distalis y cerca de la superficie inferior. Se pueden distinguir otros tipos de basófilos, Schiff-positivos, por el tamaño y la forma.

El tipo de basófilos del lóbulo intermedio no se encuentra en la pars distalis pero es la célula que migra al lóbulo posterior (Rasmussen, 1930). Forma los adenomas basófilos de la enfermedad de Cushing y media en los cambios de Crooke (Kracht y cols., 1966). Como puede esperarse por su origen contiene MSH (Morris y cols., 1956). Métodos de inmunofluorescencia han demostrado que algunos de estos basófilos contienen también ACTH (Leznoff y cols., 1962). Esta aparente dualidad de función puede estar relacionada con el hecho de que ACTH y una forma de MSH son polipéptidos sencillos con una secuencia aminoacídica en común (Li, 1959).

Entre los basófilos de probable origen en el lóbulo anterior, es posible diferenciar otras subclases; basófilos tirotrópicos y dos clases de basófilos gonadotrópicos (Herland, 1960). En la adenohipófisis humana, la tinción más frecuente es la PAS-naranja-G-tionina (Paget y Eccleston, 1960).

Estudios recientes de inmunofluorescencia con anticuerpos para gonadotropina coriónica humana (hCG), que presentan reacciones cruzadas con LH, han identificado una de estas células como las gonadotropas LH. Los gránulos de secreción de las células LH no se tiñen con aldehído tionina. Sin embargo, cuerpos de inclusión citoplasmáticos, probablemente lisosomas, presentan una fuerte afinidad para esta tinción. Los gránulos de secreción de los basófilos FSH se tiñen débilmente con PAS y son violetas con PAS-aldehído tironina o PAS-alician azul. Estas células pueden reconocerse porque presentan inclusiones citoplasmáticas de PAS-positivas, probablemente de naturaleza lipídica, normalmente alrededor del núcleo o del aparato de Golgi. Se ha asignado a estas células la producción de FSH ya que sufren hiperplasia e hipertrofia en situaciones asociadas con un incremento en la producción de FSH (Robyn y cols., 1964, Herland, 1965). Childs y cols. (1986) demuestran con inmunocitoquímica que las células gonadotropas producen tanto LH como FSH.

Los basófilos tirotrópicos coinciden con los basófilos del lóbulo intermedio alrededor del borde de la hipófisis, pero pueden encontrarse también en las porciones profundas de la glándula. Las gonadotrópas se sitúan en porciones laterales profundas de la glándula en asociación con acidófilos.

### Acidófilos

Se distinguen dos clases de acidófilos en la hipófisis humana. Los acidófilos granulados convencionales (en los que se localiza la GH (Leznoff y cols., 1960)) y los acidófilos granulados (relacionados con la producción de prolactina (Desclin, 1963)). Las somatotrópas se sitúan en dos masas simétricas laterales de la pars distalis. Las células de prolactina ocupan la mayor porción de la parte lateral.

### Cromófobos

Dependiendo del método de tinción utilizado, muchas células aparecen como cromófobas a microscopía óptica, aunque solo pueden localizarse unos pocos orgánulos secretores en ellas con la microscopía electrónica. En la rata, la microscopía electrónica ha mostrado cambios en algunos cromófobos grandes con núcleo hipercromático y gran cantidad de RNA en el citoplasma, lo que sugiere que estas células pueden ser la fuente de ACTH (Siperstein y Allison, 1965). En el hombre, la ACTH parece que se produce en los basófilos del lóbulo intermedio. Existe otra posible fuente de esta hormona en algunos cromófobos del lóbulo anterior.

Existe un tipo de basófilos poco corriente con núcleo grande y raro, llamados anfófilos hipertróficos que aparecen en pacientes con hiperactividad de la glándula adrenal. Se ha encontrado que unos basófilos dispersos grandes granulados incrementan la insuficiencia adrenal humana (Ezrin y Murray, 1963).

En pacientes que requieren un estudio completo de la adenohipófisis, se fija la glándula en una mezcla de Bouin-Hollande y HgCl saturado. Se pueden teñir secciones alternativas con la técnica tetracromo de Herlant para diferenciar dos tipos de acidófilos y con PAS-naranja-G, para una fácil diferenciación de las clases de basófilos. También permite una buena visualización de la neurosecreción teñible del lóbulo posterior.

Caracterización por microscopía electrónica de los diferentes tipos celulares.

En animales de experimentación ha sido posible distinguir los tipos funcionales de la adenohipófisis, no solo por diferentes tinciones sino también por las características morfológicas de los gránulos de secreción que se caracterizan por microscopía electrónica. En la hipófisis normal de rata LH, TSH y ACTH se producen en células que poseen unos gránulos de secreción pequeños (100-200  $\mu\text{m}$  de diámetro). La GH se produce en células con gránulos de secreción de 300 a 400  $\mu\text{m}$  de diámetro y las células de prolactina tienen gránulos de secreción de 600  $\mu\text{m}$  de diámetro. La actividad de síntesis de estas células se determina por cambios en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi y por la liberación de hormona por descarga de los gránulos (Herland, 1963).

En el hombre, los basófilos supuestamente secretores de LH se caracterizan por un núcleo y un citoplasma traslúcido. El retículo endoplásmico rugoso está moderadamente desarrollado, las mitocondrias no son muy numerosas y tienen pocas crestas, el aparato de Golgi no está muy desarrollado, los gránulos secretores tienen un tamaño de 250-300  $\mu\text{m}$ , son densos, esféricos y pueden formar racimos. Los basófilos FSH se caracterizan por ser abundantes y tener gránulos de secreción de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, mitocondrias densas, un aparato de Golgi clásico y un ergastoplasma cisternal que aparece lleno de un material floculento. Los basófilos MSH/ACTH tienen abundantes gránulos de secreción de 160-200  $\mu\text{m}$  de diámetro, mitocondrias variables, ergastoplasma poco desarrollado, ribosomas dispersos y un aparato de Golgi vesicular. La principal característica de esta célula es una inclusión grande llamada "cuerpo enigmático", ya que se desconoce su función.

Los cromófobos ACTH se parecen a los basófilos MSH/ACTH en lo que respecta al ergastoplasma poco desarrollado, ribosomas dispersos y a la morfología del aparato de Golgi y mitocondria. No tienen cuerpo enigmático y tienen escasos gránulos de secreción de 90 a 130  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Los acidófilos GH tienen abundantes gránulos de secreción de 350 a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un ergastoplasma lamelar bien desarrollado y normalmente carecen de aparato de Golgi. Los acidófilos de prolactina presentan los mayores gránulos de secreción con 700  $\mu\text{m}$  de diámetro. Sin embargo, estos gránulos varían en número y en osmofilia. Poseen un ergastoplasma bien desarrollado, como las células de GH y si presentan aparato de Golgi. Una característica principal es que presentan mitocondrias muy densas (Foncín, 1966).

### Hipofisis faríngea.

La hipófisis faríngea se diferencia de la pars distalis en que recibe una rica y directa inervación del ganglio esfenopalatino y en que su riego sanguíneo, que viene del plexo vascular del techo faríngeo, no transporta factores hipotalámicos.

Está formada por un conjunto de células pequeñas, que no sobrepasa normalmente los 3 mm de diámetro, embebidas en el hueso esfenoidal. Se componen de cromófobos pequeños y poco diferenciados entre los que se encuentran acidófilos y basófilos raramente.

La utilización de la técnica PAS-azul-alcian ácido perfórmico en la hipófisis faríngea ha demostrado que existen basófilos S y R. Los cambios de Crooke ocurren en las células R de pacientes con el síndrome de Cushing.

Se ha observado un elevado porcentaje de células cromófilas en pacientes con alteraciones endocrinas (Melchionna y Moore, 1938). Se ha encontrado que algunos individuos con deformidades congénitas que afectan a la función de la pars distalis y algunos que se sometieron a hipofisectomias presentaban incrementada la diferenciación cromófila y un aumento de la hipófisis faríngea (Müller, 1958). Mientras que se ha postulado que la glándula faríngea podría cubrir algunas de las funciones de la pars distalis bajo estas circunstancias, pero no existen pruebas biológicas a este respecto. Existen, sin embargo, algunas evidencias de que la hipófisis faríngea puede dar raras veces adenomas en presencia de una pars distalis aparentemente normal (Kepes y Fritzen, 1964).

#### Pars tuberalis.

No se ha establecido aun la función normal de la pars tuberalis. Se compone en su mayoría de cromófobos con algunos basófilos y pocos acidófilos. En el hombre, los basófilos de la pars tuberalis tienen una elevada actividad alfa-glicerol fosfato deshidrogenasa, en común con muchos basófilos de la pars distalis (Fand, 1965). El significado de esta observación se desconoce por el momento. En ratones jóvenes, el glucógeno aparece en ambos tipos de células de la pars tuberalis y en los espacios intercelulares (Siperstein, 1955).

## 1.7. NEURORREGULACION DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

Existen numerosas revisiones sobre la neuroregulación de la secreción adenohipofisaria. En cuanto a la GH es ya clásica la de Rose y Ganong (1980).

En 1992, Devesa, Lima y Tresguerres han publicado una interesante revisión y puesta al día sobre el control neuroendocrino de la secreción de GH.

La secreción episódica de la hormona de crecimiento depende del ritmo alternante hipotalámico en la liberación al sistema portal hipofisario de dos hormonas hipotalámicas polipeptídicas: la somatostatina (SS) de carácter inhibitor y la hormona liberadora de GH (GHRH, GRF o somatocrinina) (figura 4). Estas hormonas son a su vez moduladas por neurotransmisores centrales e influenciadas por otras hormonas y por sustratos metabólicos periféricos (Martin, 1973; Weiner y Ganong, 1978; Nistico y Scapagnini, 1980; Rose y Ganong, 1980; Gomez-Pan y Rodriguez-Arno, 1983; Wass, 1983; Dieguez y cols., 1988) bien actuando directamente sobre la hipófisis o modulando la secreción de GHRH y la SS.

La existencia de un ritmo hipotalámico somatotropo intrínseco (HSR) que gobierna la secreción de GH, ha sido demostrado por Martha y cols., 1988 en niños con déficit de GH y por Devesa y cols. en 1989 en adultos normales.

Este HSR intrínseco parece ser que permanece funcionalmente activo a lo largo de la vida. Sin embargo, tanto la edad como el sexo pueden modificar fisiológicamente estos patrones estándar de actividad (Jansson y cols., 1985).

El aislamiento, caracterización y síntesis de las dos hormonas directamente implicadas en el control de la secreción de GH, ha permitido estudiar más directamente su interrelación y el papel que ambas desempeñan en la neuroregulación de la secreción de GH.

La hormona de crecimiento se libera de forma pulsátil, con picos de secreción aproximadamente cada 180 minutos en ratas (Tannenbaum y cols., 1976; Tannenbaum y Ling, 1984). En el nadir espontáneo de GH, la respuesta de esta hormona al GHRH es mínima, indicando un tono somatostatinérgico endógeno elevado en ese momento, (Tannenbaum y Ling, 1984).

Si se inmuniza pasivamente con anticuerpos anti-SS a los animales, se modifica positivamente la respuesta de GH. Este sencillo y elegante experimento pone de manifiesto el papel fisiológico de la SS como inhibidor de la secreción de GH.

La importancia fisiológica del GHRH endógeno para producir GH de forma pulsátil fue demostrada bloqueando la secreción en pulsos de GH con anticuerpos monoclonales anti-GHRH y restaurando los pulsos de GH mediante GHRH exógeno (Wehrenberg y cols., 1982a, Tannenbaum y cols., 1983).

El GHRH es el principal modulador de la secreción de GH en cuanto se refiere a sus fases secretoras episódicas que caracterizan los patrones pulsátiles fisiológicos de esta hormona (Willoughby y cols., 1983).

Las lesiones ventromediales del hipotálamo dejan abolida la secreción pulsátil de GH por destrucción de las neuronas secretoras de GHRH, según describieron Eikelboom y Tannenbaum en 1983.



El GHRH regula su propia actividad a través de mecanismos de retroalimentación (feed-back). El circuito ultracorto de feed-back negativo ha sido puesto de manifiesto por Lumpkin y cols. (1985) quienes observaron que en la rata, la administración intraventricular de GHRH a dosis mínimas, en lugar de estimular, disminuía la secreción de GH.

El GHRH regula también su propia actividad mediante el estímulo de la secreción de su hormona antagonista, la SS. Wehrenberg y cols.(1982b, 1983), han obtenido pruebas sobre el papel antagonista fisiológico entre la SS y el GHRH en el control de la GH: La administración en ratas conscientes y con movilidad libre de pequeñas dosis de GHRH sintético, entre las fases de secreción espontánea de dicha hormona, no lograban respuestas de GH, debido al aumento de la SS endógena, lo que se comprobó al administrar un pretratamiento con antisuero anti-SS y detectar un aumento significativo de GH.

La administración de anticuerpos monoclonales anti-GHRH bloquea la secreción pulsátil de GH, lo que constituye una prueba del papel fisiológico del GHRH endógeno en la regulación de la GH (Wehrenberg y cols., 1982a).

La secreción de GH estimulada por el GHRH, a su vez también modula a la hormona hipotalámica estimuladora, mediante regulación negativa por el aumento de somatomedinas (IGF-I, IGF-II, factores de crecimiento similares a la insulina tipo I y II).

Berelowitz y cols. en 1981, demostraron que la administración de una preparación purificada de somatomedinas era capaz de suprimir los niveles circulantes de GH en la rata. Estos resultados fueron corroborados por Ceda y cols. en 1985 que comunicaron que las somatomedinas inhiben la secreción basal y estimulada por GHRH en cultivos de células hipofisarias de adenomas humanos productores de

GH. Además de su efecto directo hipofisario, las somatomedinas inhiben la secreción de GH cuando se administran intracerebroventricularmente en ratas (Tannenbaum y cols., 1983) sugiriendo un efecto inhibitorio de la secreción de GHRH hipotalámico.

Se han identificado a nivel de las membranas plasmáticas de las células somatotropas hipofisarias receptores específicos para somatomedinas, lo que parece indicar que la adenohipófisis sea un órgano diana para esta familia de péptidos promotores del crecimiento (Goodyer y cols., 1984; Tresguerres, 1987).

A nivel de la propia hipófisis, la IGF-1 actúa inhibiendo directamente el mRNA de la GH en las células somatotropas (Devesa y cols., 1993).

#### Regulación de GHRH y SS mediante neurotransmisores:

Los neurotransmisores pueden influenciar directamente la secreción de GH, pero fundamentalmente lo hacen a través de la modulación del balance GHRH/SS.

Las vías de neurotransmisión involucradas en la secreción de GH se citan a continuación:

##### 1.7.1 $\alpha$ -Adrenérgica.

La deplección de catecolaminas con  $\alpha$ -metil-para-tirosina suprime la liberación de GH (Martín y cols., 1978) y este efecto revierte tras la administración de un agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, como la clonidina (Devesa y cols., 1990).

La secreción de GH inducida por hipoglucemia insulínica no es inhibida por bloqueantes  $\alpha$ 1-adrenérgicos (Prazosin) (Tatar y Vigas, 1984), lo que indicaría una mediación  $\alpha$ 2-adrenérgica del estímulo insulínico sobre la GH.

La clonidina, estimulante  $\alpha$ 2-adrenérgico-central, aumenta los niveles de GH (Lal y cols., 1975a, Bramnert y Hökfelt, 1987). La estimulación de la secreción de GH por la clonidina queda abolida con anticuerpos anti-GHRH (Miki y cols., 1984) y con pretratamiento con naloxona lo que indicaría una interacción clonidina-receptores opioides (Bramnert y Hökfelt, 1984). Parece ser que la clonidina actuaría por una vía independiente de la GHRH-érgica. Así lo sugieren datos de Dieguez y cols. (1987) quienes observaron que el pretratamiento con GHRH en humanos abolía una ulterior respuesta de GH a su hormona liberadora, sin embargo la capacidad de respuesta a la clonidina permanecía inalterable.

Estudios realizados en humanos por Devesa y cols. (1990) y en perros por Arce y cols. (1990), demuestran que la vía  $\alpha$ -adrenérgica actúa sobre el control de la GH, principalmente por la inhibición de la SS, que a su vez puede determinar una estimulación indirecta de la secreción de GHRH. Además el bloqueo  $\alpha$ 2-adrenérgico estimula la liberación de SS en el conejo (Minamitani y cols., 1989).

### 1.7.2 $\beta$ -adrenérgica

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos inhiben la secreción de GH (Perkins y cols., 1983) actuando directamente sobre la hipófisis en sus receptores o a través de la estimulación de la SS hipotalámica (Petrovic y cols., 1983).

De todo lo expuesto anteriormente, se deduce que el sistema adrenérgico juega dos papeles antagónicos sobre la secreción de GH en humanos: Uno facilitador mediado por los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos que actúan principalmente inhibiendo la liberación de SS y otro inhibidor dependiente de la actividad  $\beta$ -adrenérgica que produce un estímulo de la secreción de SS.

### 1.7.3 Vía dopaminérgica.

La dopamina, además de activar su propios receptores, posee actividad  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicas, o puede convertirse en noradrenalina en el tejido hipotalámico.

Muller y cols. (1968) demostraron que la administración intraventricular de dopamina disminuía los niveles de GH en la rata.

En el hombre, la administración de DA o de sus agonistas (L-Dopa, apomorfina, bromocriptina) produce una estimulación de la secreción de GH (Boyd y cols., 1970; Brown y cols., 1973; Lal y cols., 1975b; Wass, 1983) y aumenta la respuesta de GH al GHRH (Delitala y cols., 1987, Vance y cols., 1987). La infusión de DA disminuye la respuesta de GH a estímulos como la hipoglucemia insulínica y arginina (Woolf y cols., 1979; Bansal y cols., 1981).

Los bloqueantes dopaminérgicos (metoclopramida) son paradójicamente estimuladores de la secreción de GH probablemente por su acción vía serotonina o a través de estímulos colinérgicos o catecolaminérgicos o bloqueando los receptores presinápticos que aumentan la síntesis y liberación de DA en el S.N.C. (Cohen y cols., 1979).

Las células somatotropas poseen receptores para DA sugiriendo que esta catecolamina puede actuar directamente a nivel adenohipofisario. Además este neurotransmisor modula la secreción de GH estimulando la secreción de GHRH (Chihara y cols., 1986, Dieguez y cols., 1987) e inhibiendo la secreción de SS (Delitala y cols., 1987; Vance y cols., 1987).

Por tanto, en la regulación de GH, el papel de la DA sería básicamente modulador y dependiente del estatus funcional de las vías implicadas primariamente en ese control (particularmente la vía adrenérgica). Ello explicaría la dualidad de efectos (estimulantes o inhibitorios) atribuidos a este neurotransmisor (Dieguez y cols., 1988). En este sentido, el que exista actividad enzimática indicativa de síntesis de DA en neuronas GHRH puede significar la señal de liberación de este péptido para las neuronas SS (Lima y cols. 1990). La DA liberada conjuntamente con GHRH o tras un cierto retraso temporal podría estimular la secreción de SS directamente o a expensas del bloqueo de la transmisión adrenérgica inhibitoria (Devesa y cols., 1990) de estas neuronas y contribuir así a establecer la interacción entre las neuronas GHRH y SS que lleva al patrón de secreción pulsátil de GH (Lima y cols., 1990).

#### 1.7.4 Vía colinérgica

La vía colinérgica juega un importante papel sobre el control de la secreción de GH tanto en humanos como en animales de laboratorio (Muller, 1987).

Los bloqueantes de los receptores muscarínicos (atropina, pirenzepina o metescopolamina) inhiben la secreción de GH tras estímulos fisiológicos como por ejemplo el sueño (Mendelson y cols.,

1978) o farmacológicos (L-dopa, apomorfina, glucagón, encefalina, FK 33824, arginina, clonidina (Delitala y cols., 1983; Peñalva y cols., 1983; Casanueva y cols., 1984; Masara y cols., 1984; Casanueva y cols., 1986) y GHRH (Jordan y cols., 1986)). En cambio los bloqueantes muscarínicos solo inhiben parcialmente el estímulo de GH tras la hipoglucemia insulínica (Evans y cols., 1985; Dieguez y cols., 1988).

La administración de un estimulante colinérgico como la piridostigmina, inhibidor de la acetilcolinesterasa, potencia la secreción de GH basal y su respuesta al GHRH exógeno durante el día (ya que disminuye el tono somatostatinérgico) pero no durante la noche cuando presumiblemente el tono somatostatinérgico es bajo (Massara y cols., 1986a).

Otros neurotransmisores clásicos como la serotonina o el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) no parecen jugar un importante papel en la neuroregulación de la GH en humanos. Quizás la falta de especificidad de las drogas utilizadas en la manipulación de esta vía sea la responsable de la ausencia de unos resultados convincentes.

Devesa y cols. (1991) han demostrado que en realidad esta vía colinérgica no ejerce su acción directamente sobre los niveles de SS sino que el efecto está mediado por la activación de la vía  $\alpha$ 2-adrenérgica.

#### Regulación de GH mediante metabolitos y hormonas:

Además de la regulación de GH mediante neurotransmisores, su secreción puede estar modulada por los niveles circulantes de algunos metabolitos. De esta manera, las variaciones plasmáticas de glucosa, ácidos grasos y determinados aminoácidos van a ser condicionantes importantes en el funcionalismo somatotropo. El sistema endocrino, modula la secreción de GH a través de los niveles circulantes de las

hormonas tiroideas, glucocorticoides y esteroides sexuales fundamentalmente.

La falta de hormona tiroidea, no se traduce solamente en afectación hipofisaria con la consiguiente disminución de la capacidad de producir GH por la célula somatotropa, sino que también disminuye la disponibilidad de GHRH endógeno, hecho observado por Devesa y cols. (1989).

El marcado retraso de crecimiento que muestran los niños crónicamente tratados con glucocorticoides y las disminuidas respuestas de GH a estímulos clásicos en adultos con hipercortisolismo se relacionan con un efecto inhibitorio de estas hormonas sobre la secreción somatotropa. Sin embargo, experimentos "in vitro" han mostrado que los glucocorticoides estimulan la secreción de GH y además potencian la expresión del gen de esta hormona y del que codifica para el receptor de GHRH. Por tanto estos esteroides a nivel hipotalámico jugarían un papel más bien estimulador que inhibitorio.

Estos datos han sido corroborados recientemente también a nivel clínico en humanos por Casanueva y cols. (1990) pero el mecanismo no es bien conocido. Sin embargo el efecto inhibitorio a largo plazo sigue siendo preponderante y se debe probablemente a un aumento de la SS hipotalámica mediado por la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Lima y cols., 1992).

El condicionamiento masculino o femenino del tipo de patrón de secreción espontánea de GH, parece establecerse en el periodo fetal. Estas diferencias sexuales en la secreción espontánea de GH dependerían del ritmo de secreción de SS. En el varón, la mayor disponibilidad de GHRH y el que la testosterona potencie la síntesis hipofisaria de GH condicionaría la liberación de la hormona en pulsos de mayor amplitud (Jansson y cols., 1985).

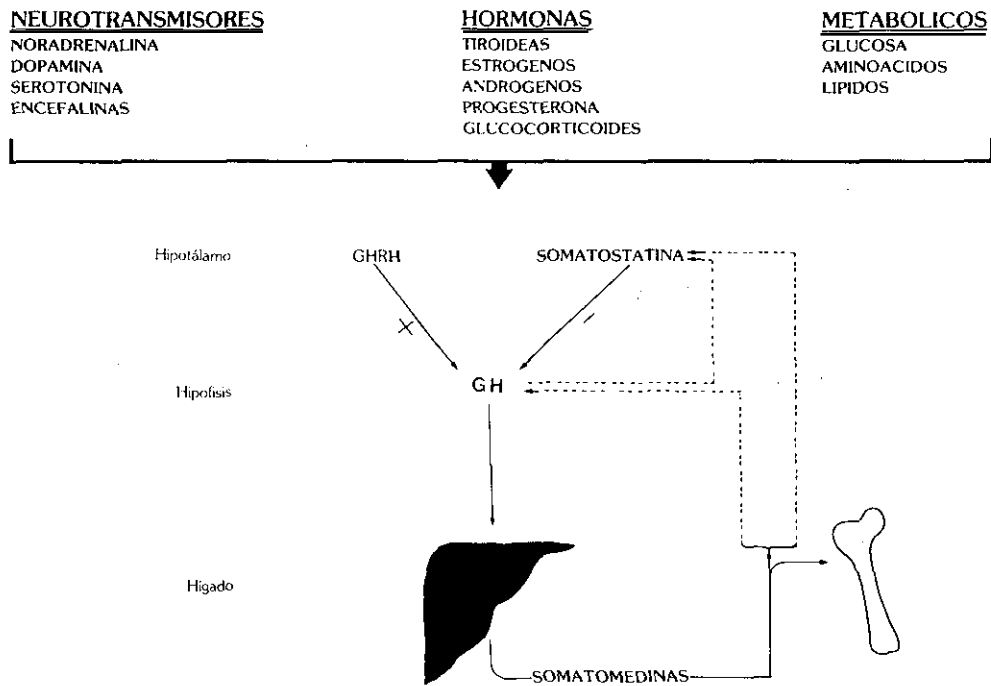


Figura 4.- Neuroregulación de la secreción de GH.



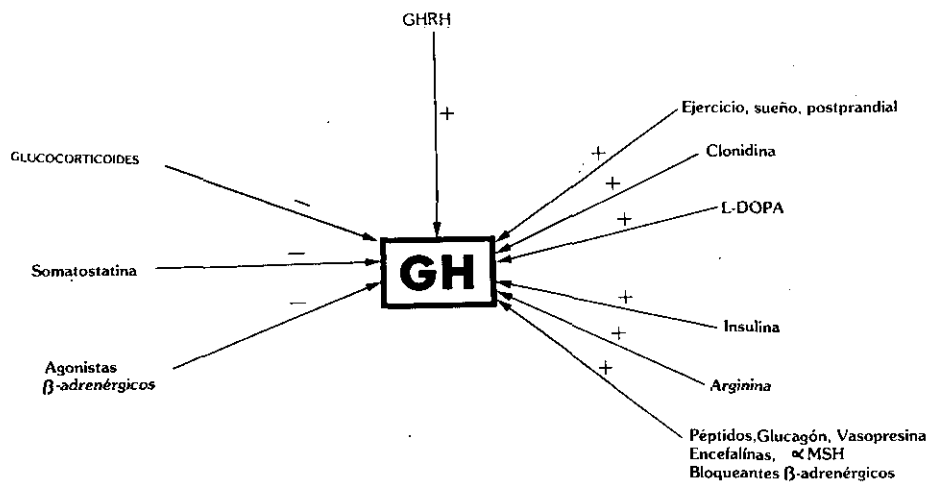


Figura 5.- Regulación de la secreción de GH.

### 1.8. REGULACION DE LA SECRECION DE GONADOTROPINAS

Factores ambientales externos (temperatura, periodo de luz, etc...) e internos (peso corporal, estado metabólico, etc...) influyen sobre la secreción de gonadotropinas, induciendo modificaciones sobre el S.N.C. (Everett, 1988). La existencia de un sistema circulatorio portal que comunica el hipotálamo con la hipófisis (McCann y Dhariwal, 1966), junto al descubrimiento de que en el primero se sintetiza un decapeptido (GnRH o LHRH) que posteriormente es liberado al sistema portal hipofisario, estimulando la secreción de gonadotropinas a dicho nivel (Fink, 1979), explican el mecanismo mediante el cual el S.N.C. modula este último fenómeno.

Por otro lado, los esteroides sexuales producidos en la gónada son capaces de manifestar un efecto positivo o negativo sobre la liberación hipofisaria de gonadotropinas, dependiendo de sus concentraciones circulantes y del tiempo de exposición de la glándula a estas últimas, y actuando tanto a nivel hipotalámico como directamente sobre la adenohipófisis (Karsch, 1987). Recientemente se han caracterizado factores gonadales no esteroideos (inhibina y activinas) capaces de modular específicamente la secreción de FSH a este último nivel (Ying, 1988) (figura 6).

Es importante destacar la cualidad pulsátil en la liberación de gonadotropinas en mamíferos, característica que, aunque podría ser inherente a la gonadotropa (Mortimer y cols., 1974), está modulada en su frecuencia y amplitud por las correspondientes a los pulsos de LHRH que actúan sobre la hipófisis, aunque no todos ellos se acompañan de una descarga de gonadotropinas (Levine y cols., 1982). Por lo tanto, la frecuencia en los pulsos de secreción de estas últimas reflejará la mínima frecuencia en los de LHRH. La pulsatilidad en la liberación

hipotalámica de LHRH es característica de la actividad eléctrica neuronal (El denominado por Knobil "generador hipotalámico de pulsos"(Knobil, 1994)).

En el S.N.C., sobre las neuronas liberadoras de LHRH ejercen impulsos inhibidores el sistema dopaminérgico y el de los opioides, mientras que el noradrenérgico estimula la actividad eléctrica a este nivel (Ramirez y cols., 1984). Aquellos factores, ambientales o endocrinos, implicados en la regulación de la secreción hipofisaria de gonadotropinas, podrían ejercer su efecto alterando la actividad neuronal en estos sistemas y por lo tanto, modificando de forma indirecta la frecuencia y/o amplitud de los pulsos hipotalámicos de LHRH.

En adelante, se analizará fundamentalmente la regulación de la misma en la rata hembra, en la cual durante la mayor parte de la vida reproductora existe una secreción basal de gonadotropinas, que es sustituida puntualmente por descargas masivas en su liberación hipofisaria relacionadas con el fenómeno de la ovulación.

#### 1.8.1 El pico ovulatorio de LH y FSH.

La rata, como gran parte de los mamíferos, incluida la mujer, es un ovulador espontáneo, que presenta un ciclo estral de 4-5 días, caracterizado, por ausencia de menstruación, y en el que la ovulación se presenta durante la denominada fase de estró (Freeman, 1988).

El aumento en las concentraciones circulantes de estradiol desencadena la liberación al sistema portal hipofisario de concentraciones altas de LHRH (Fink, 1979), procedente fundamentalmente de neuronas localizadas en el área preóptica medial y núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Silverman, 1988).

Sin embargo, las neuronas productoras de LHRH carecen de receptores para el estradiol (Shivers, 1983). Se han descrito tres posibles mecanismos indirectos mediante los cuales este último podría estimular la liberación hipotalámica de LHRH (Fink, 1988, Evans y cols., 1994):

- activación del sistema noradrenérgico, o inhibición del sistema opioide, que actúan sobre las neuronas productoras de LHRH.

- inhibición del sistema opioide que a su vez frena la actividad noradrenérgica, por lo que al aumentar esta última se estimularía el sistema LHRHérgico.

- desactivación del sistema opioide y/o del sistema dopaminérgico, que inhiben la liberación de LHRH a nivel de los axones localizados en la eminencia media. En este sentido, se ha descrito la existencia en la oveja de conexiones sinápticas entre terminales dopaminérgicas y los axones de neuronas productoras de LHRH a dicho nivel (Kuljis y Advis, 1989).

En las modificaciones de la actividad LHRHérgica inducidas por niveles altos de estradiol en suero no se puede descartar la participación de otros circuitos neuronales como el serotoninérgico, ni de otros neuropéptidos como el GABA, la sustancia P, NPY, galanina etc..., aunque parezca menos importante (Kalra, 1993).

La secreción fisiológicamente pulsátil de LHRH a nivel hipotalámico es capaz de desencadenar en las células gonadotropas de la hipófisis la liberación de LH y FSH. Sin embargo, la magnitud de la respuesta es proporcional al ambiente estrogénico (Tresguerres, 1989). Posteriormente, cuando se presenta el pico preovulatorio en la secreción de gonadotropinas, este efecto se asocia a una inducción positiva homóloga (up-regulation) en el número de receptores hipofisarios para LHRH, debida al aumento previo y gradual de la

liberación de esta última (Peiper y cols., 1984), que acentúa la ya elevada sensibilidad de la hipófisis a la acción de la LHRH.

La finalización del pico preovulatorio de LH y FSH se debe fundamentalmente a un descenso de la concentración de LHRH en el sistema portal hipofisario (Sherwood y cols., 1980) y, en menor grado, a una disminución del contenido de gonadotropinas y de la sensibilidad a dicha hormona hipotalámica en hipófisis (Blake, 1976, Tresguerres 1989).

En resumen, el pico preovulatorio en los niveles séricos de gonadotropinas es consecuencia de un aumento en la liberación de LHRH, inducido por concentraciones altas de estradiol en suero, y de un incremento en la sensibilidad hipofisaria a dicha hormona hipotalámica (Kalra, 1986). Este último efecto es debido a la estimulación en la síntesis de gonadotropinas ejercida por el estradiol a nivel hipofisario, así como a la inducción positiva del LHRH sobre el número de sus receptores específicos al mismo nivel. Por lo tanto, "la presencia de un pico preovulatorio en las concentraciones circulantes de gonadotropinas depende fundamentalmente de la capacidad del ovario para segregar estradiol siguiendo un patrón cíclico".

### 1.8.2 Liberación basal de gonadotropinas.

Durante la mayor parte del ciclo estral en la rata, las concentraciones séricas de gonadotropinas presentan un valor muy inferior al observado durante el periodo preovulatorio, debido al mecanismo de regulación negativa ejercido por los esteroides sexuales (Martin, 1984) y a la inhibina en el caso de la FSH. Mientras que esta última hormona ovárica actúa únicamente a nivel hipofisario, el mecanismo de regulación mencionado se ejerce también sobre el

hipotálamo (Karsch, 1987), ya que la ovariectomía aumenta la frecuencia y la amplitud en los pulsos de LHRH liberados a la circulación portal hipofisaria (Ellis y cols., 1983).

Durante la fase luteal, el aumento en los niveles circulantes de progesterona disminuye tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de LH, probablemente debido al mecanismo de regulación negativa que este esteroide ejerce sobre el generador central de pulsatilidad en la liberación hipotalámica de LHRH (Filicori y cols., 1984). En este sentido cabe destacar la superposición con dichos pulsos, fundamentalmente durante el último periodo de esta fase, de otros más pequeños (minipulsos), que podrían corresponder a ligeras descargas de LHRH capaces de ejercer una inducción positiva homóloga sobre el número de receptores en hipófisis, que contribuiría al aumento posterior de la sensibilidad a la LHRH observado durante el periodo preovulatorio a este nivel (Lincoln, 1986).

Los esteroides sexuales parecen ejercer la regulación negativa a nivel hipotalámico modificando la actividad neuronal en el núcleo arcuato y el núcleo ventromedial, ya que estas son las estructuras implicadas en la liberación de LHRH responsable de la secreción basal de gonadotropinas (Blake y Sawyer, 1974). A diferencia de lo observado durante el periodo preovulatorio (Evans, 1994), durante el resto del ciclo estral, además del sistema opioide, también el sistema noradrenérgico inhibe la liberación tónica de LHRH (Fink, 1988), por lo que dicho mecanismo de regulación podría estar mediado por la estimulación de cualquiera de los dos sistemas neuronales mencionados, o de ambos.

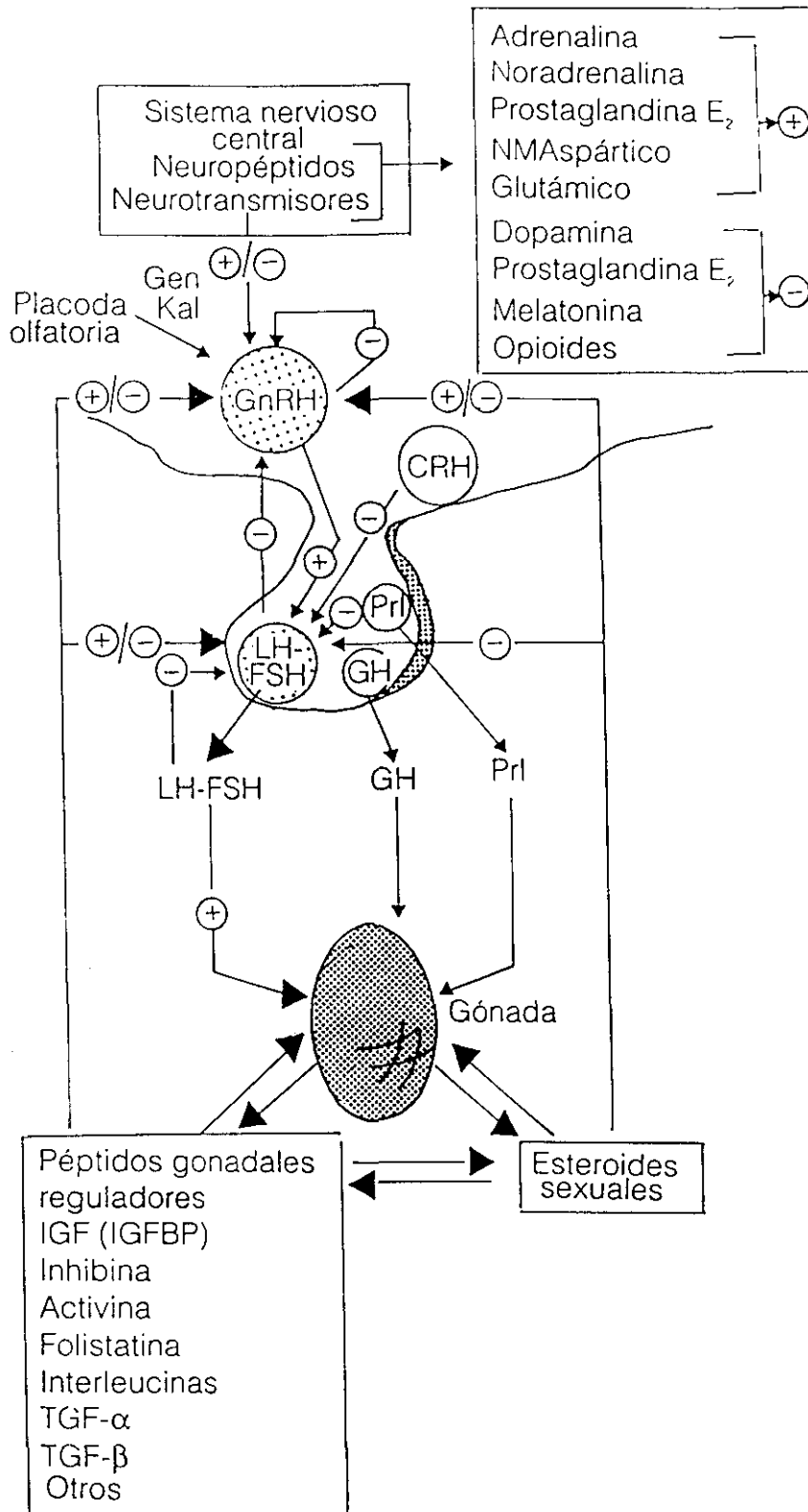


Figura 6.- Regulación de la secreción de gonadotropinas.

## 1.9. REGULACION DE LA SECRECION DE PROLACTINA

La liberación hipofisaria de PRL está controlada fundamentalmente por factores hipotalámicos que pueden presentar actividad estimuladora o inhibidora de la misma, así como por factores gonadales que modulan el efecto de los anteriores.

### 1.9.1 Liberación pulsátil de PRL.

La célula lactotropa muestra una capacidad inherente para la secreción pulsátil de PRL (Shin y Reifel, 1988). Sin embargo, la amplitud y frecuencia de dicha pulsatilidad están reguladas por factores hipotalámicos y gonadales. Existen dos tipos de pulsos en la liberación hipofisaria de PRL: pulsos de gran masa y pulsos de pequeña masa (López y cols., 1989) (figura 7).

La dopamina inhibe tónicamente la secreción de PRL (Weiner y Ganong, 1978; para revisión ver Ben-Jonatan, 1985), de forma que la disminución transitoria de sus niveles en el sistema portal hipofisario aumenta considerablemente dicha secreción, siendo el principal factor causal de la aparición de pulsos de gran masa (Martinez de la Escalera y Weiner, 1988a), aunque no se puede excluir la contribución a este fenómeno de la acción de alguno de los factores estimuladores de la liberación hipofisaria de PRL, que se describirán a continuación. Recientemente se ha descrito la existencia de otros factores inhibidores de la secreción de esta hormona:

-La proteína hipotalámica precursora de la LHRH, contiene esta hormona y un péptido asociado de 56 aminoácidos o GAP (Gonadotropin hormone-releasing hormone Associated Peptide) (Fink, 1985),



existiendo en el hipotálamo una enzima que hidroliza este precursor en LHRH y GAP (Palen y cols., 1987).

Estudios inmunocitoquímicos muestran la coexistencia de estos dos péptidos dentro de los mismos gránulos de secreción, en las terminales en eminencia media de las neuronas productoras de LHRH (Philips y cols., 1985), y se ha demostrado su liberación simultánea al sistema porta hipofisario (Clarke y cols., 1987). La administración del GAP "in vivo" reduce la secreción hipofisaria de PRL en diversos modelos experimentales (Yu y cols., 1988), pero todavía no se conoce bien su participación en la regulación de la misma en situaciones fisiológicas. De hecho, la asociación temporal de un 60-80% entre los pulsos de LH y los de PRL, en animales ovariectomizados, parece excluir un papel fisiológico del GAP en la modulación de la liberación pulsátil de PRL, aunque podría ejercerlo en presencia de factores gonadales (Pohl y cols., 1988).

-El GABA (Gamma Amino-Butiric Acid) es un neurotransmisor presente en el hipotálamo (Cattabeni y cols., 1978) y liberado en eminencia media (Vincent y cols., 1982), existiendo receptores específicos para él en la adenohipófisis (Grandison y Guidotti, 1979). Inhibe la secreción hipofisaria de PRL directamente a este nivel (Schally y cols., 1977). En este sentido su papel en condiciones fisiológicas no está claro, ya que, aunque la administración de antagonistas induce hiperprolactinemia (Debeljuk y cols., 1980), la concentración de GABA en el sistema portal hipofisario no es superior a la observada en el torrente circulatorio general (Mulchaney y Neill, 1982).

-El ANP (Atrial Natriuretic Polipeptide), descinde la liberación de PRL en humanos (Ohashi y cols., 1987), efecto que no parece tener significación fisiológica al necesitar dosis farmacológicas para manifestarse.

La génesis de pulsos de pequeña masa en la liberación de PRL podría ser debida a la actividad espontánea de la célula lactotropa (Shin y Reifel, 1988), y/o al efecto estimulador que determinados factores han demostrado ejercer sobre dicha liberación. Dentro de estos factores estimuladores se encuentran:

-La oxitocina (OT): la presencia de concentraciones altas en la circulación portal hipofisaria (Gibbs, 1984), y de receptores específicos para la misma en adenohipófisis (Antoni, 1986), así como su capacidad para aumentar la secreción de PRL actuando directamente a este nivel (Samsom y cols., 1986), muestran la posibilidad de que esta hormona actúe como PRF (Prolactin Releasing Factor) en condiciones fisiológicas. La existencia en la hipófisis de flujo vascular desde el lóbulo posterior al anterior, mediante los vasos portales cortos, y la elevada concentración de oxitocina en los vasos portales largos, que comunican el hipotálamo con la adenohipófisis (Samson y cols., 1986), avalan esta hipótesis, ya que la población lactotropa se localiza fundamentalmente en las zonas caudal y rostral del lóbulo anterior, áreas que están irrigadas respectivamente por los vasos portales cortos y largos (Sasaki y Iwana, 1988). Sin embargo, la administración de un antagonista en situaciones fisiológicas y experimentales no siempre descende los niveles circulantes de PRL (Johnston y Negro-Vilar, 1988), sugiriendo que la secreción de esta hormona está regulada de forma diferente dependiendo del estímulo que la induce, y que existe en condiciones fisiológicas más de un mecanismo de control implicado en dicha regulación.

-El VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) es capaz de estimular la liberación hipofisaria de PRL actuando directamente sobre las células lactotropas (Enjalbert y cols., 1980). Puede actuar de forma autocrina o

paracrina sobre dichas células, ya que es sintetizado en la hipófisis (Arnaout y cols., 1986), de forma que su efecto podría estar implicado en los pulsos de gran masa observados en ausencia del tono inhibitor dopaminérgico (Hagen y cols., 1986). Además, parece jugar un papel en la regulación de la secreción hipofisaria de PRL, en algunas condiciones fisiológicas y farmacológicas en las que la OT no lo hace (Johnston y Negro-Vilar, 1988). Sin embargo, la administración de un antisuero anti-VIP, aunque disminuye la frecuencia y amplitud de los pulsos de PRL al desaparecer la inhibición dopaminérgica, sin modificarlos en presencia de esta última, no llega a bloquear la aparición de pulsos de baja masa (López y cols., 1989), lo que sugiere que este péptido modula la liberación hipofisaria de PRL en condiciones fisiológicas, pero existen otros factores implicados en la regulación de la misma, asociados fundamentalmente con la aparición de este último tipo de pulsos. Existen fibras inmunoreactivas para el VIP en el hipotálamo y eminencia media (Sims y cols., 1980), y la administración central de este péptido aumenta la secreción de OT y, en consecuencia, la de PRL, efecto que es inhibido por el tratamiento concomitante con un antisuero anti-OT (Samsom y cols., 1989), lo que indicaría un efecto estimulador del VIP sobre la liberación hipofisaria de PRL, mediado por un aumento en la liberación de OT.

-PRF procedente de la hipófisis posterior, ya que extractos de este tejido estimulan, de forma específica y dosis-dependiente, la secreción hipofisaria de PRL, efecto que se atenúa muy notablemente cuando se utilizan extractos de eminencia media, por lo que este PRF no parece ser la OT (Hyde y cols., 1987). De hecho, estimula "in vitro" la secreción hipofisaria de PRL en presencia de concentraciones fisiológicas de dopamina, y es distinto de la OT, angiotensina II o TRH, ya que es resistente a la inactivación por tripsina y ácido per fórmico, pero

hidrolizable por quimotripsina o prolina-endopeptidasa (Hyde y Ben-Jonathan, 1988).

Aunque la TRH presenta una potente acción estimuladora de la liberación hipofisaria de PRL, contrarrestando la inhibición dopaminérgica de la misma al activar la movilización intracelular de  $Ca^{2+}$  (Martinez de la Escalera y Weiner, 1988b), este efecto no parece jugar un papel fisiológico (Debeljuck, 1988). De igual forma, se ha descrito la existencia de otros secretagogos de PRL, sin que en la actualidad se conozca su posible participación en el control fisiológico de la liberación hipofisaria de esta hormona, como es el caso de la sustancia P, arginina-vasopresina, etc... (Debeljuk, 1988).

Por último la dopamina disminuye la frecuencia de los pulsos de PRL (López y cols., 1989), y en el caso de los de pequeña masa, también la disminuye la sección del tallo hipofisario (Smith y cols., 1986), lo que parece indicar que factores de origen hipotalámico estarían implicados en la génesis de estos picos.

### 1.9.2 El pico preovulatorio de PRL.

La liberación hipofisaria de PRL depende fundamentalmente del contenido de esta hormona a dicho nivel, y de los factores estimuladores e inhibidores de su secreción que actúan sobre la célula lactotropa en un momento determinado. En la rata, durante el periodo preovulatorio se observa un aumento muy marcado en los niveles séricos de PRL. Esta elevación es bifásica con un pico inicial seguido de una fase de meseta (Ronnekleiv y Kelly, 1988). Los factores implicados en su regulación difieren según el estadio considerado:

-Antes de la elevación preovulatoria de PRL: aumento del contenido hipofisario de esta hormona, probablemente debido a la acción de concentraciones elevadas de estradiol (Carrillo y cols., 1987), concomitante con un mantenimiento de la inhibición dopaminérgica (Arbogast y Ben-Jonathan, 1988).

Durante el pico preovulatorio de PRL: descenso del contenido hipofisario de esta hormona sin disminución de la sensibilidad de la célula lactotropa a la dopamina (Arbogast y Ben-Jonathan, 1988). En la eminencia media no existen modificaciones en la actividad tirosina-hidroxilasa ni en el metabolismo de la DA, manteniéndose la inhibición por esta última de la liberación hipofisaria de PRL (Arbogast y Ben-Jonathan, 1988). No se puede excluir una disminución transitoria en dicha inhibición (Martinez de la Escalera y cols., 1988b), y es muy probable la actuación simultánea de un PRF. En esta fase, aumenta la concentración de OT en la circulación portal hipofisaria (Sarkar y Gibb, 1984), y la administración de un antagonista de esta última o la lobectomía hipofisaria posterior (Murai y cols., 1989), inhiben la elevación de los niveles séricos de PRL (Johnston y Negro-Vilar, 1988), lo que sugiere un papel fisiológico de la OT y/o un PRF procedente de la neurohipófisis, como factor estimulador de la liberación de PRL por la célula lactotropa, durante este periodo. El mismo papel parece ejercer el VIP, ya que la administración de un antisuero anti-VIP en esta fase, también interfiere con la aparición del pico preovulatorio de PRL (Murai y cols., 1989).

Durante la fase de meseta en la secreción de PRL: descenso en el contenido hipofisario de esta hormona, más acentuado que en el caso anterior, y disminución de la inhibición dopaminérgica sobre la célula lactotropa (Arbogast y Ben-Jonathan, 1988). En eminencia media, existe

un descenso de la actividad tirosina-hidroxilasa y del metabolismo de la dopamina. No se puede excluir la estimulación de la secreción de PRL por un PRF, que durante este periodo no sería ni el VIP, ni la OT (Murai y cols., 1989).

-Una vez finalizada la elevación preovulatoria de PRL: elevación del contenido hipofisario de esta hormona y del tono inhibitor dopaminérgico sobre la hipófisis (Arbogast y Ben-Jonathan, 1988). En eminencia media, se observa un aumento en el metabolismo de la dopamina, asociado a una elevación en la concentración plasmática de esta última en el sistema portal hipofisario, que se mantiene durante la fase de estro (Ben-Jonathan y cols., 1977).

### 1.9.3 Control paracrino de la liberación hipofisaria de PRL.

La LHRH ejerce una acción estimuladora de la secreción de PRL (Braund y cols, 1984, Yen y cols., 1980) directamente a nivel hipofisario (Denef y Andries, 1983). Dado que únicamente existen receptores específicos para la primera en las células gonadotropas (Childs y cols., 1983), esta acción estaría mediada por un mecanismo paracrino en estas últimas y las células lactotropas.

La angiotensina II se produce en la adenohipófisis, fundamentalmente en las células gonadotropas (Dechepper y cols., 1986), y actúa sobre la población lactotropa aumentando la liberación de PRL, mediante interacción con receptores específicos a este nivel (Aguilera y cols., 1982). Dado que el contenido hipotalámico de angiotensina II es muy bajo (Ganten y cols, 1983), y su concentración en el sistema portal hipofisario no difiere de la observada en la circulación periférica (Plotsky, 1986), la LHRH podría activar la síntesis de este factor en la población gonadotropa, que a su vez estimularía la

liberación de PRL por la célula lactotropa, actuando de forma paracrina.

No se ha descrito la presencia en el sistema portal hipofisario de Acetilcolina (ACh), pero si la existencia de receptores muscarínicos en la adenohipófisis de rata (Schaeffer y Hsueh, 1980). Estudios realizados "in vitro", utilizando agregados de células hipofisarias en cultivo, demuestran la producción y secreción de ACh en las mismas, fundamentalmente en la población corticotropa, pero no en la gonadotropa (Carmeliet y Deneef, 1988), y la acción inhibidora de este neurotransmisor sobre la liberación de PRL por la célula lactotropa (Rudnick y Dannies, 1981). Por lo tanto, la estimulación de la población corticotropa aumentaría la secreción de ACh a este nivel, disminuyendo la liberación hipofisaria de PRL por el efecto paracrino que la primera ejerce sobre la célula lactotropa.

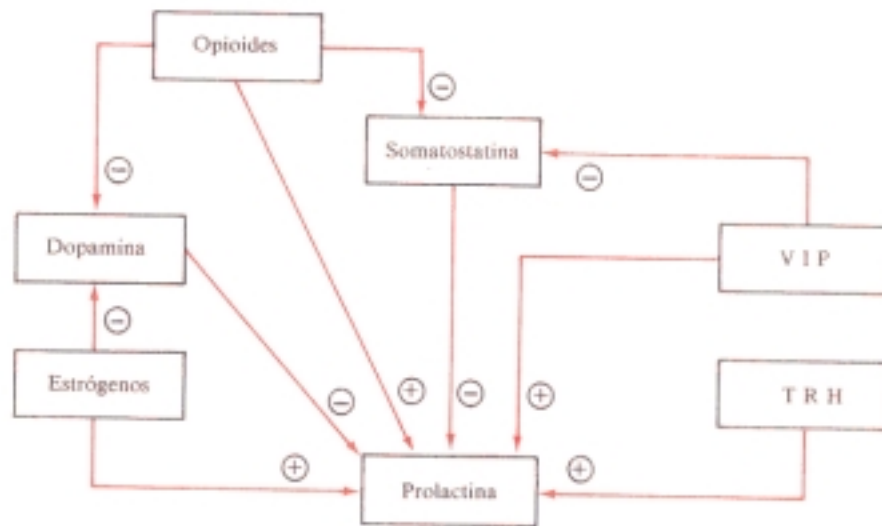


Figura 7.- Regulación de la secreción de PRL.



## **1.10 ESTRUCTURA FUNCIONAL DE LA GLANDULA PAROTIDA EN LA RATA.**

La glándula parótida se encuentra adherida lateralmente a la base de la oreja, recorre el borde caudal de la mandíbula hacia la región anterior de la laringe extendiéndose caudalmente hacia la clavícula. Rostralmente está en contacto con la glándula lacrimal, y ventralmente cubierta por las otras glándulas salivales.

Está formada por tres lóbulos. De cada lobulo emerge un conducto excretor, fundiéndose los tres en un conducto excretor único que es el conducto principal o parotideo. Este conducto camina rostralmente junto con el nervio bucal, penetrando ambos en la cavidad bucal hasta el borde anterior del músculo masetero.

Embriológicamente, la parótida tiene un origen común con la hipófisis, es decir, ambas derivan del ectodermo mientras las demás glándulas salivales derivan del endodermo.

Microscópicamente la glándula parótida muestra un sistema excretorio muy bien diferenciado. La serosa de la glándula está subdividida en numerosos lóbulos separados por septos de tejido conectivo.

Las glándulas salivales de la rata y los nódulos linfoides de la región cervical anterior están cubiertos por una extensa capa de tejido adiposo que se extiende desde la mandíbula hasta la región axilar.

En la vecindad de las glándulas salivales se han descubierto unos lóbulos de grasa oscura que durante la disección pueden ser confundidos con nódulos linfoides o glándulas.

En la glándula parótida se han detectado algunos péptidos y factores de crecimiento como SS, VIP, PRL, EGF (Epitelial Growth Factor) y NGF (Nerve Growth Factor) (Cohen, 1960).

### 1.11 DIFERENCIACION CELULAR.

Uno de los campos de investigación más importante dentro de la Biología moderna está ocupado por el estudio de los mecanismos de la diferenciación celular.

Desde hace aproximadamente 2 décadas, se están publicando numerosos estudios sobre diferentes estirpes celulares tanto normales como patológicas que indican claramente que la diferenciación celular depende del medio en que se desarrollan los elementos, así como de la acción de una serie de agentes inductores externos a las células (Patterson 1977, McKeehan, 1982).

La estructura química de las sustancias que pueden actuar sobre la diferenciación celular es muy diversa (McKeehan 1982), pueden ser:

1.- FACTORES FISICOS: Por contacto celular activando sistemas situados en relación con la membrana celular (por ejemplo la activación del sistema inositol-trifosfato).

2.- FACTORES IONICOS: Bien porque actuen sobre la membrana celular o porque se intercambien a través de uniones comunicantes. Según Breckenridge y cols. (1987) el litio inhibe la morfogénesis pero no la diferenciación neural en el *Xenopus Laevis*. Estudios llevados a cabo en 1989 por Reichelt y cols., demuestran que el potasio actúa como iniciación en la diferenciación de neuronas retinianas.

3.- OTROS FACTORES: Factores de crecimiento, factores nutricionales, hormonas. Estos factores por su variedad y especificidad son las sustancias que inducen directamente modificaciones celulares, generalmente muy específicas y pueden ejercer importantes efectos sobre la diferenciación celular. Por ello el estudio de su actividad sería muy interesante realizarlo en cultivos celulares, en los cuales se podría controlar con alta fiabilidad su mecanismo de acción (Muggleton-Harris

y Higbee, 1987). Dentro de estas sustancias, cabe destacar la actividad de todo tipo de nutrientes celulares (McKeehan, 1982) y factores de crecimiento: NGF, BDNF (Brain Derived Nerve Growth Factor), CNTF, IGF-1, TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) y EGF.

Los primeros trabajos en los que se describe un factor promotor del crecimiento neuronal fueron publicados por Levy-Montalcini y Hamburger en 1951. En 1960, Cohen muestra por primera vez que la parótida es muy rica en este tipo de factor de crecimiento.

En 1962 se describe el EGF, polipéptido de peso molecular 6.100, descubierto en la glándula salival de los muridos que inyectado a animales recién nacidos precipita la salida de los dientes y la apertura palpebral acelerando además la proliferación epitelial.

Algunos de los estudios sobre la acción de los factores de crecimiento han permitido demostrar que las acciones que ejercen estas sustancias sobre las células, se deben a la activación de determinados genes de la familia de los glucocorticoides (Milbrandt 1988).

La diferenciación celular, por tanto, está regulada por una expresión específica de genes que va a ser la vía de control de un factor de transcripción, un ejemplo es el Pit-1 (Nelson y cols., 1988) o GHF-1 (Bodner y cols., 1988) que regula la expresión del gen de GH y además controla también su gen promotor.

Cuando este factor de transcripción se descubrió, se aceptó que el Pit-1 promovía no solo el gen de la GH sino también la expresión del gen de PRL, aunque recientemente se ha propuesto la existencia de un factor de transcripción diferente que promueve la expresión del gen de PRL (Castrillo y cols., 1989).

La conversión de células de GH a células de PRL mostrada por Kinji y cols. (1991), puede indicar la existencia de un sistema de expresión diferente del gen de PRL.

Las señales extracelulares que intervienen en la diferenciación celular son transmitidas por factores de transcripción al tejido específico, pero aun así, como se transmiten estas señales extracelulares a los factores de transcripción aun no está bien aclarado.

Sobre la inducción de la diferenciación celular mediante factores extracelulares (Kinji y cols., 1991) se han utilizado sistemas de estudio como la línea celular MET/S para estudiar los mecanismos de la diferenciación celular "in vitro".

El efecto de esta amplia variedad de factores sobre la diferenciación celular, se ha demostrado no solo en tejidos embrionarios, sino también en tejidos adultos, si bien, en estos últimos la capacidad de transformación morfofuncional es menor y tarda más tiempo en realizarse. Este hecho ya fue sugerido por Alvarez-Buylla en 1963 y demostrado por Potter y cols. en 1986.

**2.ANTECEDENTES  
Y  
OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

Es evidente que la hipofisectomía total condiciona la aparición de una serie de problemas endocrinológicos que se producen como consecuencia de la ausencia de secreción hipofisaria.

La atrofia de los tejidos diana de las hormonas hipofisarias (suprarrenales, tiroides, ovarios/testículos) implica la necesidad de un tratamiento sustitutivo que en algunas ocasiones no es suficiente para reinstaurar una vida normal al individuo que ha sido sometido a hipofisectomía. La ausencia de tratamiento sustitutivo conduce a la muerte del individuo hipofisectomizado en un plazo generalmente corto.

Este hecho es constatable desde el punto de vista experimental, y es conocido desde hace tiempo que los perros hipofisectomizados sin tratamiento sustitutivo raramente son capaces de sobrevivir algunas semanas tras la hipofisectomía (Houssay, 1936).

Ya en 1963, Alvarez-Buylla y E.R. Alvarez-Buylla demostraron que la sustitución de la hipófisis en el perro por un fragmento de glándula parótida era capaz de reinstaurar en poco tiempo algunas de las funciones hipofisarias. Si en vez de parótida se transplantaba músculo o grasa, este efecto no se producía.

La capacidad de la glándula parótida transplantada en la silla turca, en el lugar que ocupaba la hipófisis, de sustituir en parte las funciones de esta última, fue comprobada inicialmente por los mismos autores que observaron el mayor tiempo de supervivencia de los perros transplantados con glándula parótida respecto a los transplantados con músculo (Alvarez-Buylla y cols., 1970a).

Estos autores evaluaron también la función adrenocortical de estos animales mediante la determinación de 17-OHcorticosteroides en plasma (Alvarez-Buylla y E.R. Alvarez-Buylla, 1970b) comprobando datos previos en los que dicha función fue estimada por métodos indirectos, bien sea estimulando la eosinopenia inducida por ACTH (Alvarez-Buylla y E.R. Alvarez-Buylla, 1964) o mediante la determinación de la excreción urinaria de 17-cetosteroides antes y después de un tratamiento con metopirona (SV 4885) (Alvarez-Buylla y E.R. Alvarez-Buylla, 1967). Estos estudios fueron confirmados más tarde midiendo el cortisol plasmático por CPB (Alvarez-Buylla y Tsutsumi, 1979).

Se evaluó asimismo la función gonadal de los perros hipofisectomizados con transplante de glándula parótida en la silla turca, observandose una normalización casi total de los ciclos estrales de la hembra y de la producción de espermatozoides en el macho (Alvarez-Buylla y cols., 1973). En este mismo estudio se describió una disminución en los niveles plasmáticos de cortisol que revierte con el transplante.

Estos animales transplantados con glándula parótida, mostraban también un mayor grado de función tiroidea, evaluada por captación de  $^{131}\text{I}$ , respecto a los simplemente hipofisectomizados (Alvarez-Buylla y cols., 1970c). Cuando la operación se realizaba en perros jóvenes, se observaba una ausencia de crecimiento, indicativa de un déficit de GH, y si estos animales se cruzaban, se obtenían camadas normales, mientras que las madres operadas no eran capaces de amamantar a las crías, lo cual sugería un fallo también a nivel de la PRL.

El mecanismo por el cual el trasplante de glándula parótida compensa las deficiencias hormonales producidas por la hipofisectomía, no queda bien aclarado por Alvarez-Buylla, pero este autor si sugiere que las células de la glándula parotidea se desdiferencian y que por la influencia de hormonas hipotalámicas adquieren las propiedades de las células hipofisarias primitivas. Otra posibilidad, sugiere, es que el fragmento de parótida contenga un factor que promueva el crecimiento y la diferenciación del tejido hipotalámico y que sea este efecto el que determine la restitución parcial de la función hipofisaria (Alvarez-Buylla y E.R. Alvarez-Buylla, 1963).

Los primeros trabajos en los que se describe la existencia de un factor de crecimiento neuronal fueron publicados en 1951 por Levy-Montalcini y Hamburger. En 1960, Cohen demuestra que la glándula salival es muy rica en este factor de crecimiento. En 1962 se describe el EGF que también contiene la glándula parótida y que acelera la proliferación epitelial.

Aunque la primera referencia publicada por Alvarez-Buylla relacionando el trasplante de glándula parótida y el factor de crecimiento contenido en esta y que podría promover el crecimiento y la diferenciación hipotalámica data de 1963, solo recientemente los neurocientíficos se han interesado por la relevancia de este factor promotor del crecimiento neuronal, en la diferenciación y proliferación neuronales, y han aplicado estos conocimientos a la regeneración del S.N.C.



Desde los trabajos de Patterson en 1977, se sabe que los condicionantes ambientales son críticos a la hora de la diferenciación celular. En el caso de las células del sistema nervioso autónomo, dependiendo del lugar del organismo en el que se desarrollan, o lo que es lo mismo, del microambiente hormonal, pueden dar lugar a neurotransmisores distintos o incluso a morfologías diferentes.

Furshpan y cols. (1986), cultivan neuronas neonatales simpáticas con miocitos cardíacos, y observan que las primeras son capaces de cambiar sus características de neurotransmisión pasando de ser adrenérgicas a colinérgicas. Este hecho fue corroborado por Potter y cols. en 1986, observando que la composición del medio de cultivo juega un papel importante y que el mismo efecto es posible en neuronas procedentes de animales adultos, si bien la capacidad de cambio funcional es menor (Potter y cols., 1986).

Greene y cols., (1987) observan también como células PC 12 altamente diferenciadas derivadas de un feocromocitoma son capaces de modificar de manera evidente sus características morfofuncionales en presencia de NGF, desarrollando un fenotipo similar al de las neuronas simpáticas.

La posibilidad de cambio morfofuncional, existe también en otros tipos de células adultas. Bellows y cols., en 1990, observan que la PTH es capaz de suprimir de manera reversible la diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos funcionales, mientras que los andrógenos estimulan la diferenciación y la proliferación de las células óseas (Kasper y cols., 1990). Yeh y cols. (1989) comprueban que la corticosterona es capaz de inducir diferenciación de células intestinales en ratas lactantes adrenalectomizadas y Xuefan y Björntorp (1987) ven como las hormonas sexuales juegan un papel en la diferenciación de los precursores de las células adiposas.

Son también interesantes los hallazgos de Horacek y cols., (1989) donde el tratamiento con LHRH es capaz de inducir la diferenciación de células gonadotropas y lactotropas en tejido hipofisario embrionario de hamster transplantado bajo la cápsula renal de animales adultos hipofisectomizados y orquidectomizados.

Aunque Alvarez-Buylla postuló la existencia de una desdiferenciación de las células salivales que llegaban a asumir algunas de las propiedades de las células hipofisarias, él fue incapaz de poder demostrar completamente estos hechos a la comunidad científica internacional, a pesar de que en algunos estudios histológicos observó modificaciones del tejido transplantado (Alvarez-Buylla y Tsutsumi, 1979).

Nuestra meta pues, ha sido reproducir los estudios de Alvarez-Buylla en ratas midiendo niveles de hormonas hipofisarias en plasma y en tejidos, sometiendo además al tejido transplantado a estudios de inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos para algunas de las hormonas hipofisarias (anticuerpos facilitados por la N.I.H. americana).

### **3.DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se utilizaron 90 ratas hembra de aproximadamente 150 g de peso, de la raza Wistar (Panlab, Barcelona).

Setenta animales se hipofisectomizaron siguiendo la técnica de Alvarez-Buylla y se dividieron en cuatro grupos:

GRUPO A: Hpx-Tp (20 hembras).

Ratas hipofisectomizadas y transplantadas con parótida.

GRUPO B: Hpx-Tg (20 hembras).

Ratas hipofisectomizadas y transplantadas con grasa.

GRUPO C: Hpx-C (20 hembras).

Ratas hipofisectomizadas y transplantadas con silla turca rellena de cemento de dentista.

GRUPO D: OVARIECTOMIZADO (10 hembras).

Ratas hipofisectomizadas, transplantadas con parótida y ovariectomizadas.

GRUPO CONTROL (20 hembras).

Ratas del mismo sexo y edad no operadas.

Todos los animales fueron estudiados durante 35 semanas. Se determinaron una vez al mes, durante 9 meses, a partir de la operación de transplante, los niveles hormonales de LH, PRL, GH y corticosterona, tanto basales como tras la administración de LHRH, TRH, y GRH-piridostigmina.

Diariamente se siguió el ciclo estral mediante la determinación de frotis vaginales. Los animales se pesaron cada 4 semanas.

Al cabo de las 35 semanas de la operación, la mitad de los animales supervivientes se sacrificó por decapitación, recogiendo la sangre troncular y disecándose el área hipotálamo-hipofisaria y/o trasplante. Asimismo se extrajeron los órganos diana (suprarrenales, ovarios y útero) para determinar su peso. Las hipófisis y/o trasplantes fueron homogeneizadas en solución salina fría, centrifugadas, y el sobrenadante se conservó a -20°C hasta la determinación de su contenido hormonal por RIA y de su contenido proteico por el método del azul brillante.

La otra mitad de los animales se sometió a técnicas de fijación "in toto" mediante perfusión intracardiaca de paraformaldehído al 4% en PBS (0.1M, pH 7.4) bajo anestesia con tribromoetanol. Una vez fijada, se procedió a la disección del área hipotálamo hipofisaria, para su estudio con técnicas de inmunohistoquímica.

## **4.MATERIALES**

#### 4.1 INSTRUMENTOS QUIRURGICOS.

-Disector recto: varilla de vidrio de 4 mm de diámetro (figura 8.1).

-Disector curvo: varilla de vidrio de 6 mm de diámetro con la punta curvada (figura 8.2).

-Gancho realizado con una varilla de vidrio de 4 mm de diámetro (figura 8.3).

-Aspiradores de sangre e hipófisis: pipeta pasteur y tubo de vidrio respectivamente (figuras 8.4 y 8.5).

Este instrumental de vidrio fue fabricado a mano especialmente para esta técnica.

-Separadores metálicos curvos de alambre de latón de 1.5 mm de diámetro (la sección curvada se flamea) (figuras 9.9 y 9.10).

-Depresor de lengua de aluminio de 13 cm x 7 mm x 1.5 mm (figura 9.4).

-Separador de boca y fijador para el cateter endotraqueal: de alambre de acero de los números 20 y 22 respectivamente (figura 9.2).

-Cateter endotraqueal: Tubo de teflón de los números 16, 18 y 20 dependiendo de la edad y el peso de la rata (figura 9.8)

-Periostomo (excavador) de odontólogo. Fundamentalmente para penetrar en el orificio de la craneotomía y levantar la compacta, teniendo un buen control visual de la hipófisis (figura 9.5).

-Aguja para abrir meninges de punta curva (número 25) en sentido retrógrado. Esta aguja se suelda a un brazo de latón de 4 mm de diámetro (figura 9.6).

-Separador que fija los incisivos superiores e inferiores: tubo de latón de 7.5 mm de diametro y 1,6 cm de largo en cuya curvatura se suelda un dispositivo para introducir los incisivos del animal (figura 9.1).

-Mesa de operación: Hecha con dos piezas de madera de 30 x 18 x 2 cm y 25 x 18 x 2 cm, unidas por el borde superior mediante un sistema de bisagra, lo que permite una inclinación de la tabla superior en ángulos diferentes. El animal se coloca en la mesa sobre su espalda. La cabeza se fija en la mesa con un instrumento en forma de U, que separa los dientes, construido con alambre de latón de 2.5 mm de diámetro y brazos de 5.5 cm. los brazos del separador se insertan en dos orificios situados a 2.5 cm del borde de la mesa. Los incisivos superiores del animal se colocan debajo del gancho antes de sujetar. A la izquierda del gancho sujetador y con una inclinación de 90° se atornilla una pieza de aluminio de 5 x 2.5 cm. Esta pieza fija el cuello del animal que queda en tracción durante el acto quirúrgico (figura 10).



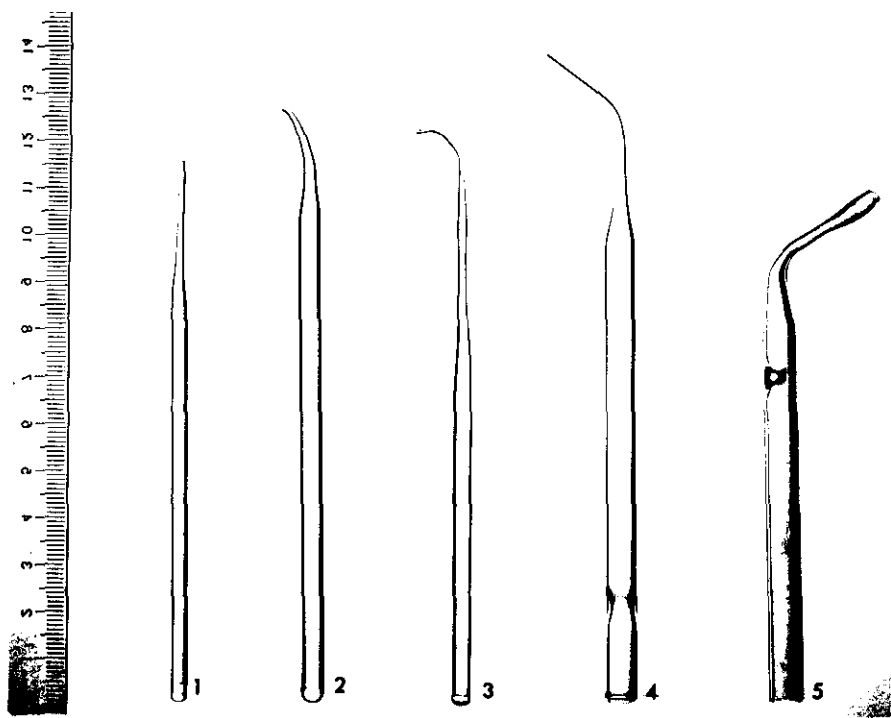


Figura 8.- Instrumentos quirúrgicos: vidrio.

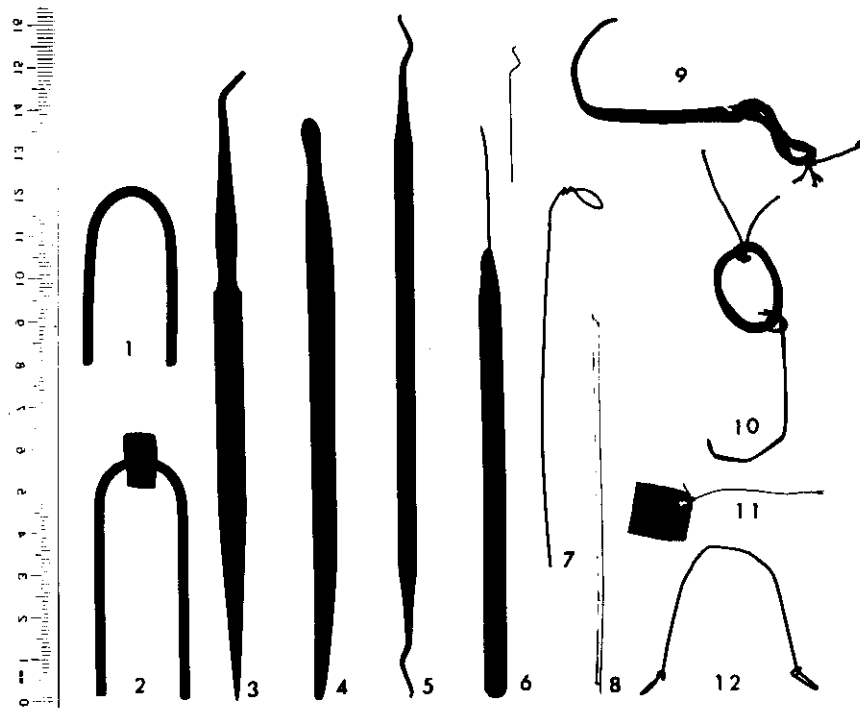


Figura 9.- Instrumentos quirúrgicos: metal.

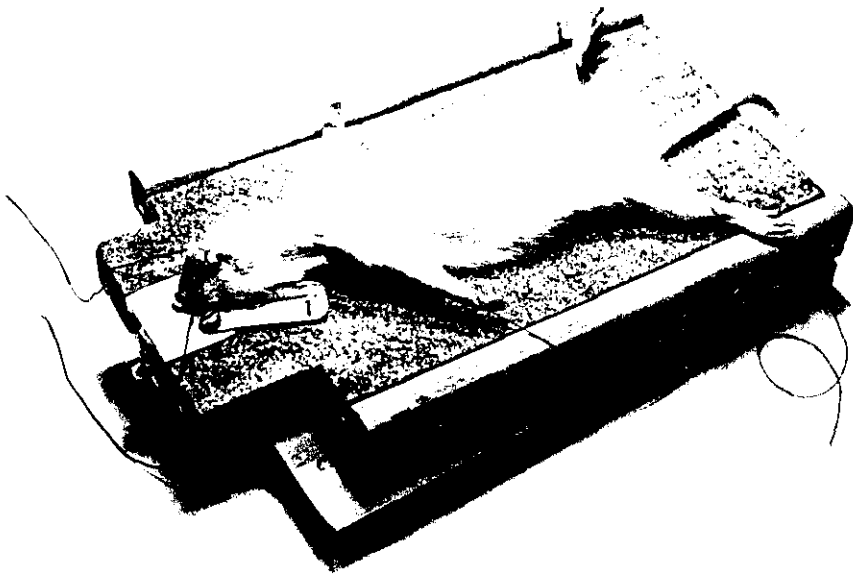


Figura 10.- Mesa de operación.

#### 4.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Se utilizaron ratas hembras de la raza Wistar (Panlab, Barcelona).

Los animales se mantuvieron en un ratario convencional, con sistema de ventilación por extracción continua. La luz fluorescente con control automático de ciclos de 12 horas de luz ( 8.00-20.00) y 12 de oscuridad. La temperatura controlada por termostato fue de  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Para el alojamiento de los animales se utilizaron jaulas de policarbonato con tapa de reja metálica con unas dimensiones de 40 x 25 x 15 cm. El número de animales por jaula en el periodo preoperatorio fue de 5 y en el postoperatorio 3-4 por jaula. Las jaulas con cama de viruta se limpiaron cada 4-5 días, salvo en el periodo postoperatorio, ya que debido a la diabetes insípida transitoria (aparece a los 90-120 minutos de la operación y dura unas 12 horas) que presentan estos animales tras la hipofisectomía, la limpieza de las jaulas se realizaba diariamente o en días alternos.

En el ratario de nuestro departamento se administra a los animales agua y comida "ad libitum", utilizando la dieta A-04 para el mantenimiento de rata-ratón (Panlab). La composición de este tipo de dieta se detalla a continuación:

##### DIETA A-04 (2900 cal/Kg)

- Prótidos 17%
- Lípidos 3%
- Glúcidos 59%
- Celulosa 4%
- Minerales 5%

### 4.3 SOLUCIONES TAMPON.

-Tampón I: Tampón fosfato 0.5M, pH 7.6

Se utiliza para el marcaje de hormonas y como base del resto de los tampones utilizados en el RIA.

- Tampón II: Tampón fosfato 0.01M, NaCl 0.15M.

Se utiliza como base de los tampones III y IV.

-Tampón III: Tampón fosfato 0.01M, NaCl 0.15M, BSA (albúmina sérica bovina, fracción V) 1%, pH 7.6.

Se utiliza para diluir la curva patrón, la hormona marcada y para completar volúmenes de las muestras problema.

-Tampón IV: Tampón fosfato 0.01M, NaCl 0.15M, EDTA 0.025M, tritiplex 0.025M, pH7.6.

Se emplea para diluir el anticuerpo.

- Tampón de ensayo de corticosterona (TE): Tampón fosfato 0.005M, pH7.4, BSA 0.6 g/l, gammaglobulina 0.2 g/l .

Se emplea en el radioinmunoensayo de corticosterona.

#### 4.4 REACTIVOS DEL RADIOINMUNOENSAYO: ANTIGENOS Y ANTICUERPOS.

Todos los reactivos utilizados para los radioinmunoanálisis de hormonas polipeptídicas fueron suministrados por el "National Hormone and Pituitary Program" del "National Institute for Arthritis Diabetes and Digestive and Kidney Diseases" (NIADDK). Su reconstitución y conservación se realiza según las instrucciones que acompañan a cada reactivo.

-LH para yodar NIADDK-rat LH-I-8: con una actividad biológica de 0.9 x NIH-LH-S1 medida por bioensayo. La contaminación con rFSH, rTSH, rGH y rPRL es menor del 0.1%. La caracterización química por Sephadex revela que es monomérica en una proporción del 95 al 100%.

-LH estandar NIADDK-rat-LH-RP-2: con una actividad biológica de 0.03 x NIH-LH-S-1 medida por bioensayo.

-Anticuerpo anti-LH NIADDK-anti-rLH-S-8: este anticuerpo se utiliza a una dilución final de 1:6000.

-PRL para yodar NIADDK-rat PRL-I-8: con una actividad biológica de 30 U.I./mg medida por bioensayo. La contaminación con rFSH, rTSH y rLH es menor del 0.1%, la contaminación con rGH es menor del 0.3%. La caracterización química por Sephadex y electroforesis en PAGE-SDS revela que es monomérica en una proporción del 95 al 100%.

-PRL estandar NIADDK-rat-PRL-RP-3: presenta la misma actividad biológica, contaminación con otras hormonas y características químicas que la NIADDK-rPRL-RP-1 cuando se determina por radioinmunoanálisis.

-Anticuerpo anti-PRL NIADDK-anti-rPRL-S-9: este anticuerpo se utiliza a una dilución final de 1:22500.

-GH para yodar NIADDK-rat GH-I-4: con una actividad biológica de 1.8 I.U./mg medida por bioensayo. La contaminación con otras hormonas de la adenohipófisis es menor del 0.1%. La caracterización química por Sephadex revela que es monomérica en una proporción del 95 al 100%.

-GH estandar NIADDK-rat-GH-RP-1: con una actividad biológica de 0.6 x I.U./mg medida por bioensayo.

-Anticuerpo anti-GH NIADDK-anti-rGH-S-4: presenta un 1.6% de reacción cruzada con la rPRL y nula con la rFSH, rLH y rTSH, este anticuerpo se utiliza a una dilución final de 1:60000.

-Corticosterona marcada: (1-2)<sup>3</sup>H-corticosterona con una actividad de 94 Ci/mmol (Amersham).

-Anticuerpo anticorticosterona: obtenido de suero de conejo, no presenta reacción cruzada con testosterona, progesterona, cortisol ni estradiol (Bioclin, Cardiff, UK). Se emplea a una dilución final de 1:800

#### **4.5. REACTIVOS PARA INMUNOCITOQUIMICA: ANTICUERPOS.**

Anticuerpo anti-PRL NIADDK anti-r-PRL-IC-4, obtenido de suero de conejo.

Anticuerpo anti-LH NIADDK anti-o $\beta$ -LH-IC-1, obtenido de suero de conejo.

Anticuerpo anti-GH NIADDK anti-r-GH-IC-1, obtenido de suero de mono.

Anticuerpo anti-TSH MAB613 (Chemicon), obtenido de suero de ratón.

## **5.METODOS EXPERIMENTALES**



## 5.1 HIPOFISECTOMIA PARAFARINGEA.

### 5.1.1 Procedimiento quirúrgico.

La intervención se realiza en una mesa de operaciones (figura 10) diseñada para tal fin por Alvarez-Buylla, que permite la fijación de la rata y su fácil manipulación. El animal se intuba utilizando una cánula traqueal que se conecta a un respirador automático. Tras ser anestesiado con TBE se procede al rasurado y limpieza (con una solución antiséptica) de la cara anterior del cuello, donde se hace una incisión, justamente en la línea media, 1 cm posterior al borde inferior de la mandíbula y por encima del manubrio esternal.

La incisión en la línea media se hace sobre la fascia superficial que cubre los músculos digástrico y esternohioideo. Utilizando el tendón central del digástrico izquierdo como referencia, se introducen los disectores de vidrio recto y curvo perpendicularmente hasta el hueso de la base del cráneo. Posteriormente y con la ayuda de ambos disectores, se separan y disecan las distintas estructuras:

-Vena yugular interna izquierda y cara interna del músculo masetero (se separan hacia la izquierda).

Músculos digástrico y esternohioideo, traquea y esófago (se separan hacia la derecha).

El extremo distal de la apófisis pterigoides izquierda se utiliza como referencia para abrir la nasofaringe. Los tejidos blandos se separan de los huesos esfenoides y occipital con el disector recto de vidrio hasta que el hueso está limpio y puede hacerse visible la línea media.

Una vez disecado el músculo nasofaríngeo, los huesos del cráneo quedan expuestos en el fondo de manera que se puede observar fácilmente una línea transversal azulada que es la sincondrosis esfeno-occipital.

La aspiración se realiza a través de un sistema de vacío conectado a un tubo de succión de boquilla curva. Para la separación de las estructuras y ampliación del campo quirúrgico se utilizan 4 ó 5 separadores metálicos, pero la tracción debe realizarse cuidadosamente, ya que si es excesiva puede dañar la laringe, la traquea o el esófago.

La base ósea esfenoidal se taladra con una broca de dentista dirigida perpendicularmente hacia el centro del seno venoso esfenoidal. El orificio se abre por detrás del eje transversal del hueso, 1 mm aproximadamente por delante de la sincondrosis esfeno-occipital (figura 12). El hueso se perfora preservando la compacta y una vez visualizada, se procede a levantar esta fina capa ósea con el excavador o periostomo hasta que queda a la vista la duramadre. El sangrado, si se produce, se detiene insertando en el orificio tapones de espongoestán. Los bordes de este se liman para alisarlos y al mismo tiempo aumentar el diámetro de la apertura, para facilitar la posterior aspiración de la hipófisis.

Una vez que se observa la hipófisis cubierta por la duramadre, se secciona en forma de cruz esta última con la aguja de meninges, quedando la hipófisis al descubierto. A continuación se toma el aspirador de hipófisis (figura 11) al que se ha acoplado una trampa de malla y se procede a la succión de la glándula. La hipófisis se extrae íntegra con el tallo y queda atrapada en la malla.

La presión de aspiración (1-10 mm Hg) es controlada mediante la aplicación del dedo índice sobre el orificio del aspirador. En la mayoría de las ocasiones, se extrae la hipófisis íntegra con el tallo seccionado, pero algunas veces se obtienen separadas la adenohipófisis y la neurohipófisis. Esto puede comprobarse, bien directamente o bajo la lupa binocular, dado que la hipófisis queda retenida en la malla del aspirador. Suele darse una pequeña hemorragia y descarga de líquido cefalorraquídeo que cede espontáneamente.

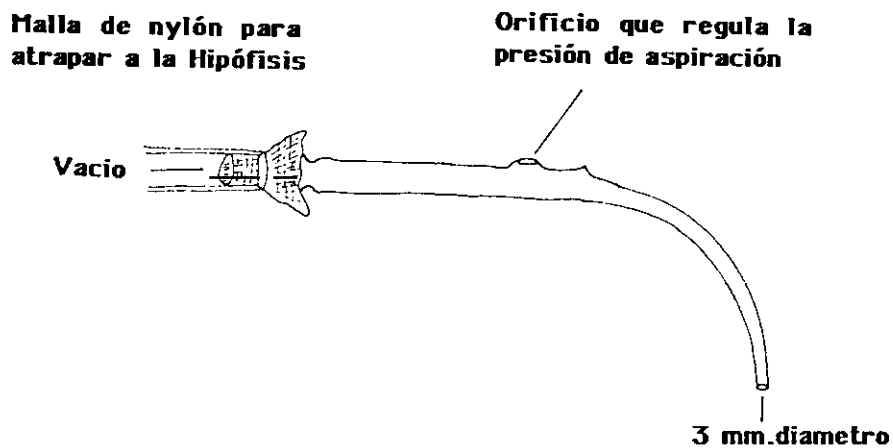


Figura 11.- Aspirador de hipófisis.

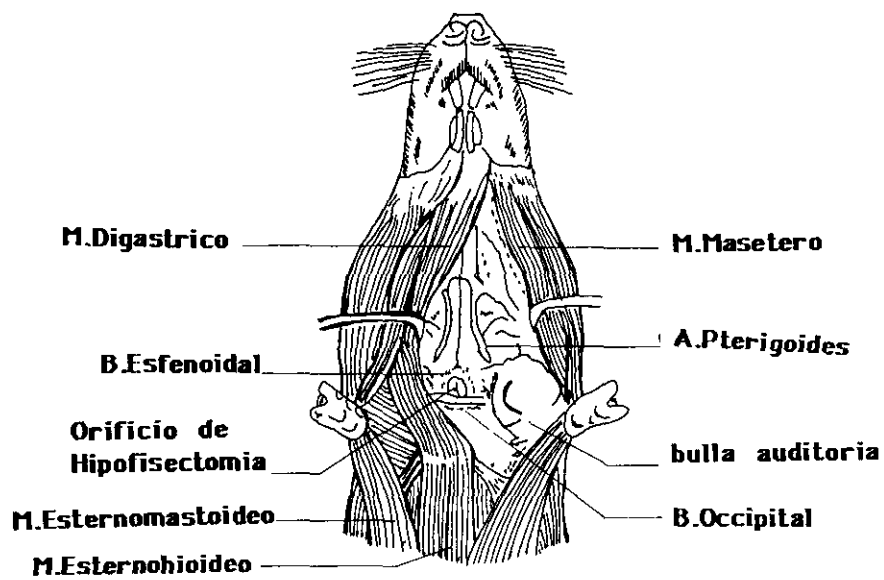


Figura 12.- Relaciones anatómicas entre los músculos del cuello y el área donde se ha de realizar el orificio en la base del cráneo.

### 5.1.2 Transplante de parótida

Se procede a la disección de la parótida seccionando una porción de aproximadamente el doble del tamaño de la hipófisis extraída y cuidando de no lesionar el conducto excretor.

Una vez realizada la hipofisectomía y con la misma aguja de meninges, se abre la tienda de la hipófisis visualizándose en ese mismo momento la salida de líquido cefaloraquídeo que se seca con un tapón de espongotán. Una vez seco el orificio, y con el campo quirúrgico perfectamente visible, se procede a la colocación del transplante.

Se toma el fragmento de glándula parótida, se coloca en el orificio y con la ayuda de un fiador de transplante de vidrio hecho para tal fin, se empuja con delicadeza el transplante hacia abajo y en sentido rostral hasta que quede introducido en íntimo contacto con el tercer ventrículo. (figura 13).

A continuación se cierra el orificio con un tapón de silastic (Dow Corning) para prevenir la vascularización proveniente del hueso lesionado y sus estructuras anejas. Se retiran los separadores, se colocan las estructuras, se espolvorea la herida con sulfatiazol y se cose la piel del animal con seda.

El transplante de grasa, se realiza siguiendo la misma técnica que en el transplante de parótida, extrayendo el tejido graso de la región cervical del animal.



Figura 13.- Transplante de parótida.

### 5.1.3 Cuidados postoperatorios.

Finalizada la operación, los animales se instalan en jaulas en las que se protege la viruta para evitar que se introduzca en la boca o en las fosas nasales de las ratas ya que la obstrucción nasal o faríngea les causaría inmediatamente la muerte.

La aplicación de calor mientras los animales se recuperan de la operación fuera del ratario convencional, se realiza mediante una lámpara de rayos infrarrojos.

La observación es continua para evitar que se traguen la cánula endotraqueal ya que hay que mantenerla hasta que el mismo animal se la retira.

Finalizada la operación se le administra a cada animal:

- Dexametasona s.c. (80  $\mu$ g en 1 ml de solución salina).
- Penicilina G retardada i.m. (60.000 U).
- Se espolvorea la cicatriz con sulfatiazol.

Tras vigilancia intensiva durante 3-4 horas, y una vez recuperadas de la operación se trasladan al ratario convencional.

Durante la primera semana del postoperatorio se les administra dexametasona en dosis decrecientes (64, 32, 16, 16, 8, 8 y 4  $\mu$ g) y una vez suprimida se mantienen una semana mas con suero glucosalino (5% glucosa en solución salina 0.9%). Transcurrido este tiempo, se suprimen los sueros y se administra únicamente agua "ad libitum"

## 5.2 PAUTAS DE TRATAMIENTO

### 5.2.1 Toma de muestras.

La sangre se obtiene mediante punción de la vena yugular externa a través de la piel, con una jeringa de insulina bajo ligera anestesia con éter. La sangre se hepariniza y centrifuga inmediatamente en frío a 1500g durante 15 minutos. El plasma se conserva -20°C hasta la determinación de los niveles hormonales.

### 5.2.2 Estímulo con LHRH y TRH.

Mensualmente y después de la extracción de una muestra basal de sangre de la vena yugular externa, se procede a la inyección i.v. de 1 µg/rata de LHRH sintético (Luforan, Serono, Madrid) y 2 µg/rata de TRH sintético (Pevya, Barcelona) en 0.5 ml de solución salina estéril.

A los 10 minutos de la inyección se procede de nuevo a la extracción de una muestra de sangre como se ha descrito anteriormente.

### 5.2.3 Estímulo con GRF-post-piridostigmina.

Treinta minutos antes de realizar este test, se inyecta a cada animal 150 µl de piridostigmina (Prostigmina, Roche) con el fin de disminuir el tono somatostatinérgico. A continuación, se procede a la extracción de una muestra basal de sangre de la vena yugular externa bajo ligera anestesia con éter, inyectando a continuación 50 µg/rata de GRF sintético (Serono, Madrid).

A los 5 min. de la inyección se procede de nuevo a la extracción de una muestra de sangre como se ha descrito anteriormente.



### 5.3 OBTENCIÓN DE ÓRGANOS.

Al final de las 35 semanas del postoperatorio, la mitad de los animales supervivientes se sacrificaron por decapitación, recogiendo la sangre troncular y disecándose cuidadosamente el área hipotálamo hipofisaria y/o transplante. La sangre troncular se recoge en tubos heparinizados, se centrifuga a 1500g durante 5 min. a 4°C. Se decanta el plasma y se almacena a -20°C hasta su análisis.

Asimismo se extrajeron órganos diana (ovarios y suprarrenales) para ser pesados en una balanza de precisión, así como las glándulas parótidas controles para medir su contenido hormonal.

El tejido hipofisario se homogeneiza con ultrasonidos durante 30 segundos, a una amplitud de 6 micrones, en 0.5 ml de solución salina al 0.9% y se decanta obteniéndose una solución 1:1. Se preparan diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 para medir el contenido de LH y PRL. Este homogeneizado se hace del mismo modo en las parótidas controles y en el transplante de parótida.

## **6.METODOS ANALITICOS**

## 6.1 RADIOINMUNOANALISIS.

### 6.1.1 Radioinmunoanálisis de LH.

Se pipetea alícuotas de 200 $\mu$ l en tampón III de las diluciones patrones (0-10) ng/ml) y 200 $\mu$ l de la muestra problema:

-Plasmas, 200 $\mu$ l.

-Homogeneizado de hipófisis (1:10, 1:100 y 1:1000), 10 $\mu$ l completando hasta 200 $\mu$ l con tampón III.

-Homogeneizado de glándula parótida (1:10, 1:100 y 1:1000), 200 $\mu$ l completando hasta 200 $\mu$ l con tampón III.

-Homogeneizado de parótida transplantada (1:10, 1:100 y 1:1000), 15, 25 y 100  $\mu$ l de cada homogeneizado, completando hasta 200 $\mu$ l con tampón III.

Se añaden 200 $\mu$ l de anticuerpo anti-LH a una dilución 1:2000 en tampón IV con suero de conejo al 2%.

Se preincuba 24h a 4°C.

Se añade a todos los tubos 200 $\mu$ l de LH-<sup>125</sup>I en tampón III (aproximadamente 15000-20000 cpm/tubo).

Se incuba 72h a 4°C.

Se añaden 50 $\mu$ l de 2° anticuerpo en un volumen final de 500 $\mu$ l de solución de polietilenglicol (PEG) al 10%, en tampón II, a todos los tubos con excepción de los At.

Se incuba 20 min. a temperatura ambiente.

Se centrifuga a 1500g durante 15 min. a 4°C. Se aspira el sobrenadante y el precipitado se cuenta en un espectrofotómetro de radiación gamma.

La sensibilidad de la curva patrón de LH es de 0.05 ng/ml (figura 14).

El coeficiente de variación de la misma muestra de plasma en 5 ensayos distintos fue del 9% en el rango de 1.6 ng y de 16% en el rango de 0.4 ng. El coeficiente de variación intraensayo en ocho medidas del mismo plasma fue del 6%.

### 6.1.2 Radioinmunoanálisis de PRL.

Se pipetea alicuotas de 200 $\mu$ l en tampón III de las diluciones patrones (0-25) ng/ml y 200 $\mu$ l de la muestra problema:

-Plasmas, 10-50 $\mu$ l completando los 200  $\mu$ l con tampón III.

-Homogeneizado de hipófisis (1:100), 5 $\mu$ l completando hasta 200 $\mu$ l con tampón III.

-Homogeneizado de glándula parótida (1:1), 5-10 $\mu$ l, completando hasta 200 $\mu$ l con tampón III.

-Homogeneizado de parótida transplantada (1:10, 1:100 y 1:1000), 2-5 $\mu$ l de cada homogeneizado, completando hasta 200 $\mu$ l con tampón III.

Se añaden 200 $\mu$ l de anticuerpo anti-PRL a una dilución 1:10000 en tampón IV con suero de conejo al 1%.

Se preincuba 24h a 4°C

Se añade a todos los tubos 200 $\mu$ l de PRL-<sup>125</sup>I en tampón III (aproximadamente 15000-20000 cpm/tubo).

Se incuba 48h a 4°C.

Se añaden 12.5 $\mu$ l de 2° anticuerpo en un volumen final de 500 $\mu$ l de solución de polietilenglicol (PEG) al 10%, en tampón II, a todos los tubos con excepción de los At.

Se incuba 20 min. a temperatura ambiente.

Se centrifuga a 1500g durante 15 min. a 4°C. Se aspira el sobrenadante y el precipitado se cuenta en un espectrofotómetro de radiación gamma.

La sensibilidad de la curva patrón de PRL es de 0.025 ng/ml (figura 15).

El coeficiente de variación de la misma muestra de plasma interensayo fue del 9% en el rango de 0.6 ng y de 5% en el rango de 1.25 ng. El coeficiente de variación intraensayo en ocho medidas del mismo plasma fue del 6%.

### 6.1.3 Radioinmunoanálisis de GH.

Se pipetea alicuotas de 200 $\mu$ l en tampón III de las diluciones patrones (0-50) ng/ml) y 200 $\mu$ l de la muestra problema (10-50 $\mu$ l de plasma completando los 200  $\mu$ l con tampón III) y 200  $\mu$ l de homogeneizado de hipófisis diluido 1:XX en tampón III.

Se añaden 200 $\mu$ l de anticuerpo anti-GH a una dilución 1:20000 en tampón IV.

Se preincuba 24h a 4°C

Se añade a todos los tubos 200 $\mu$ l de GH-<sup>125</sup>I en tampón III (aproximadamente 15000-20000 cpm/tubo).

Se incuba 72h a 4°C

Se añaden 12.5 $\mu$ l de 2° anticuerpo en un volumen final de 500 $\mu$ l de solución de polietilenglicol (PEG) al 10%, en tampón II, a todos los tubos excepto en los que se cuantifica la actividad total (At).

Se incuba 20 min. a temperatura ambiente

Se centrifuga a 1500g durante 15 min. a 4°C. Se aspira el sobrenadante y el precipitado se cuenta en un espectrofotómetro de radiación gamma.

La sensibilidad de la curva patrón de GH es de 0.025 ng/ml (figura 16).

El coeficiente de variación intraensayo en siete medidas del mismo plasma fue del 3.4%.

6.1.4 Radioinmunoanálisis de corticosterona.

Se pipetea alicuotas de 100 $\mu$ l en tampón de ensayo (TE) de las diluciones patrones (0-80 ng/ml) y 100 $\mu$ l de la muestra problema (25 $\mu$ l de plasma extraídos en 5ml de diclorometano y reconstituidos en 1 ml de TE) .

Se añaden 100 $\mu$ l de anticuerpo anti-corticosterona a una dilución 1:800 en TE.

Se añade a todos los tubos 100 $\mu$ l de corticosterona-<sup>3</sup>H (aproximadamente 10.000 cpm/tubo).

Se incuba 72h a 4°C

Se añaden 150 $\mu$ l de hidroxapatita (25 g/l en PBS 0.001M, pH 7.4) a todos los tubos excepto en los que se cuantifica la actividad total (At).

Se centrifuga a 1500g durante 15 min. a 4°C. Se aspira el sobrenadante y el precipitado se lava con 1 ml de PBS 0.001, pH 7.4.

Se centrifuga a 1500g durante 15 min. a 4°C. Se aspira el sobrenadante y al precipitado se le añaden 50  $\mu$ l de PBS 0.05M, pH 7.4. Se añaden 2 ml de acuasol-2, se agitan los tubos y se cuenta en un espectrofotómetro de radiación beta.

La sensibilidad de la curva patrón de corticosterona es de 0.6 ng/ml (figura 17).

El coeficiente de variación intraensayo en ocho medidas del mismo plasma fue del 5.6%.

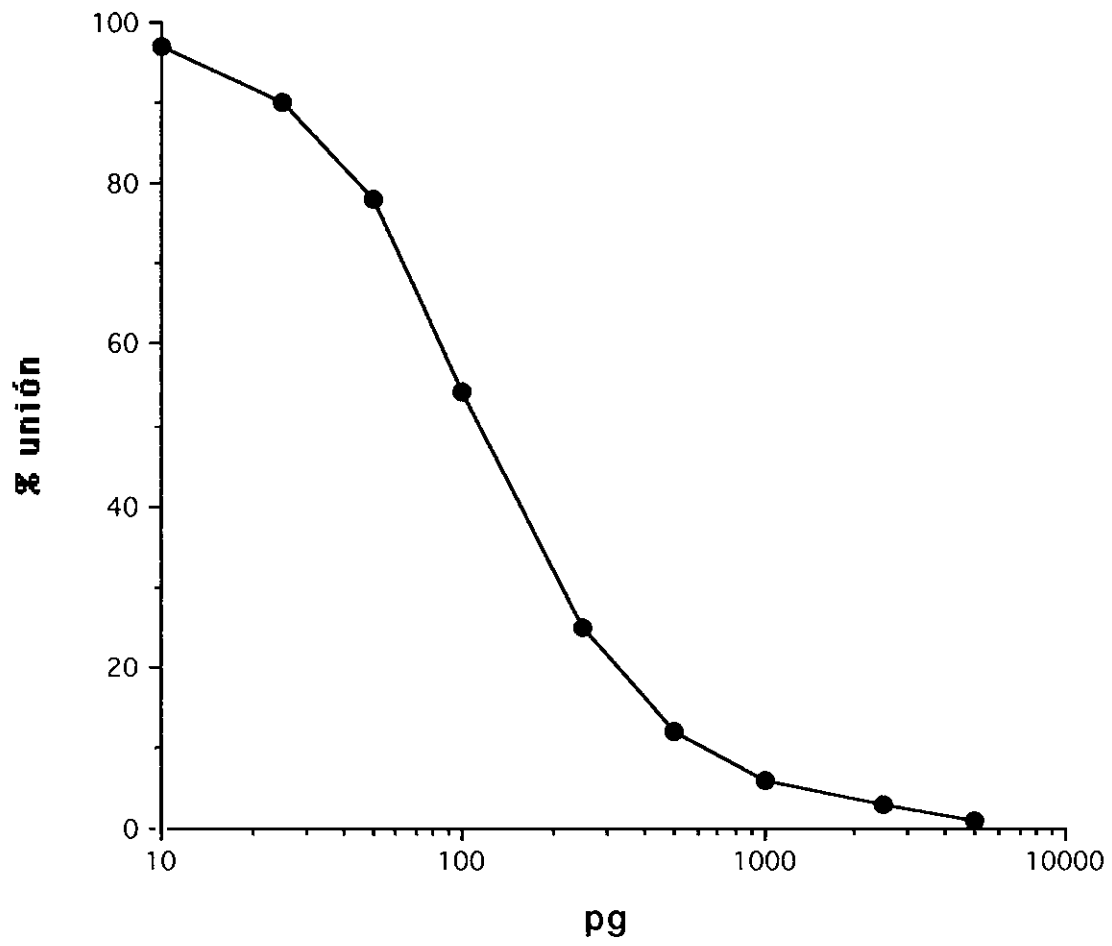


Figura 14.- Curva estándar de LH.

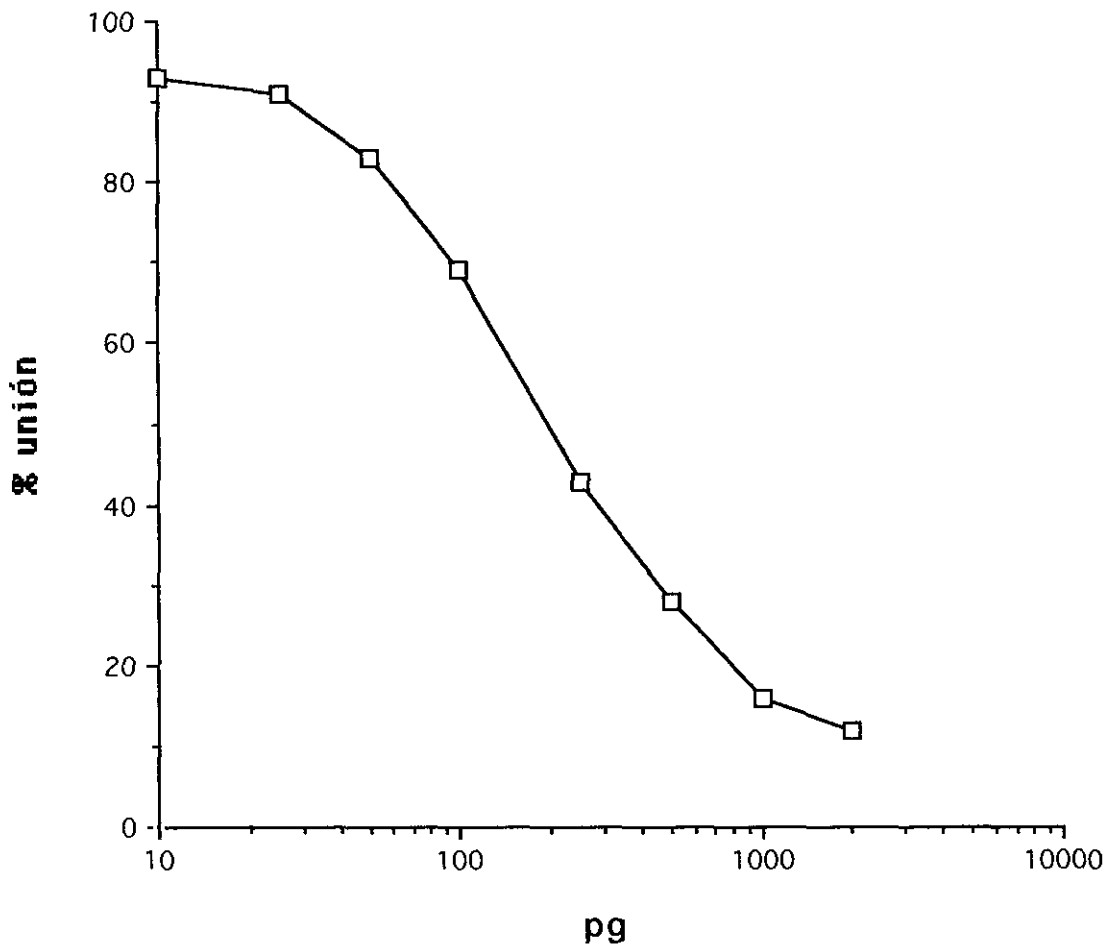


Figura 15.- Curva estándar de PRL.



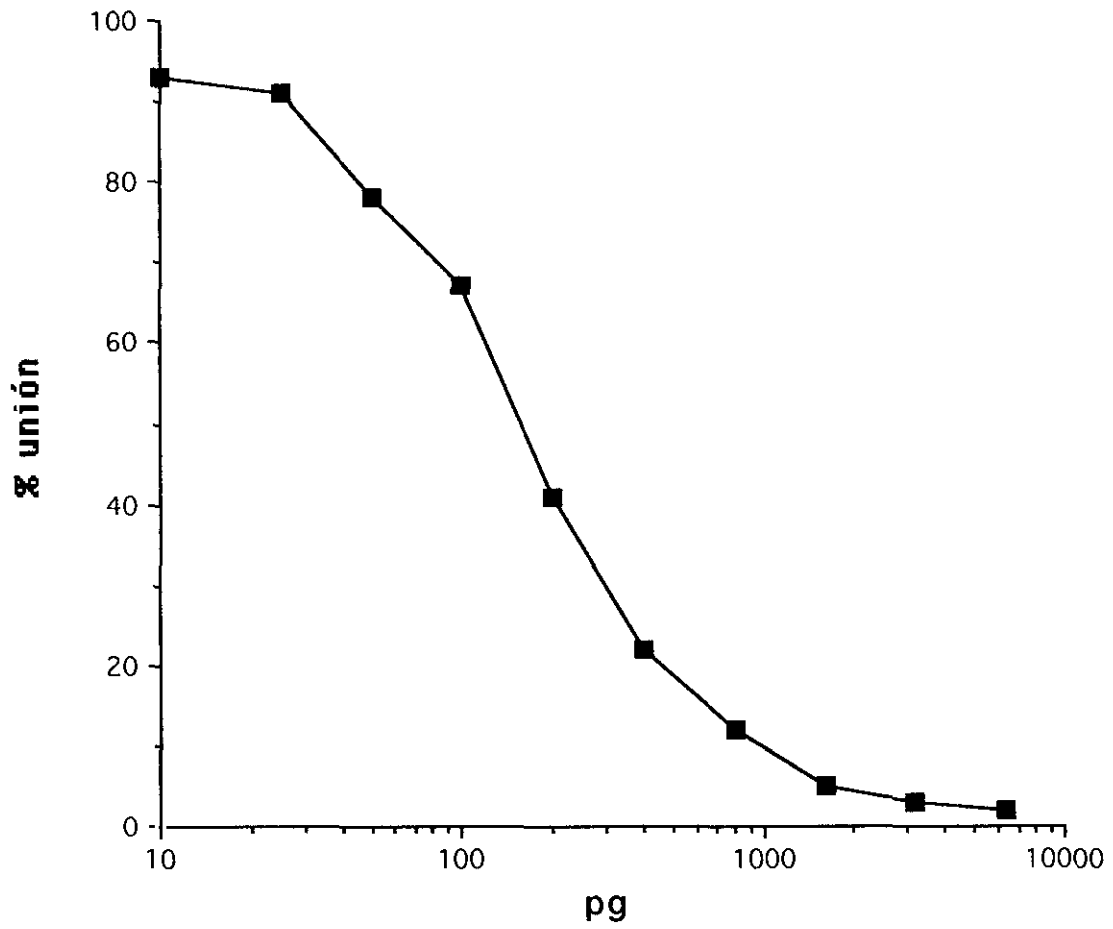


Figura 16.- Curva estándar de GH.

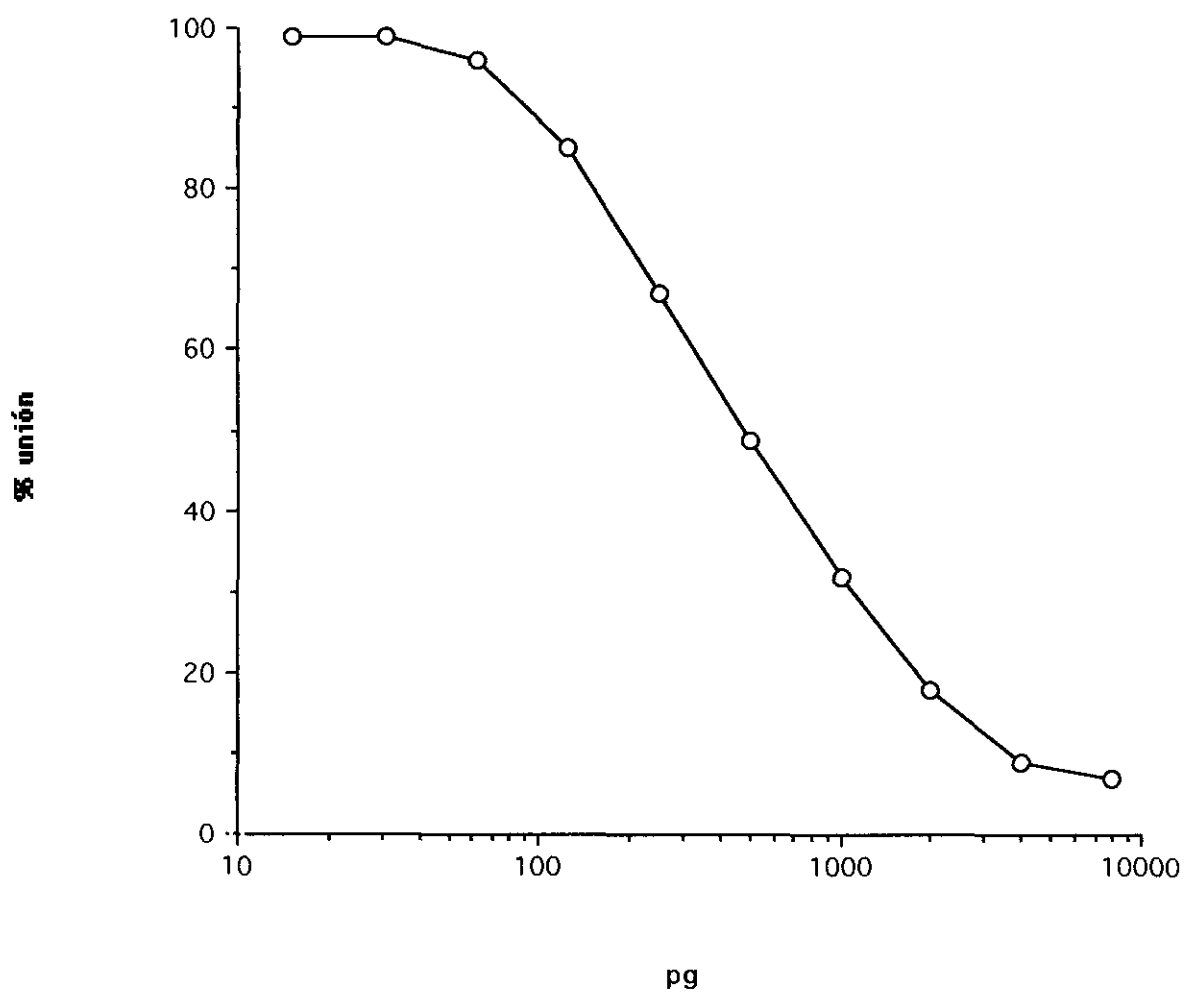


Figura 17.- Curva estándar de corticosterona.

## 6.2 Cuantificación de proteínas en tejido hipofisario y parotídeo.

### 6.2.1 Fundamento teórico del método.

La cuantificación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico descrito por Bradford en 1976, en el que se utilizó como colorante el azul brillante de Coomassie G-250 que se caracteriza por virar del color rojo original al color azul al unirse a las proteínas, por lo que midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro se puede determinar la intensidad del color azul y por tanto la concentración de dichas sustancias en la muestra.

El procedimiento es muy sencillo de realizar, ya que el colorante se une rápidamente a las proteínas (2 min.) y el complejo proteína-colorante permanece estable durante un periodo largo de tiempo (30 min.).

Bradford (1976) validó este método en términos de exactitud, especificidad, linealidad, sensibilidad, y reproductibilidad, cuando se determina la concentración de proteínas en muestras disueltas u homogeneizadas en solución salina (NaCl 0.15M).

Las muestras de tejido hipofisario, así como las de la parótida, se centrifugan a 4°C y 1000g durante 15 min. una vez descongeladas. La alícuota que se analiza se toma del sobrenadante. Los resultados se expresan en mg de proteína por glándula.

### 6.3 Estudio inmunohistoquímico del trasplante.

#### 6.3.1 Perfusión vascular.

Dado que el tejido nervioso es muy sensible a la degradación postmortem, antes de realizar cualquier estudio histológico o de inmunocitoquímica es imprescindible hacer una perfusión vascular del animal a estudiar para conseguir el mejor método de fijación tisular.

El método más usado para la fijación del tejido nervioso es el de la perfusión transcardiaca (Palay y cols., 1962, Andres, 1976, Descarries y Shröder, 1968, Langford y Coggeshall, 1980).

La solución utilizada para realizar la perfusión-fijación consta de paraformaldehído al 4% en PBS (0.1M, pH 7.4), empleando entre 200 y 300 ml de la solución por cada animal.

Previamente se anestesia al animal con TBE (2.5g/100ml de solución salina, 1ml/100g de peso, vía intraperitoneal).

Una vez anestesiado el animal, se abre ampliamente la caja torácica, se liga la aorta ascendente y se hace una incisión en el ventrículo izquierdo, a través del que se inserta la cánula en la aorta ascendente. A continuación se abre la aurícula derecha y de este modo, la solución de la perfusión recorre todo el cuerpo del animal, fijando todos los tejidos excepto el corazón y el pulmón.

Terminada la perfusión se decapita al animal, y se abre cuidadosamente el cráneo para extraer el área transplantada.

La zona transplantada se lava con tampón fosfato 0.1M y posteriormente se pasa por una solución de sacarosa al 20-30% con el fin de conseguir una buena crioprotección.

La pieza se sumerge en "tissue-tek" y así queda preparada para ser cortada en criostato. Los cortes que se realizan son de 20 $\mu$ m y se conservan a -20°C hasta su estudio inmunocitoquímico.

Para estudiar las características morfológicas del transplante, así como las hipófisis y parótidas de las ratas controles, se escogieron los cortes de mejor calidad obtenidos con el criostato y se tiñeron.

### 6.3.2 Técnica de inmunohistoquímica.

Las preparaciones se pasan por PBS durante 15-20 minutos y a continuación por cloruro amónico en PBS durante 10 minutos con el fin de bloquear la inmunofluorescencia inespecífica del formaldehído. Posteriormente se elimina la humedad con cuidado de no secar el tejido.

Se ponen a incubar en 30% de suero normal de oveja en PBS (para PRL y LH) durante 30 minutos (se utiliza suero de conejo en el caso de la GH y de suero de cabra en el de TSH). Se pasan 10 minutos por PBS y a continuación se incuban durante 24 horas en distintas diluciones de anticuerpo:

-PRL: 1/50, 1/100, 1/200, 1/300 y 1/500

-LH: 1/100, 1/200 y 1/500

-GH: 1/20

-TSH: 1 mg/ml

Para diluir el anticuerpo de TSH, en lugar de PBS se utilizó tris-acetato pH 7 con 0.1% de azida sódica.

## **6.4 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.**

De los datos obtenidos individualmente, se reflejan en las figuras los valores medios  $\pm$  EEM. Se utilizó el análisis de la varianza para la evaluación de la significación estadística de las diferencias entre grupos.

## **7.RESULTADOS**

### **7.1 Técnica quirúrgica: hipofisectomía parafaríngea-transplante de parótida.**

Se consigue poner a punto la hipofisectomía parafaríngea con control microscópico, así como la sustitución inmediata de la hipófisis por un fragmento de glándula parótida en el mismo acto quirúrgico (ya descrita en la página 67).

En los grupos de animales estudiados:

A-Hpx-Tp (Hipofisectomía + transplante de parótida)

B-Hpx-Tg (Hipofisectomía + transplante de grasa)

C-Hpx-C (Hipofisectomía + cemento)

Se consigue la extracción de la hipófisis "in toto", pudiendo comprobar mediante control microscópico su integridad anatómica. El fragmento de tejido transplantado no fue en ningún caso mayor del doble del tamaño de la hipófisis. No se produjo ninguna hemorragia importante durante la intervención ni se observaron complicaciones a lo largo del postoperatorio.

### **7.2 Frotis vaginal.**

Para poder determinar el primer estro postcirugía, se siguió el ciclo estral de los animales, mediante el análisis microscópico diario de los frotis vaginales en todos los grupos de animales estudiados:

A-Hpx-Tp

B-Hpx-Tg

C-Hpx-C

CONTROL

En los dos primeros meses del postoperatorio, pudimos observar que así como el 65% de las hembras controles tenían ciclos regulares, el 100% de las hembras hipofisectomizadas y transplantadas mantuvieron un estado de diestro permanente.

A partir del tercer mes del postoperatorio, el 15% de las hembras hipofisectomizadas con transplante de parótida comenzaron a presentar estados de proestro y estro de manera ocasional, mientras que los otros dos grupos continuaron en diestro permanente.

### **7.3 Supervivencia.**

El estudio de la supervivencia en los tres grupos de animales estudiados, está claramente descrito en la figura 18.

A las cuatro semanas de la operación, la supervivencia era del 70% en el grupo A (Hpx-Tp) y de un 55% en los grupos B (Hpx-Tg) y C (Hpx-C).

A partir de las 16 semanas de la operación la supervivencia para las hembras hipofisectomizadas y transplantadas con glándula parótida fue de un 55%, manteniéndose en este porcentaje hasta las 35 semanas del postoperatorio.

En los animales que recibieron un transplante de grasa, la supervivencia a las 35 semanas fue del 20% y en los simplemente hipofisectomizados fue inferior al 15% (figura 18).



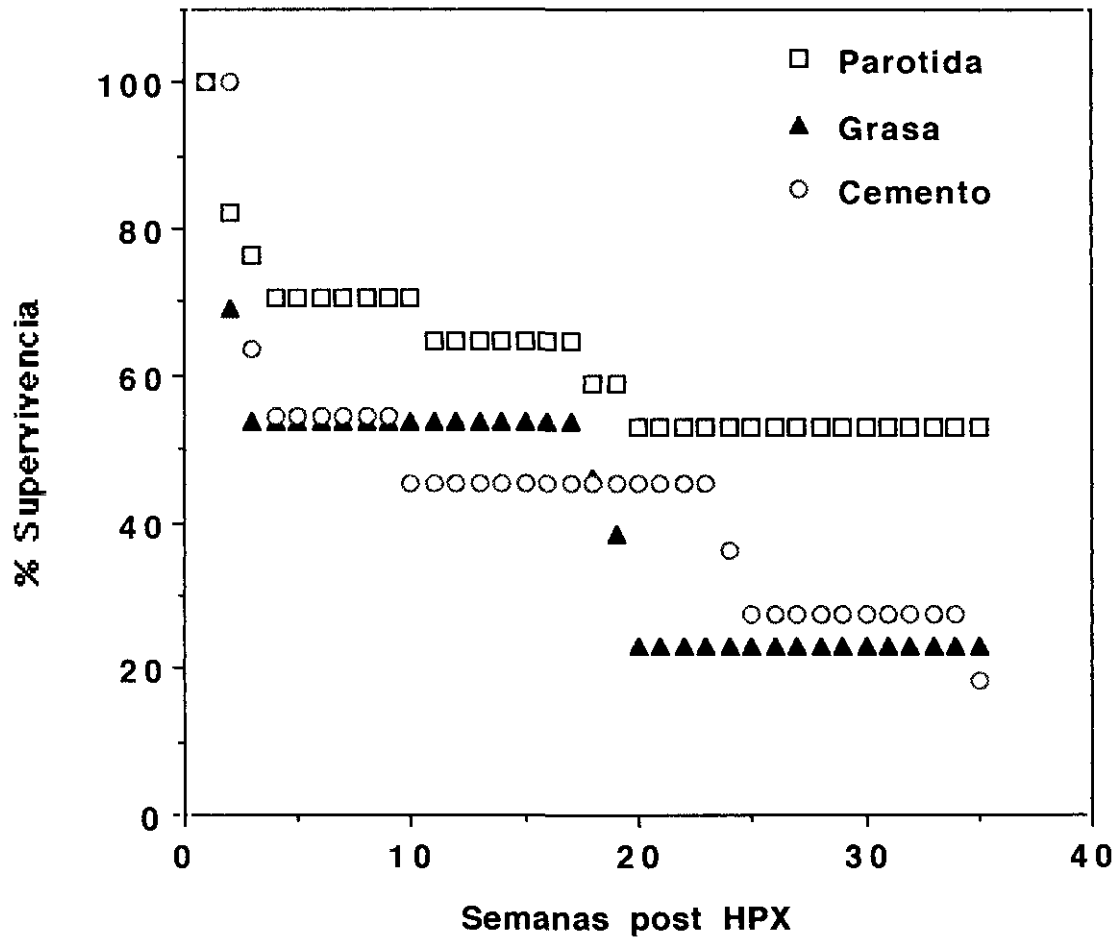


Figura 18.- Supervivencia en ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con parótida, grasa o cemento en distintos tiempos tras la operación.

#### 7.4 Pesos.

Los animales se pesaban mensualmente. El peso corporal inicial oscilaba entre 150 y 210 g. Al mes de la operación las ratas transplantadas con glándula parótida perdieron un 25% de su peso inicial, las transplantadas con grasa un 20% y las simplemente hipofisectomizadas con cemento un 30%. A partir de los tres meses del postoperatorio, los tres grupos de animales iban recobrando peso corporal, siendo este incremento más significativo en los animales del grupo C. La recuperación ponderal del peso de los animales de los grupos A y B a las 30 semanas del postoperatorio fue respectivamente un 20 y un 25% inferior a la de los animales control y asimismo inferior a la de los animales del grupo C (figuras 19 y 20).

Los pesos de los órganos diana (suprarrenales y ovarios) a las 35 semanas del postoperatorio fueron significativamente menores en las ratas transplantadas que en los animales control (figuras 21 y 22).

En los animales transplantados con parótida, el peso de las glándulas suprarrenales fue el 33% del de las ratas control, siendo prácticamente indetectable en los animales transplantados con grasa y en los simplemente hipofisectomizados.

En cuanto al peso de los ovarios, también disminuyó como consecuencia de la operación. Los animales transplantados con parótida presentaban ovarios con un peso de un 55% en relación al de los ovarios de los animales control, un 25% en el caso de los transplantados con grasa, y un 30% los simplemente hipofisectomizados.

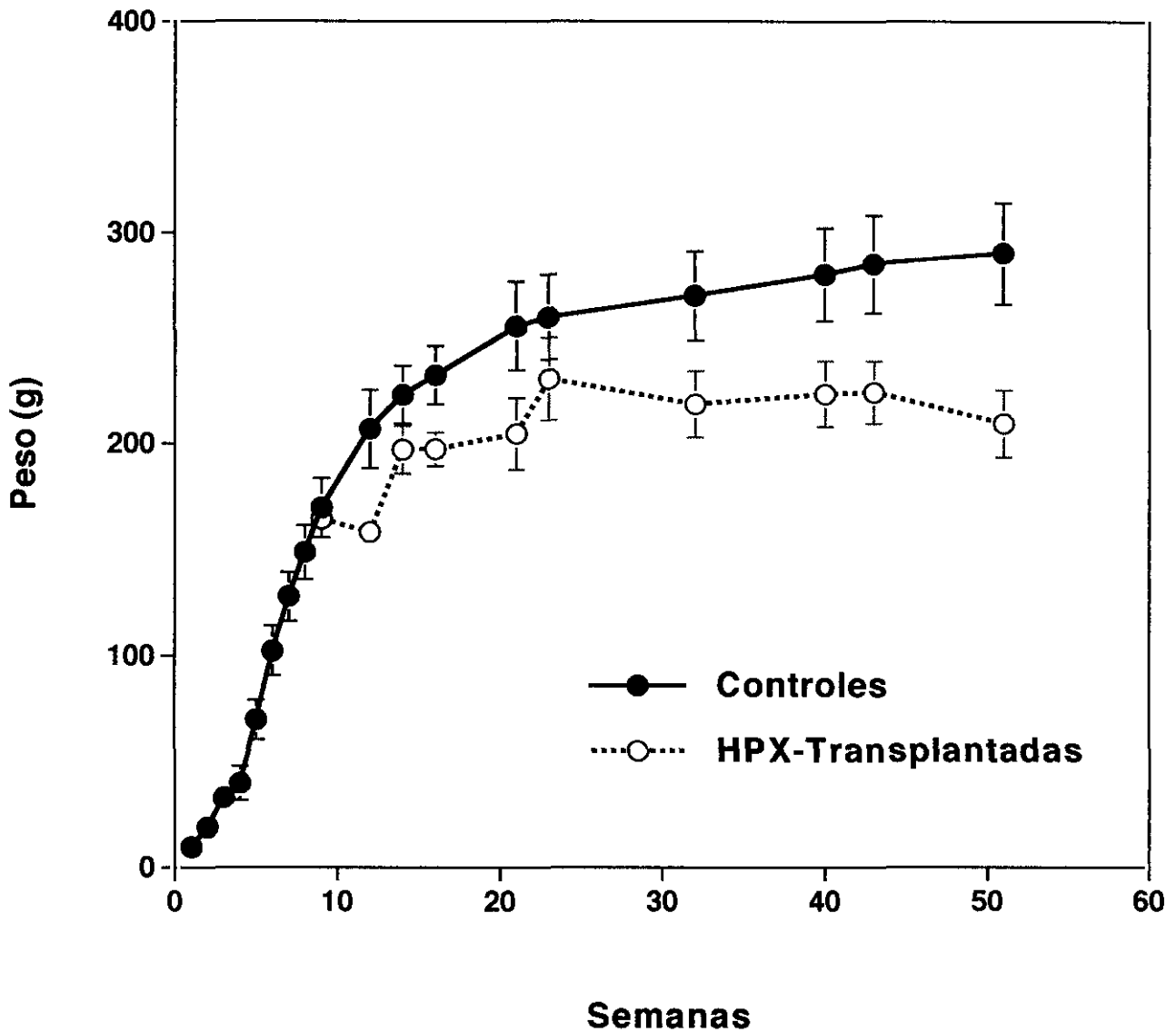


Figura 19.- Evolución del peso en ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con parótida y grasa en distintos tiempos del postoperatorio.

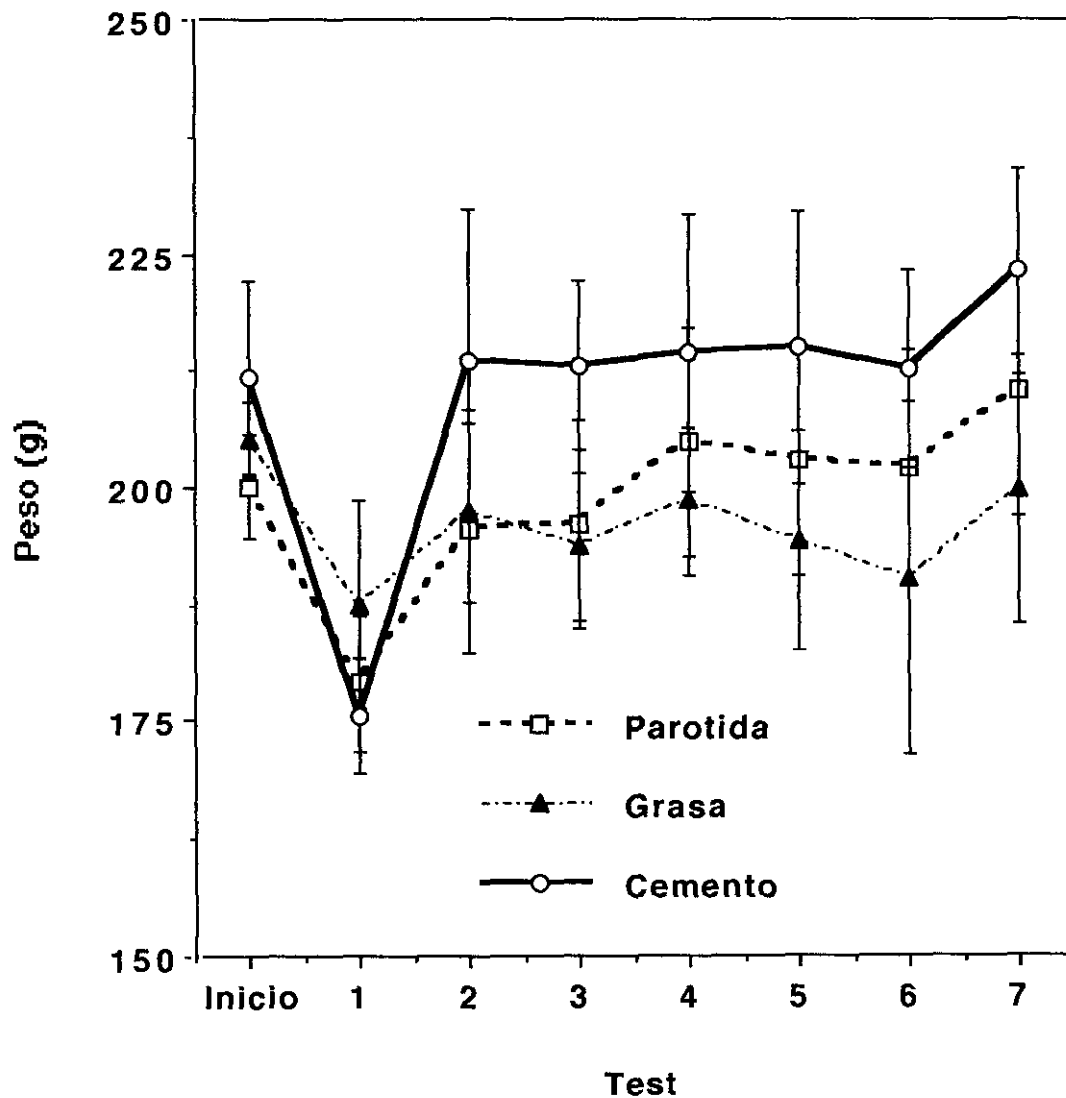


Figura 20.- Evolución del peso en ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con parótida, grasa y cemento en distintos tiempos del postoperatorio.

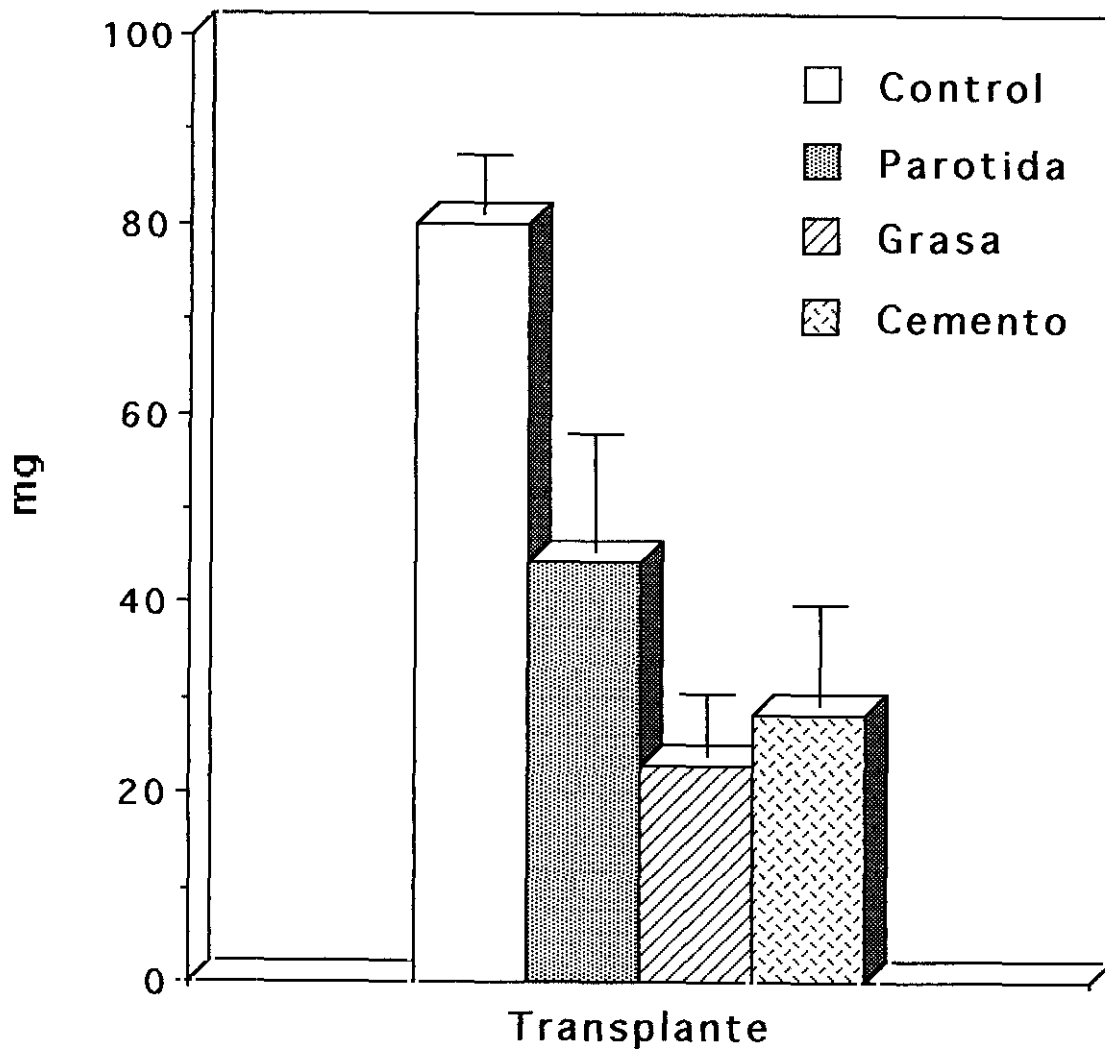


Figura 21.- Peso ovárico en ratas hembra control y en hipofisectomizadas con transplante de parótida, grasa o con cemento.

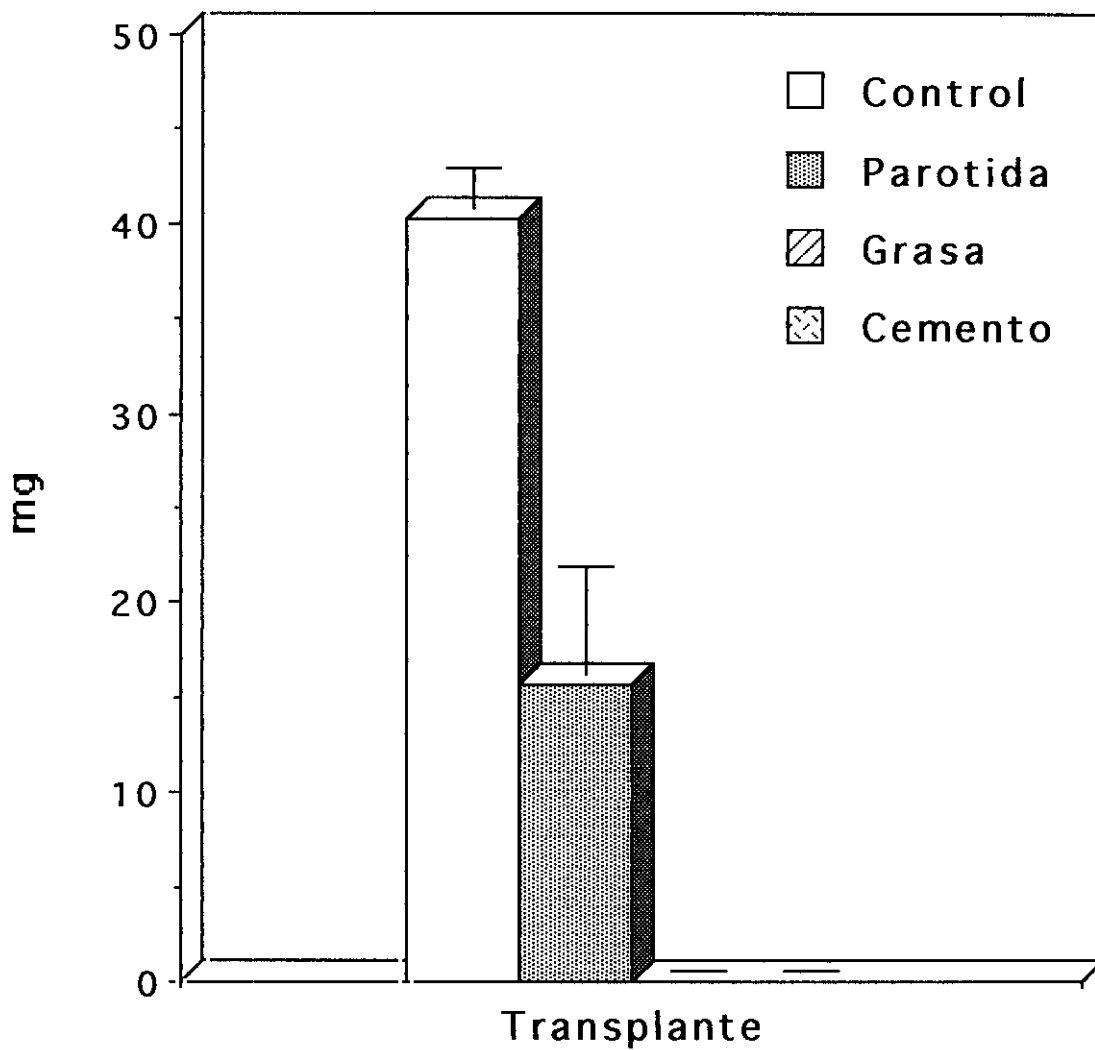


Figura 22.- Peso adrenal en ratas hembra control y en hipofisectomizadas y transplantadas con parótida grasa y cemento.

## 7.5 MEDIDAS HORMONALES.

### 7.5.1 LH.

Los niveles plasmáticos de LH tanto basales como tras estímulo con LHRH resultaron ser muy inferiores en los grupos A, B y C con respecto al grupo control en los 2 primeros meses del postoperatorio. A partir del tercer mes se detectó un incremento tanto de los niveles basales como tras estímulo con LHRH en el grupo A (Hpx-Tp) y especialmente en aquellos animales que habían presentado frotis de estro (figuras 23, 24 y 25).

En el grupo B (Hpx-Tg) es a partir del quinto mes del postoperatorio cuando comienza a detectarse un pequeño incremento de LH basal y tras LHRH pero menos significativo que en las ratas transplantadas con glándula parótida (figura 26).

No se produjo ningún incremento en el grupo C (Hpx-C).

En el tejido parotídeo transplantado a los animales del grupo A, pudo detectarse la presencia de LH, si bien el contenido de esta hormona en el transplante ( $28.8 \pm 14$  ng/mg proteína) era inferior al contenido de las hipófisis normales ( $7800 \pm 300$  ng/mg proteína), pero en todo caso superior al de la glándula parótida "in situ" donde el contenido de LH es indetectable.

### 7.5.2 GH.

Los niveles plasmáticos de GH, tanto basales como tras GRF-piridostigmina fueron prácticamente indetectables hasta la semana 36 del postoperatorio en los tres grupos experimentales estudiados.

A partir de la semana 36 del postoperatorio se observó solo en los animales transplantados con glándula parótida un incremento significativo en los niveles basales de GH cuando estos se comparan con los niveles encontrados en las primeras semanas del postoperatorio. En contraste con la elevación de los niveles basales de GH no se observó un incremento en la respuesta al estímulo con GRF-piridostigmina (figuras 28 y 29).

### 7.5.3 PRL.

Los niveles plasmáticos de PRL tanto basales como tras estímulo con TRH estaban disminuidos respecto al grupo control en los grupos A, B y C, pero al igual que ocurría con la LH, a partir del tercer mes del postoperatorio se produjo una recuperación en los niveles de PRL plasmática, tanto basales como tras estímulo con TRH en los animales del grupo A (Hpx-Tp) (figuras 30 y 31). El incremento de los niveles plasmáticos basales y tras TRH en los grupos experimentales B (Hpx-Tg) y C (Hpx-C) se produjo más tarde (a partir del quinto mes del postoperatorio) y en menor magnitud (figuras 32 y 33).

La elevación de los niveles plasmáticos de PRL como resultado del trasplante de glándula parótida en el grupo A (Hpx-Tp), se corresponde con un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) en los niveles de PRL detectados en el tejido transplantado ( $20.2 \pm 7.0$  ng/mg proteína) cuando se comparan con los de la glándula parótida "in situ" ( $1.1 \pm 0.1$  ng/mg proteína). Las hipófisis procedentes del grupo control presentaron un contenido de PRL ( $115 \pm 22$  ng/mg) muy superior al de la parótida transplantada.



#### 7.5.4 Corticosterona.

Los niveles de corticosterona plasmática comienzan a detectarse a partir de los 15 días de la operación en los animales del grupo A. Estos niveles se incrementan significativamente a partir del tercer mes del postoperatorio (figura 34), siendo claramente superiores a los niveles encontrados en los animales del grupo B, al igual que se ha descrito para LH y PRL.

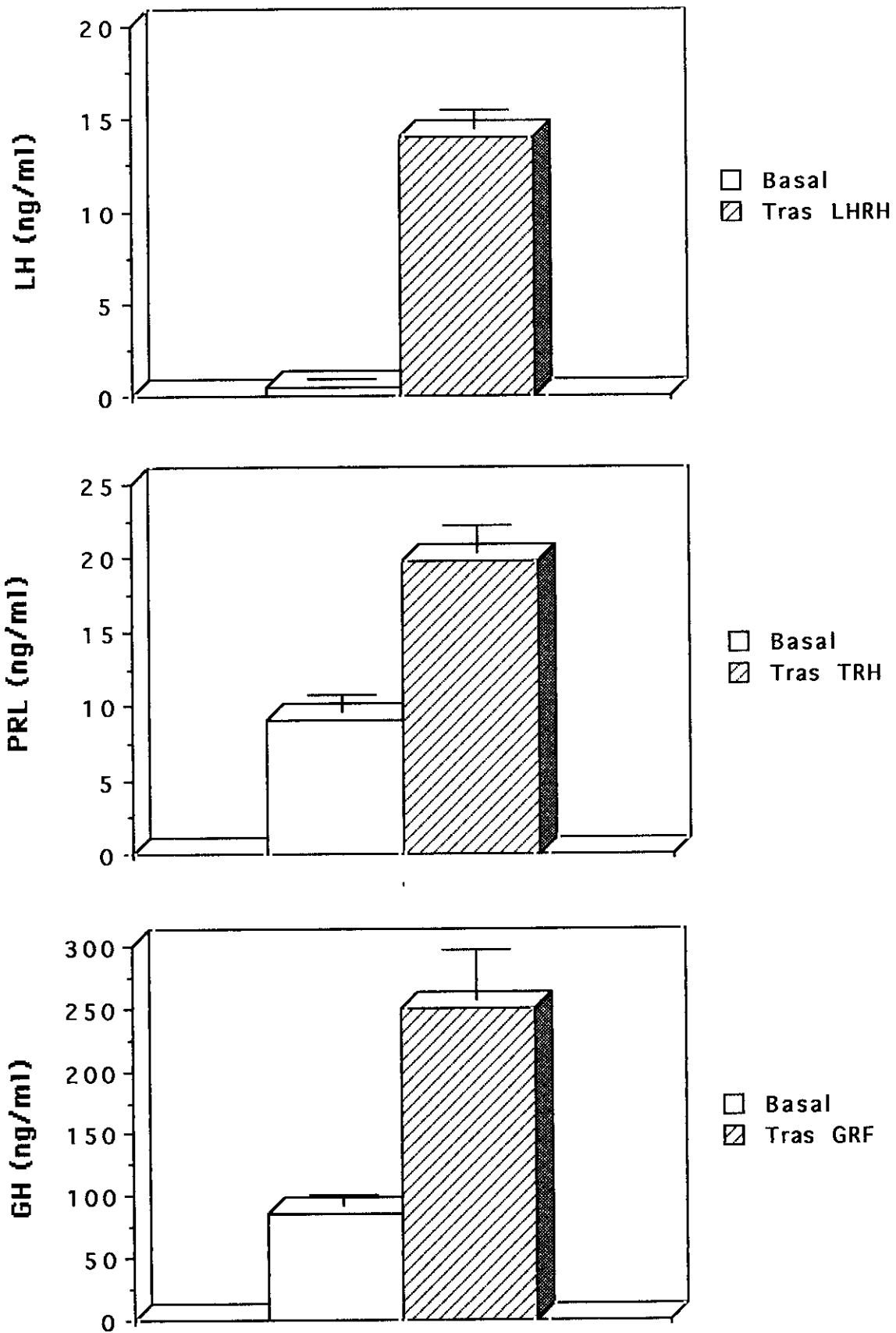


Figura 23.- Niveles plasmáticos de LH, PRL y GH en ratas hembra control.

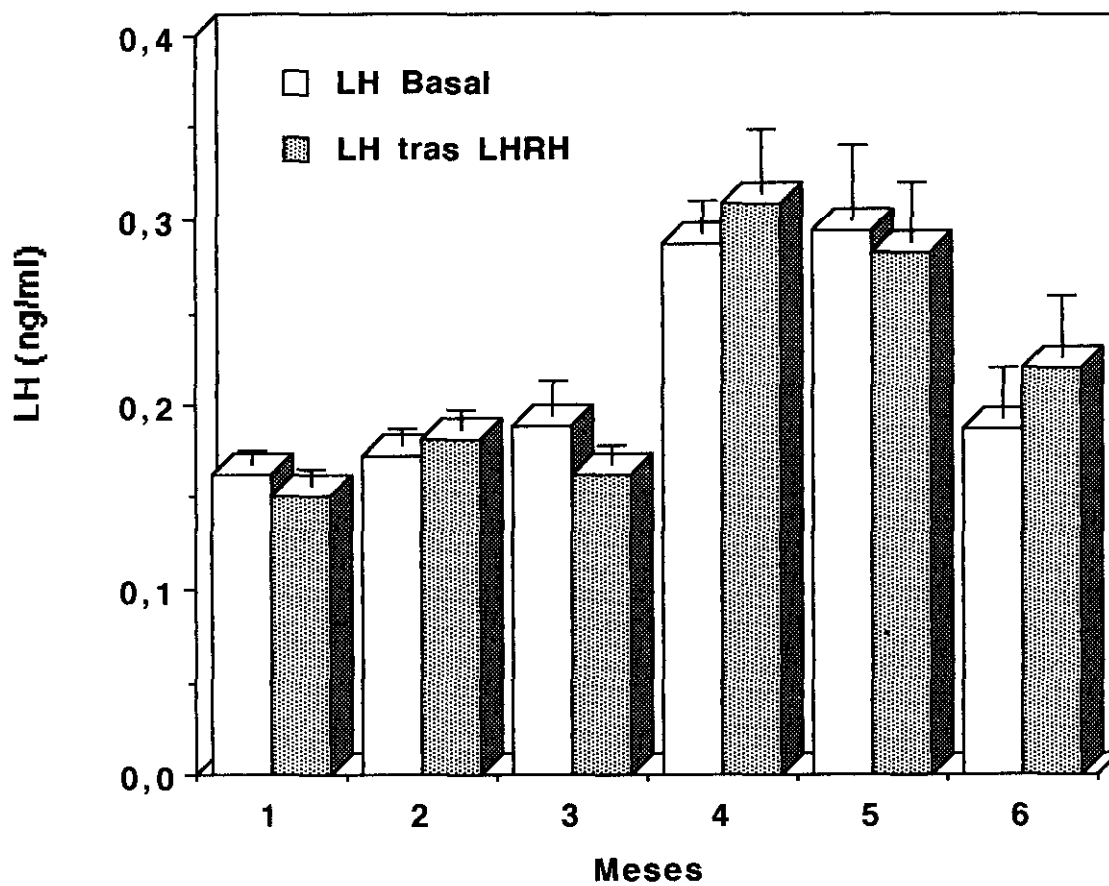


Figura 24.- Evolución de los niveles plasmáticos de LH en ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con parótida en distintos tiempos del postoperatorio.

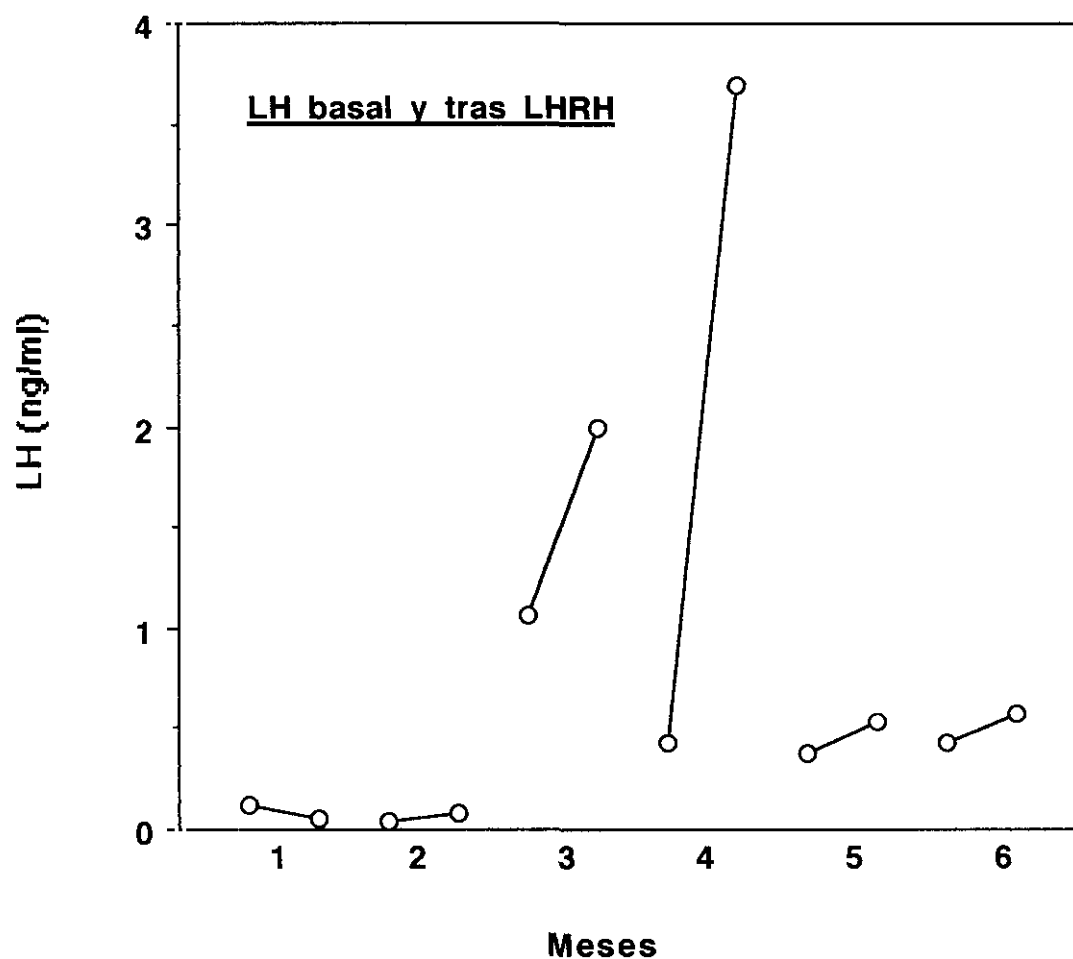


Figura 25.- Evolución de los niveles plasmáticos de LH en una rata modelo (R-15) hipofisectomizada y transplantada con parótida en distintos tiempos del postoperatorio.

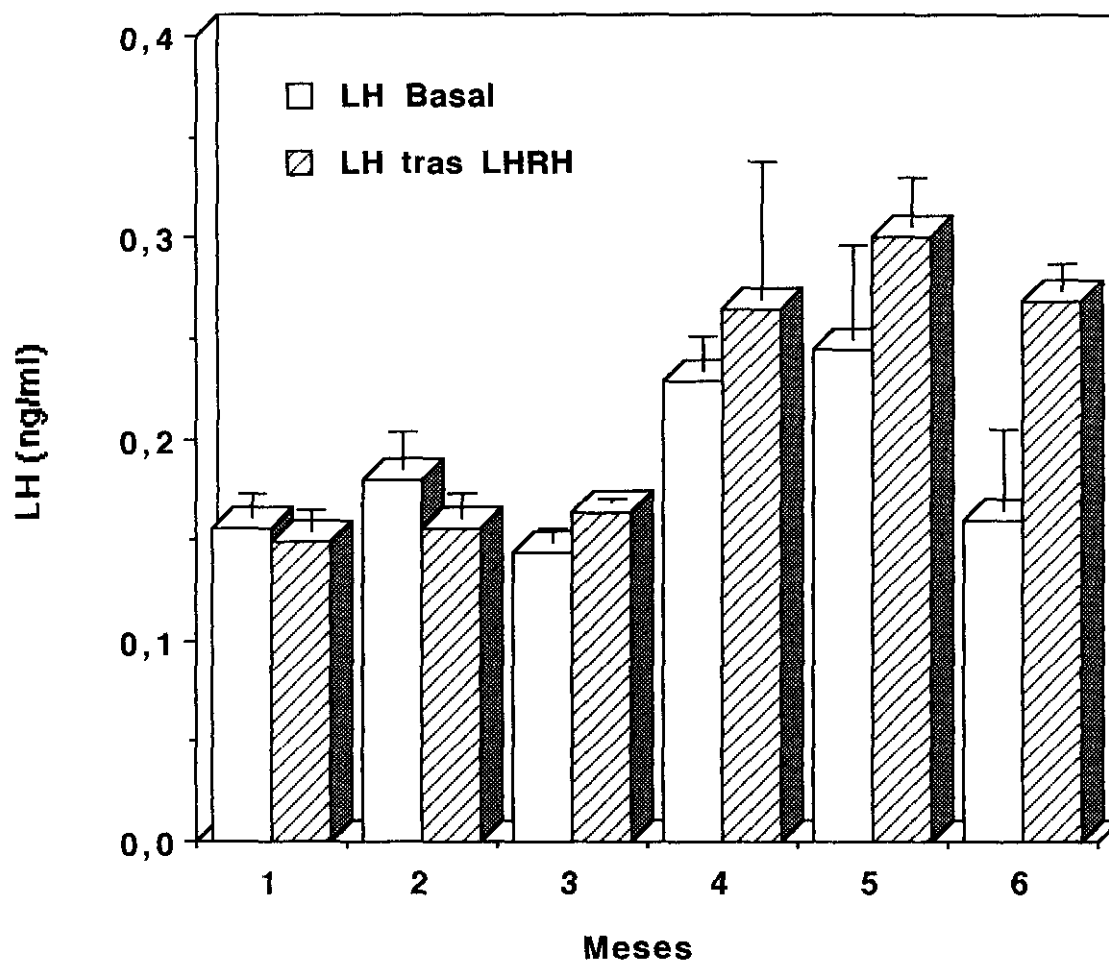


Figura 26.- Evolución de los niveles plasmáticos de LH en ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con grasa en distintos tiempos del postoperatorio.

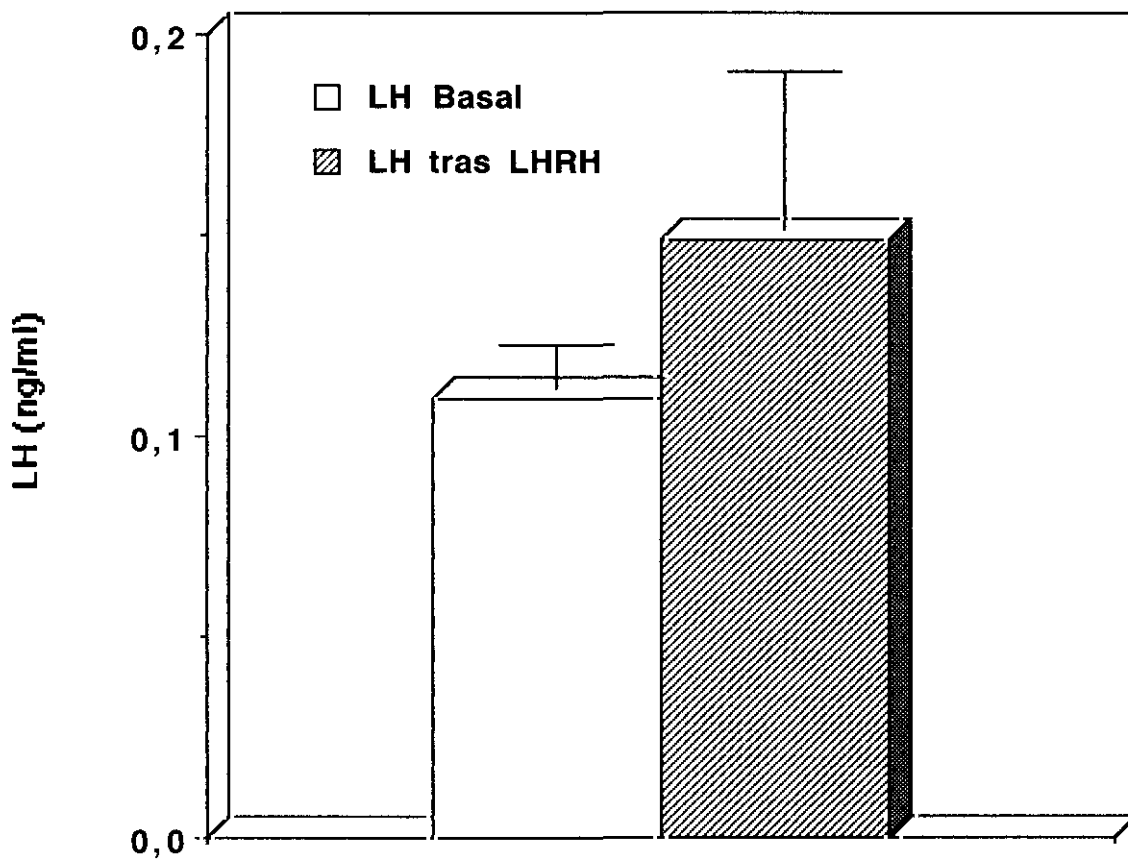


Figura 27.- Niveles de LH plasmáticos tras castración en ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con parótida.

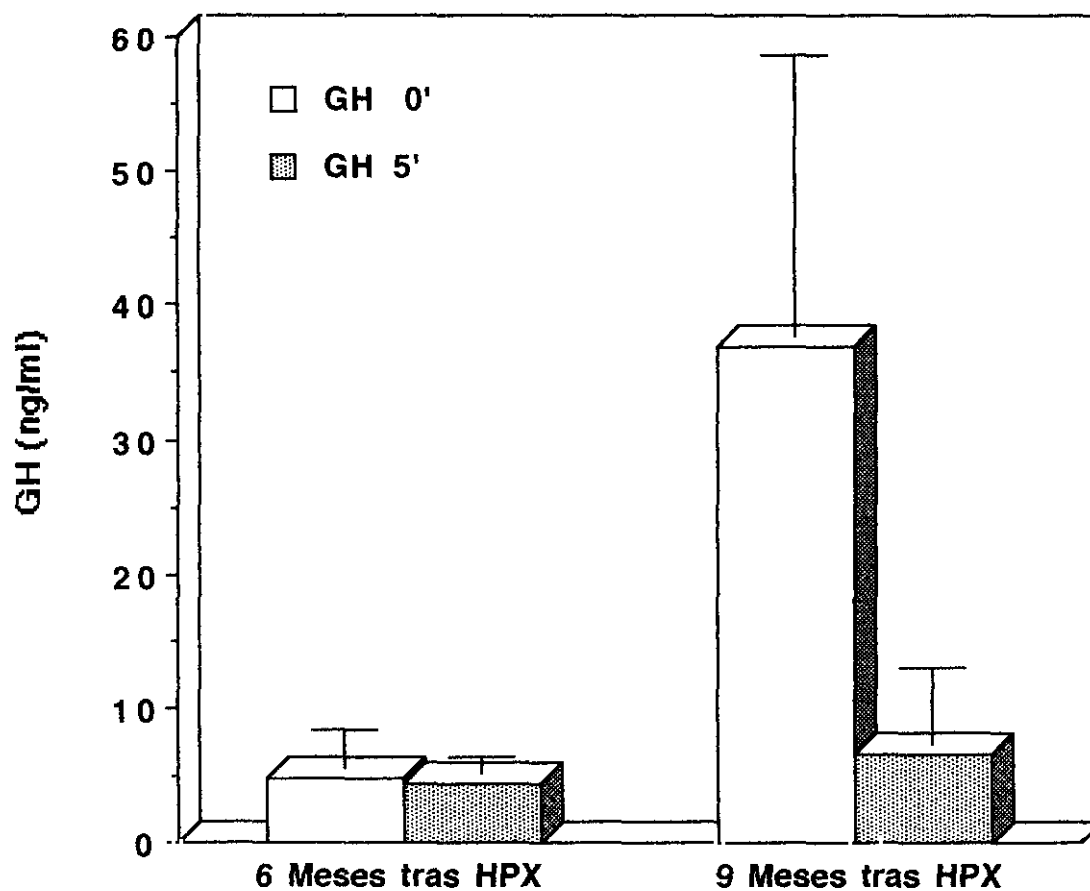


Figura 28.- Evolución de los niveles plasmáticos de GH tanto basales como tras GRF-piridostigmina en el grupo de ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con parótida.

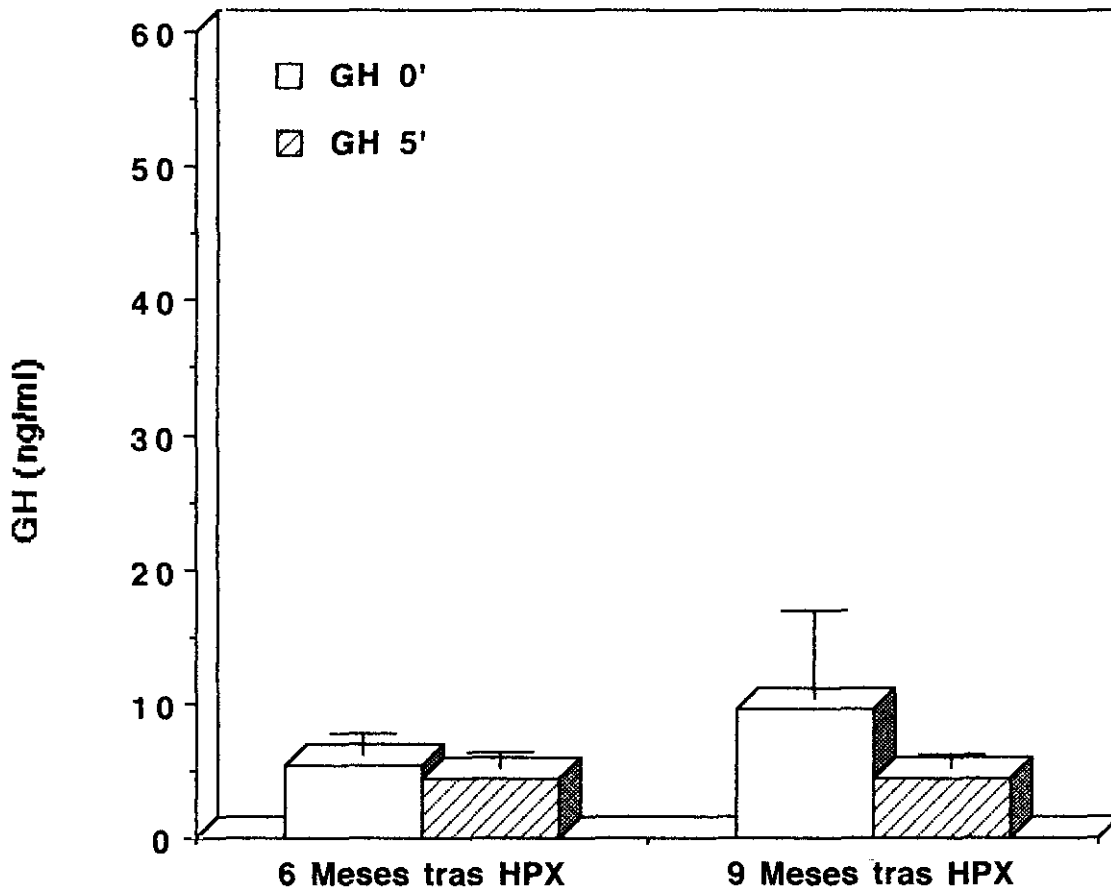


Figura 29.- Evolución de los niveles plasmáticos de GH tanto basales como tras GRF-piridostigmina en el grupo de ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con grasa.



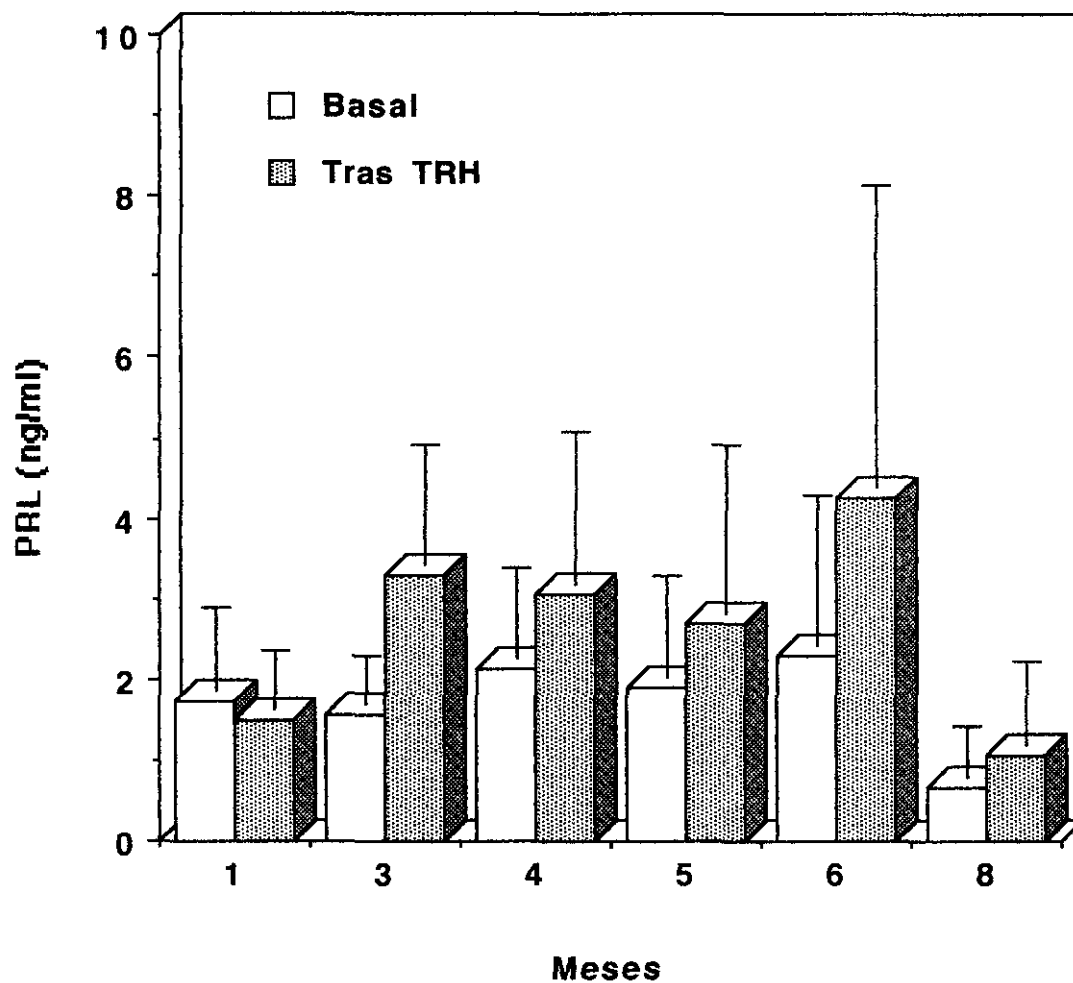


Figura 30.- Evolución de los niveles plasmáticos de PRL tanto basales como tras estímulo con TRH en ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con parótida en distintos tiempos del postoperatorio.

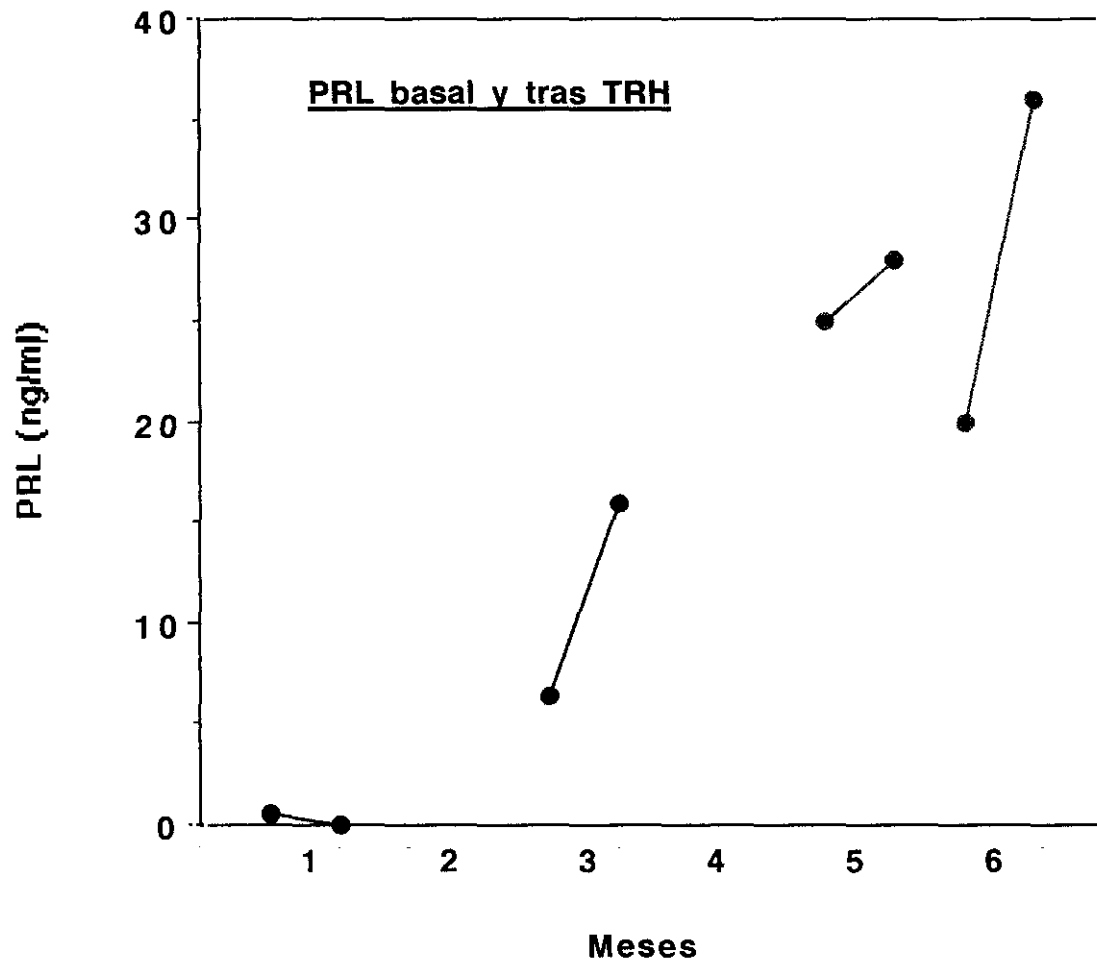


Figura 31.- Evolución de los niveles plasmáticos de PRL en una rata modelo (R-15) hipofisectomizada y transplantada con parótida en distintos tiempos del postoperatorio.

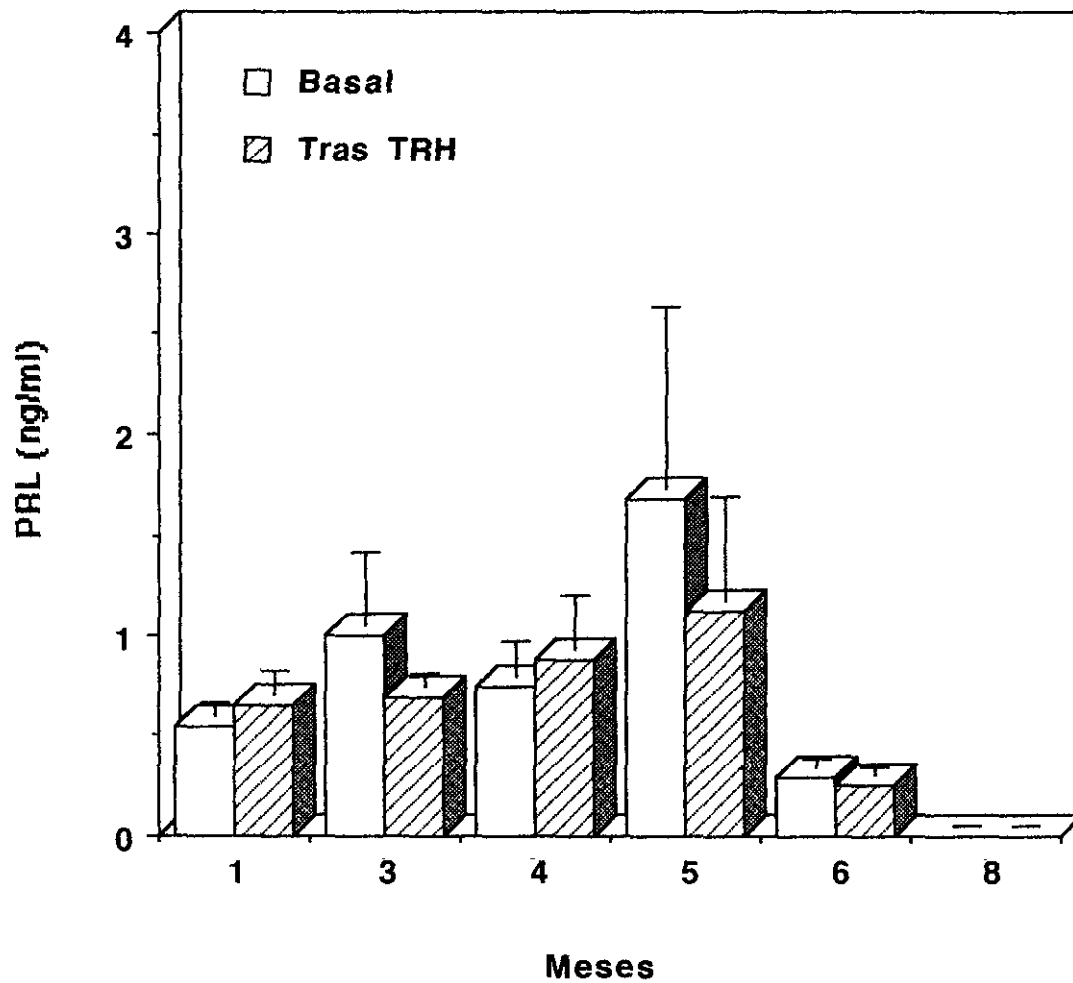


Figura 32.- Evolución de los niveles plasmáticos de PRL en ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con grasa en distintos tiempos del postoperatorio.

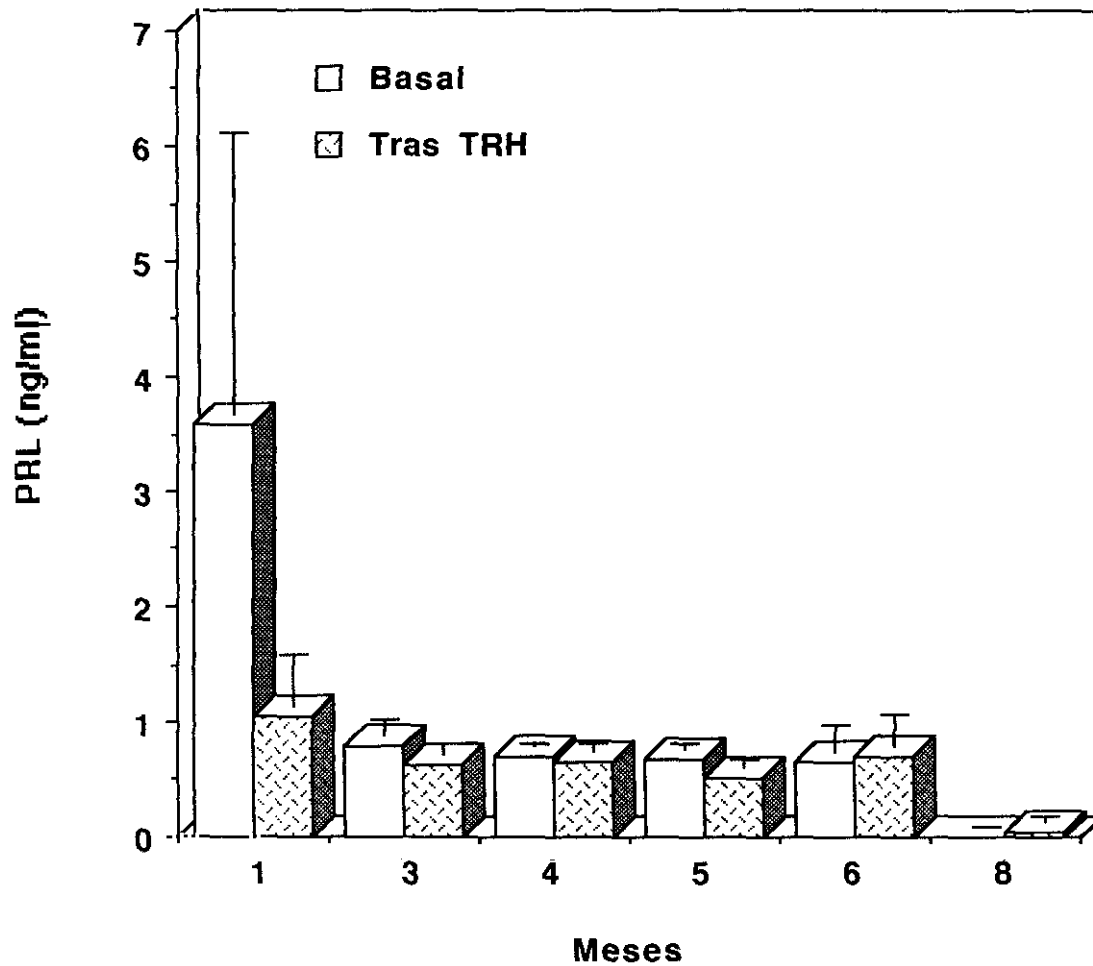
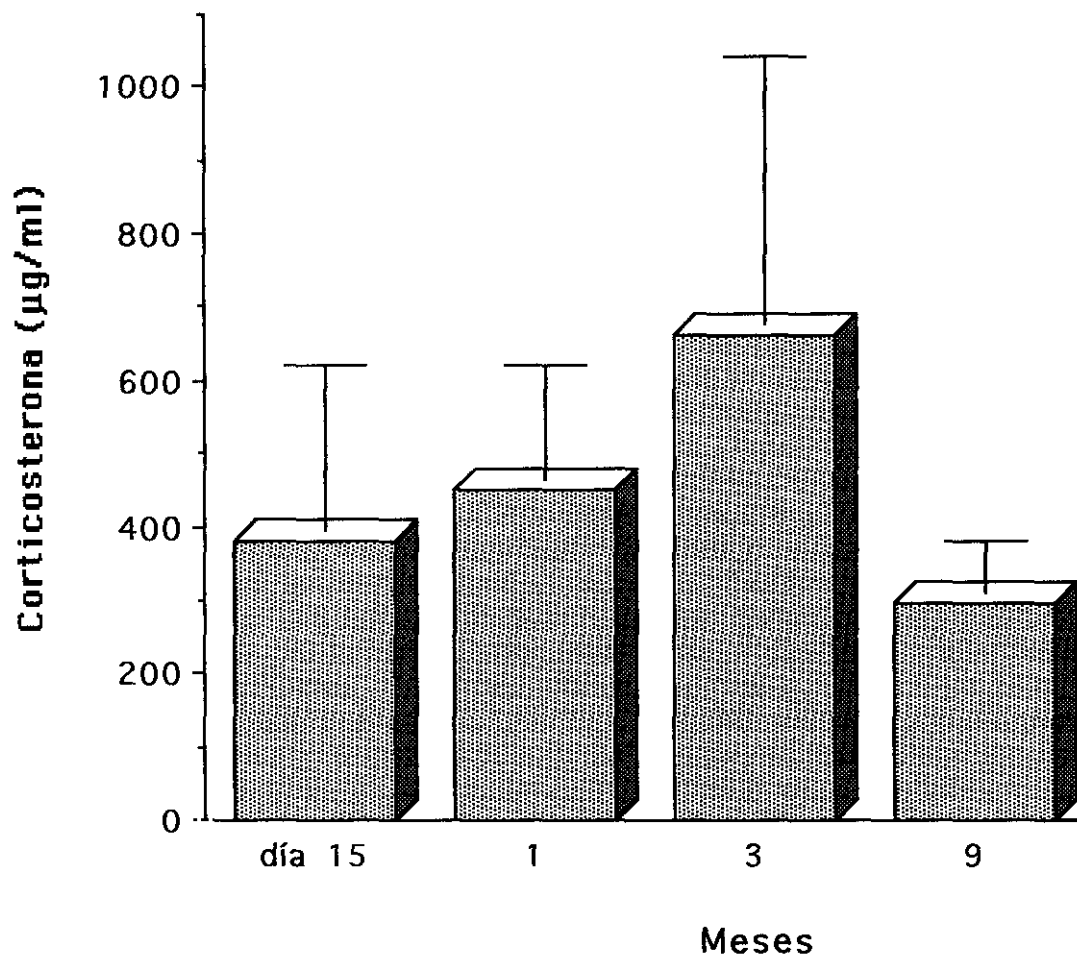


Figura 33.- Evolución de los niveles plasmáticos de PRL en ratas hembra hipofisectomizadas, con cemento, en distintos tiempos del postoperatorio.



**Figura 34.- Evolución de los niveles plasmáticos de corticosterona en ratas hembra hipofisectomizadas y transplantadas con parótida en distintos tiempos del postoperatorio.**

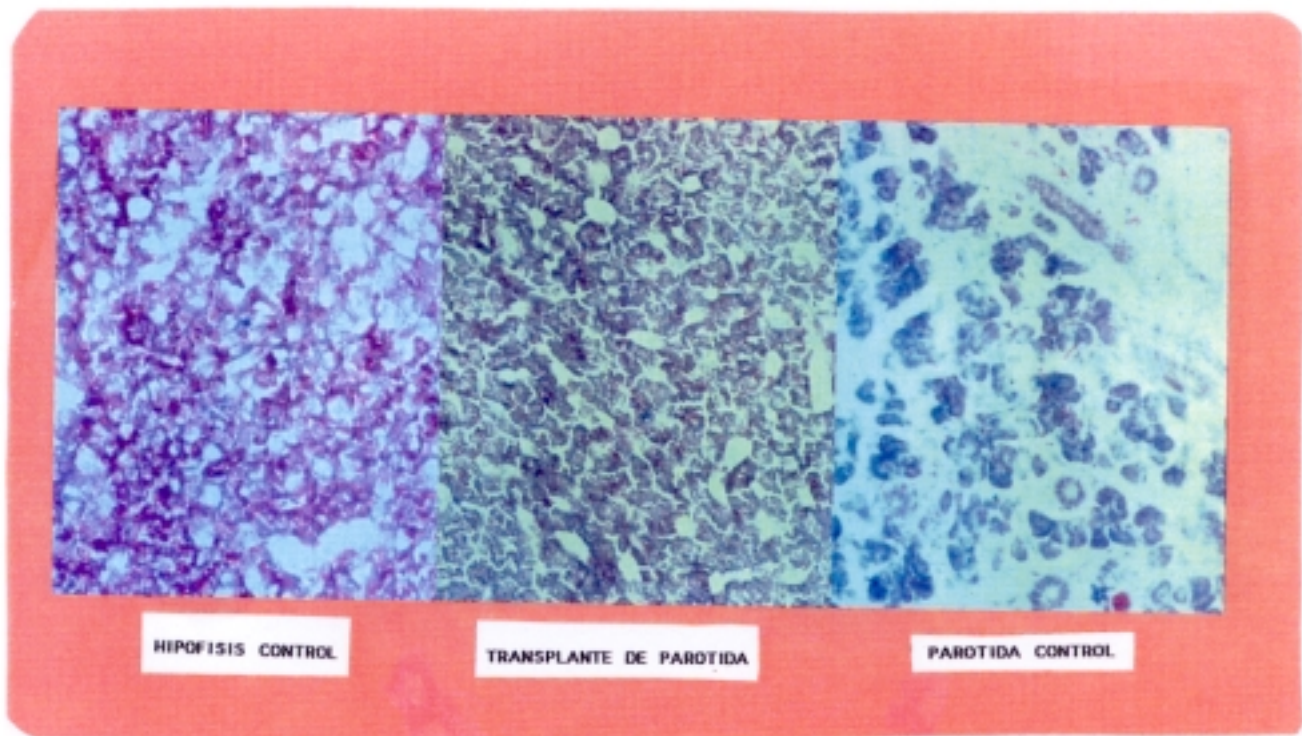
#### 7.5.5 Análisis histológico e inmunohistoquímico.

El análisis histológico convencional de la porción de parótida transplantada, utilizando las técnicas de Gomori, mostró cambios en la estructura de la parótida a las 35 semanas de la operación.

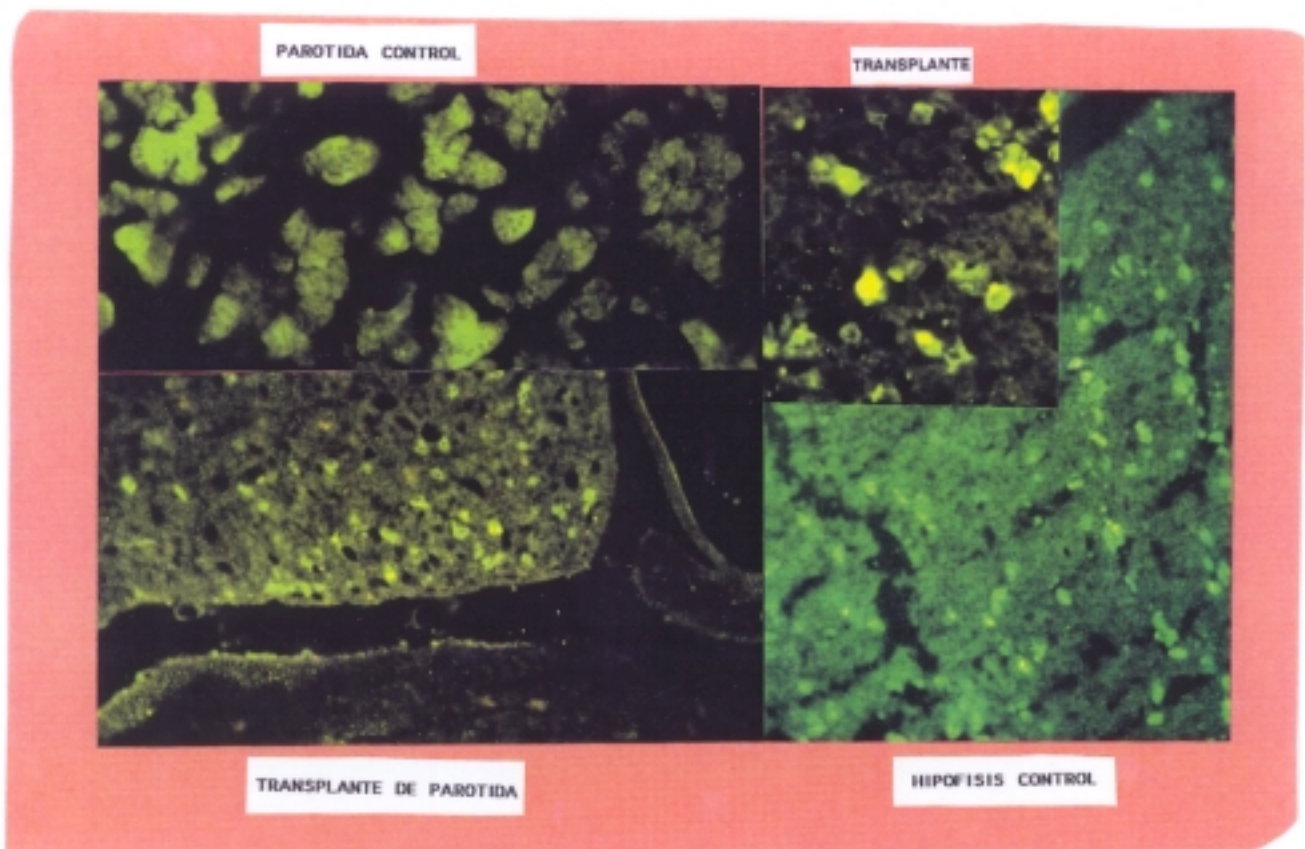
Se detectó el mantenimiento de las estructuras acinares propias de la glándula salival y la presencia de conductos excretores. Así mismo se observó que las células glandulares eran eosinófilas, al igual que las células hipofisarias.

Estas modificaciones estructurales, en el caso de algunos transplantes solo aparecen en forma de restos o nidos celulares dentro de áreas de tejido necrosado.

El uso de técnicas de inmunohistoquímica permitió la detección de células inmunorreactivas para LH, TSH, PRL y GH en las parótidas transplantadas. Las células de la parótida "in situ" no presentaron inmunoreactividad para estas hormonas mientras que en las hipófisis de los animales del grupo control se observó claramente la presencia de inmunoreactividad para todas estas hormonas (LH, TSH, PRL y GH) (figuras 35, 36, 37 y 38).

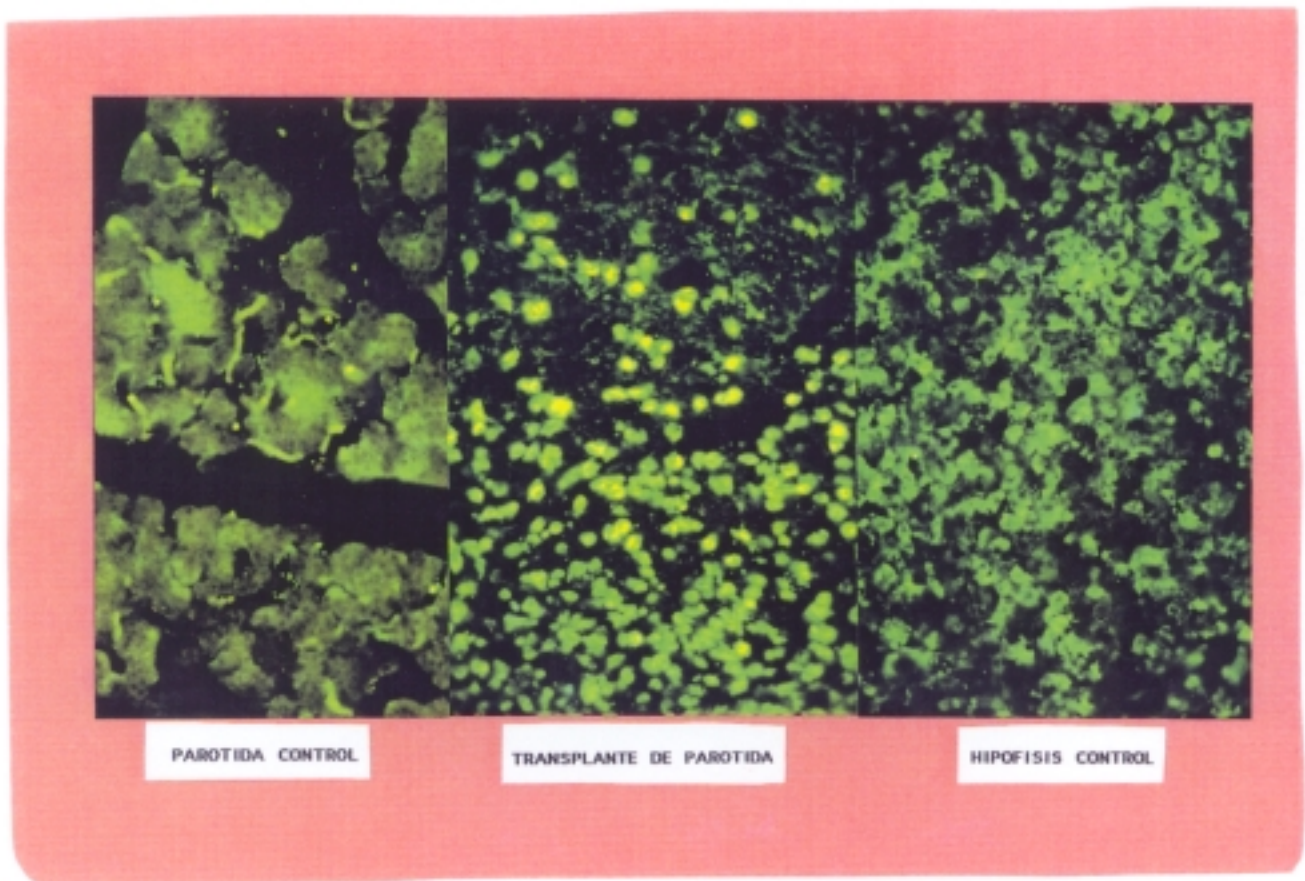


**Figura 35.- Estructura histológica de hipófisis control, parótida control y transplante de parótida teñidos por el método de Gomori.**

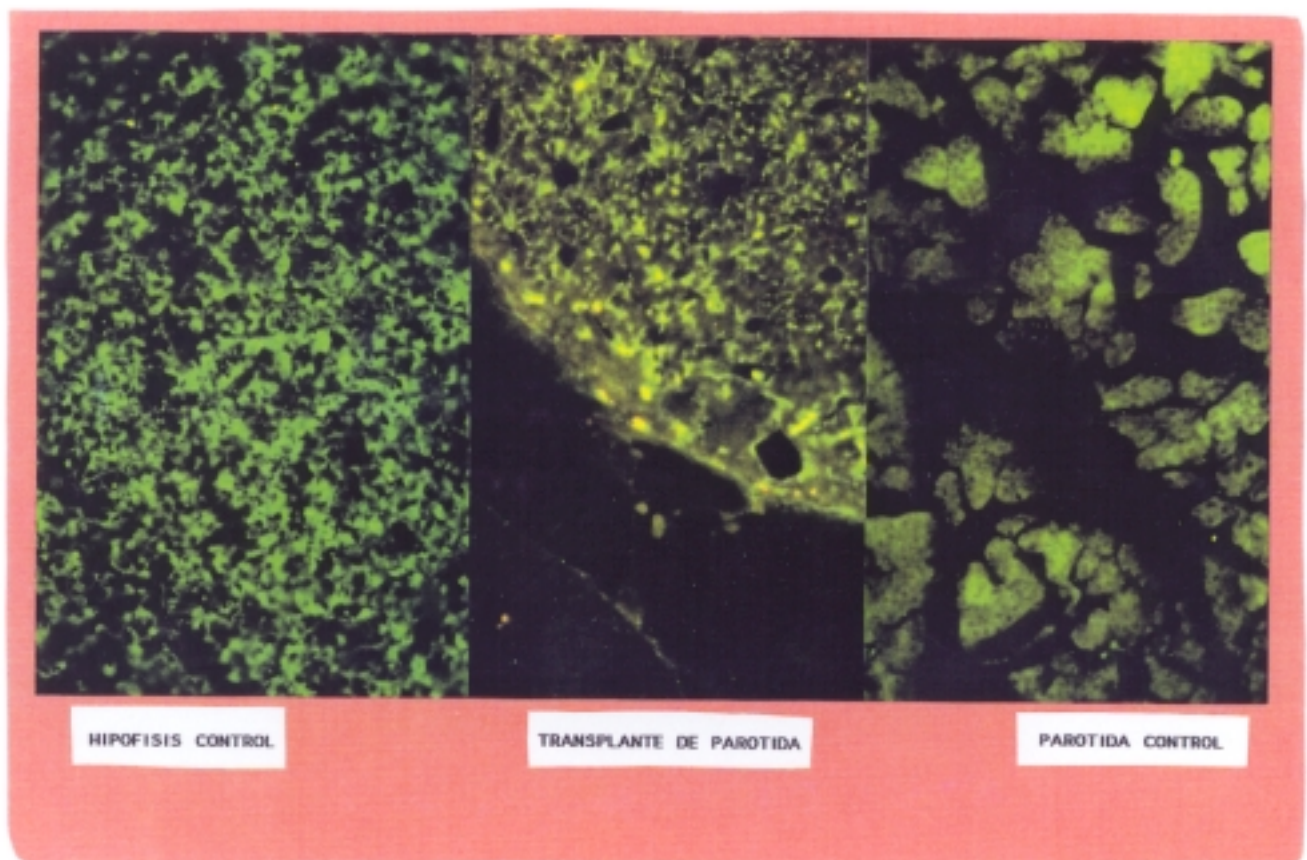


**Figura 36.- Tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-LH en hipófisis control, parótida "in situ" y transplante de parótida.**

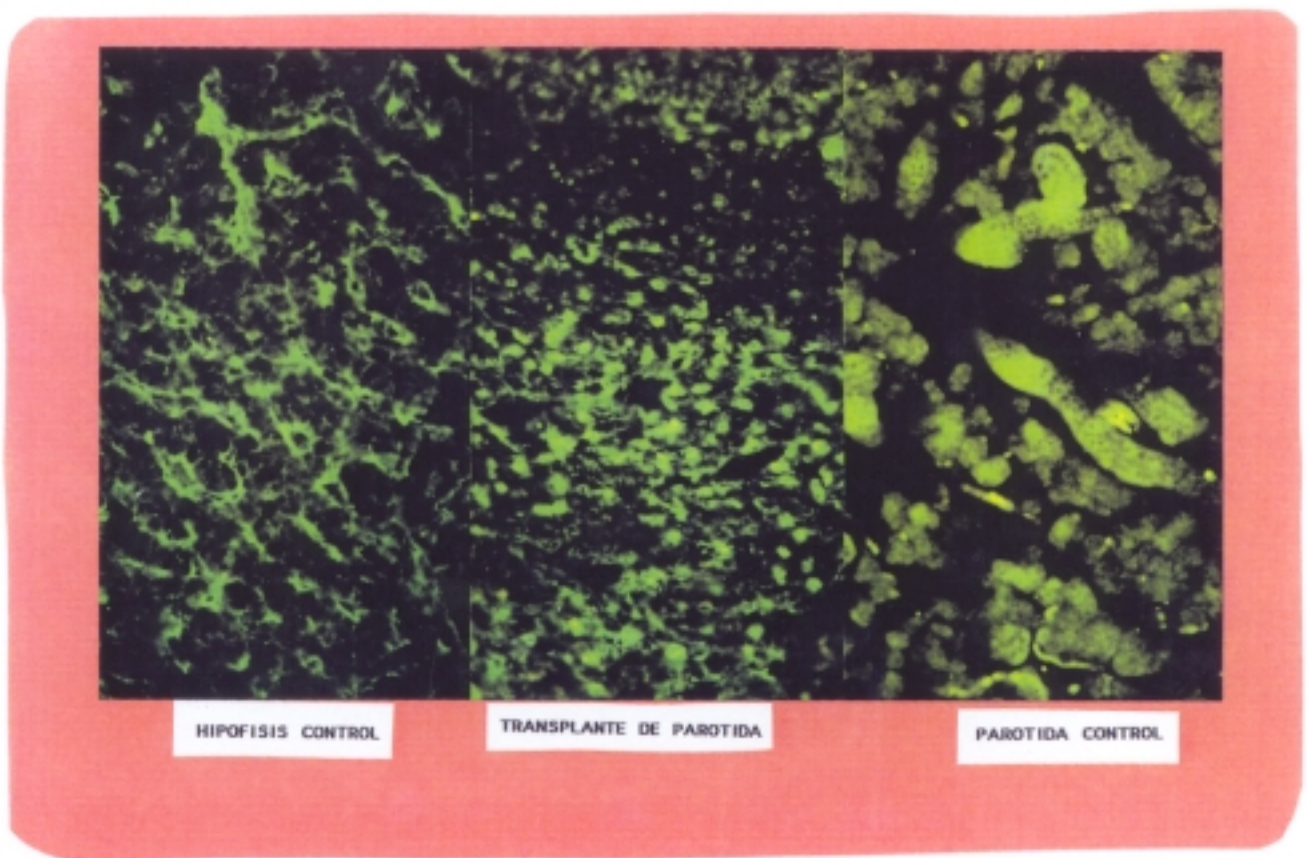




**Figura 37.- Tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-GH en hipófisis control, parótida "in situ" y transplante de parótida.**



**Figura 38.- Tinción Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-PRL en hipófisis control, parótida "in situ" y transplante de parótida.**



**Figura 39.- Tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-TSH en hipófisis control, parótida "in situ" y transplante de parótida.**

## **8.DISCUSION**

El estudio de ratas hipofisectomizadas ha jugado un papel central para explicar las funciones de la hipófisis, del hipotálamo y de los tejidos diana hipofisarios.

El primer paso fundamental, pero también el más difícil para conseguir el objetivo de nuestro trabajo, fué la puesta a punto de la hipofisectomía por vía parafaringea con control microscópico ya descrita ampliamente en la pag. 67, así como la sustitución inmediata de la hipófisis en el mismo acto quirúrgico por un fragmento de glándula parótida.

Dadas las diferencias anatómicas en las distintas especies animales, se hizo necesario desarrollar una técnica de hipofisectomía particular para cada especie. La hipofisectomía por vía parafaringea se realizó por vez primera en 1930 por Smith, sin embargo una descripción detallada y clara de esta técnica en la rata no se ha encontrado en la literatura hasta la fecha, el método empleado en nuestros estudios se basa en comunicaciones personales de Alvarez-Buylla.

Las principales ventajas de la hipofisectomía por vía parafaringea sobre otras ya conocidas (Dandy y cols., 1911, Houssay, 1936, Shealy y cols., 1963, Zarrow y cols., 1964, Jacobson, 1966 y Waynforth, 1980) incluyen:

- El tipo de anestesia. El pentobarbital ha sido utilizado con buenos resultados por distintos autores, incluido Alvarez-Buylla. Nosotros probamos distintos tipos de anestésicos (nembutal, pentobarbital, tribromoetanol) seleccionando tras muchas pruebas el TBE que a la dosis apropiada en relación al peso del animal (2.5 g/100 ml de solución salina, tomando 1 c.c./100 g de peso, vía intraperitoneal) no generó efectos indeseables y su duración fué suficiente para cubrir el tiempo que lleva el acto quirúrgico.

- La intubación endotraqueal, a través de la boca del animal con



aplicación de ventilación artificial, proporciona una mayor probabilidad de éxito en el acto quirúrgico. Para asegurar que la intubación ha sido correctamente realizada, se acopla un fragmento de papel de baja densidad (de fumador) de 5x5 mm (figura 9.11) al extremo de un hilo. Una vez colocado ante la cánula correctamente colocada, el papel se moverá al ritmo de la respiración del animal.

- La apertura amplia del hueso y de la duramadre con control microscópico, permite una perfecta aspiración de la hipófisis que se extrae íntegra con el tallo hipofisario, y que con cualquier otra técnica descrita sería imposible de conseguir en la rata.

Este paso es primordial dado que el orificio de acceso a la hipófisis se debe realizar con toda perfección, no solamente en cuanto a situación (perfectamente centrado, 1 mm por delante de la sincondrosis esfeno-occipital) (Figura 12) sino también en cuanto al manejo de la broca, evitando que esta sobrepase la compacta, ya que si esto ocurre, se rompería la duramadre y se trituraría la hipófisis, pudiendo facilitar hemorragias del seno esfenoidal y cavernoso.

Por tanto una vez visualizada la compacta, se retira la broca y se procede a levantar esta fina capa con un periostomo o excavador de dentista hasta que queda a la vista la duramadre. El exquisito cuidado de la técnica evita la hemorragia, pero si esta se produce, se reduce fácilmente con tapones de "espongostan".

Es imprescindible pulir muy bien los bordes del orificio y así ampliar también su diámetro para que en el momento de aspirar la hipófisis, esta salga más fácilmente sin romperse. La duramadre también se abre ampliamente en cruz con la aguja de meninges para facilitar en la aspiración la salida de la hipófisis íntegra con el tallo (Alvarez-Buylla, comunicación personal).

Antes de conectar el aspirador se le coloca una trampa de malla

(figura 11) donde queda atrapada la hipófisis una vez aspirada, de este modo puede verse perfectamente la glándula bien directamente y bajo control de microscopio para asegurarnos de su integridad.

En un paso siguiente, y con la silla turca totalmente vacía, tomamos la aguja de meninges y abrimos la tienda de la hipófisis pudiendo observar perfectamente como la salida de líquido cefalorraquídeo totalmente transparente cubre el suelo de la silla y cesa espontáneamente, secándolo con un tapón de espongotan. En este momento, y con un campo quirúrgico perfectamente visible y limpio, se procede al transplante de una fracción de la glándula parótida nunca superior en tamaño al doble de la hipófisis.

La elección del tejido de glándula parótida se realizó en base a que aunque la parótida es una glándula de secreción externa a diferencia de la hipófisis que es una glándula de secreción interna, ambas, la parótida y la hipófisis tienen un origen embrionario común, es decir, que ambas proceden del ectodermo. Por tanto nos basamos en los estudios publicados por numerosos autores que indican claramente que la diferenciación celular depende del medio en que se desarrollen los elementos, así como de la acción de una serie de agentes inductores externos de las células (Patterson, 1977, Mackeehan, 1982).

La posibilidad de cambios morfofuncionales de una célula parotidea a célula hipofisaria se llevaría a cabo siempre que la vía de vascularización haga llegar al tejido transplantado las neurosecreciones capaces de inducir esos cambios.

En 1962 se descubrió en la glándula parótida el EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) y un año más tarde (1963), Alvarez-Buylla publica su primera referencia sobre el transplante de glándula parótida sugiriendo que este factor de crecimiento contenido en dicha glándula

podría promover el crecimiento y la diferenciación celular. Un dato más que sumado a la vascularización hipotalámica que irriga el tejido parotideo transplantado podría facilitar esos cambios morfofuncionales de las células parotideas a células hipofisarias. Además de este factor de crecimiento se han encontrado en la parótida otros péptidos como SS, VIP y PRL. Todos estos factores pueden hacer posible que en una especial circunstancia, las células parotideas puedan ser capaces de transformarse y secretar hormonas hipofisarias.

A propósito de este hecho cabe mencionar aquí el caso de un paciente que ingresa en el hospital "La Paz" (Madrid) y es diagnosticado de Enfermedad de Cushing por ACTH ectópica. Después de muchos estudios y múltiples pruebas diagnósticas se detectó el tumor primario que era origen de la hipersecreción de ACTH y concretamente estaba en la glándula parótida; lo que confirma la posibilidad de este tejido para presentar cambios morfofuncionales en este sentido (Alvarez-Buylla y cols., 1963).

El transplante de otros tejidos que no sean glándula parótida también se ha intentado por Alvarez-Buylla y su grupo en estudios previos. En 1974 este grupo probó seis epitelios glandulares diferentes (adrenal, hígado, páncreas, tiroides, ovario y testículo). Los resultados con adrenal, hígado, páncreas y tiroides no fueron suficientemente satisfactorios como para llevar a cabo estudios posteriores. Por otro lado los trasplantes de tejido ovárico y testicular provocaron una marcada disminución de la función gonadotropa hasta un nivel inferior al de los animales hipofisectomizados. Así mismo el transplante de tejido tiroideo disminuyó la función tiroidea incluso por debajo de la de los animales hipofisectomizados. Cuando el transplante se realiza con tejido graso (Alvarez-Buylla y cols., 1970b) la supervivencia de los perros fue tres veces mayor que en los perros hipofisectomizados sin



transplante, pero el resto de los parámetros estudiados están muy por debajo del alcanzado en el caso del transplante de parótida (Alvarez-Buylla y cols., 1970a).

Antes de iniciar la hipofisectomía hay que disecar bien la parótida cuidando mucho de no lesionar sus conductos excretores, fundamentalmente el conducto excretor principal. Se secciona un trozo no superior al doble del tamaño de la hipófisis y se mantiene aislado en suero salino hasta el momento mismo de iniciar el transplante (técnica ya descrita en pag. 67). Es muy importante que el volumen de tejido parotideo transplantado no sea excesivo pues en caso contrario se produciría una compresión hipotalámica que podría dificultar la vascularización del transplante con invasión de tejido fibroso (Alvarez-Buylla, comunicación personal). Esto sospechamos que es lo que ha ocurrido en algunos de los animales estudiados con inmunocitoquímica dado que aparecen áreas de necrosis dentro del transplante, aunque dentro de ellas se observan ciertos nidos de células reactivas para LH, GH, PRL y TSH (figuras 36,37,38 y39).

La superficie de contacto entre el hipotálamo y el transplante debe ser la vía de vascularización que hace llegar al epitelio transplantado neurosecreciones capaces de inducir su diferenciación hasta hacerlo capaz de sustituir parcialmente algunas de las funciones de la hipófisis extirpada. Para garantizar que la única vía de vascularización sea la hipotalámica, es de capital importancia, una vez realizado el transplante, aislarlo totalmente cerrando el orificio con un tapón de silastic (Dow Corning) para evitar la vascularización proveniente del hueso lesionado y sus estructuras anejas, siguiendo la técnica de Alvarez-Buylla. En la sangre sistémica todas estas neurosecreciones se encuentran a concentraciones muy bajas y posiblemente no sean

capaces de ejercer una función de transformación.

De los experimentos de Alvarez-Buylla y cols. (1963, 1964ab, 1970abc, 1974 y 1979) así como de nuestros propios trabajos, se deriva una importante cuestión: si los efectos observados fueron debidos a la inducción de las células de la parótida (posiblemente bajo el efecto de factores hipotalámicos) o a un efecto indirecto sobre células adenohipofisarias remanentes dejadas en el tallo que podrían haber sido estimuladas por la abundante circulación producida por la reacción inflamatoria alrededor del trasplante.

Hay que tener en cuenta que no es lo mismo una hipofisectomía quirúrgica por una aproximación auricular en la rata, que una hipofisectomía por vía parafaringea (Walker y cols., 1950, Zarrow y cols., 1964), con la cual conseguimos un acceso amplio y una visión perfecta de la glándula que puede salir íntegra con su tallo y sin ninguna hemorragia, pudiendo ser examinada a simple vista y con el microscopio.

La única vía de vascularización posible es la hipotalámica como se ha descrito anteriormente. Para evitar la reacción inflamatoria, el edema y la posible infección en el postoperatorio, los animales se trataban con una dosis de 60.000 U i.m. de penicilina G retardada y 80  $\mu$ g/ml de dexametasona s.c.. La dexametasona se mantiene en dosis decrecientes durante la primera semana del postoperatorio, pasada la cual se mantiene otros siete días con suero glucosalino pasando después a agua "ad libitum". Por ser el tejido transplantado del mismo animal, no hay porqué esperar reacciones de rechazo.

Alvarez-Buylla doce horas antes de la operación aplicaba a los animales ampicilina en el agua de bebida (50 mg/500 ml). Nosotros en el preoperatorio inmediato solo aplicamos sulfato de atropina (1 g/ml) a

la dosis de 0.01 ml i.m. para evitar o al menos disminuir las secreciones nasotraqueales que son una de las complicaciones más frecuentes que se dan en el postoperatorio.

Si la hipofisectomía se realiza por una aproximación craneal, la situación es diferente, porque lo que se produce es una ablación total del lóbulo posterior y la parte inferior del tallo. También se elimina la mayor parte del lóbulo anterior, pero uno o ambos de sus polos laterales pueden permanecer, sobre todo si se produce una fuerte hemorragia del seno cavernoso (hecho muy frecuente cuando la vía utilizada no es la parafaringea) durante la operación. El polo lateral remanente sobrevive porque aun queda aporte sanguíneo procedente de la arteria capsular inferior (Adams y cols., 1966, Daniel y cols., 1958, 1959, Beck y Daniel, 1959).

Estas situaciones no suelen darse cuando se utiliza la vía parafaringea y menos cuando se hace bajo control microscópico.

Una vez realizadas las operaciones los animales así tratados fueron seguidos durante varios meses, y de los datos obtenidos puede deducirse que:

En el estudio de los frotis vaginales para poder determinar el primer estro postcirugía se observó que así como el 65% de las hembras controles tenían ciclos regulares, el 100% de las hembras hipofisectomizadas y transplantadas mantuvieron un estado de diestro permanente, pero a partir del tercer mes postcirugía, el 15% de las hembras hipofisectomizadas y transplantadas con glándula parótida comenzaron a presentar estados de proestro y estro de manera ocasional, mientras que los otros dos grupos continuaron en diestro permanente.

Resulta interesante el hecho de que a partir del tercer mes del trasplante sea cuando aparezcan todos los cambios funcionales, los animales comienzan a mostrar algún estro, niveles hormonales de LH, GH, PRL y corticosterona se detectan en plasma y hay respuesta a algunos estímulos hormonales. Estos tres meses, podrían relacionarse con el tiempo que tarda la célula parotidea adulta para desdiferenciarse en las primeras semanas tras la operación antes de que se establezca la neovascularización hipotalámica como ya sugirió Alvarez-Buylla en 1973. Este autor y su grupo observaron en las perras transplantadas con parótida una normalización casi total de los ciclos estrales así como la producción de espermatozoides en el macho, pero hay que tener en cuenta que el grupo de hembras que estudiaron estos autores lo siguieron entre uno y dos años obteniendo un valor estrogénico promedio de todos los animales.

Hay que considerar también que en las perras el periodo entre los picos del estro es variable y relativamente largo (seis meses o más) produciéndose muchas fluctuaciones del valor estrogénico durante los periodos de metaestro y diestro, lo que se llaman variaciones intercíclicas. El ciclo de las ratas es muy diferente al de las perras, 4 a 5 días y el estro se produce en el tercer día del ciclo.

Ademas es muy posible que existan diferencias importantes debidas tanto a la propia técnica quirúrgica aplicada a perros o ratas, como al hecho de que los sistemas de control hipotalámico no funcionan de forma idéntica en los dos tipos de animales (Alvarez-Buylla y cols., 1973, 1979).

Nuestros resultados en cuanto a la supervivencia de los animales concuerdan con los de Alvarez-Buylla y cols. (1970a) que observaron un mayor tiempo de supervivencia en los perros hipofisectomizados y

transplantados con glándula parotida que en aquellos sin transplante o a los que se les había transplantado músculo.

La supervivencia en los tres grupos de animales estudiados por nosotros fué a las 4 semanas de la operación un 70% para el grupo A (Hpx+Tp) y un 55% para los grupos B (Hpx+Tg) y C (Hpx+C). A partir de la semana 16 del postoperatorio y hasta la semana 35 la supervivencia de los animales transplantados con parótida se mantuvo en un 55% mientras que descendió al 20% en las transplantadas con grasa y a un 15% en las simplemente hipofisectomizadas y con cemento (figura 18). Por lo tanto está claro que son los animales transplantados con parótida los que muestran una supervivencia más larga, lo que concuerda con los resultados de Alvarez-Buylla.

Este incremento de la supervivencia podría explicarse por la recuperación de la función adrenal (Alvarez-Buylla y cols., 1967, 1970a, 1979). Estos autores evaluaron la actividad adrenocortical mediante la determinación de 17-OH-corticosteroides plasmáticos (Alvarez-Buylla y cols., 1970a) comprobando datos previos en los que dicha evaluación en perros hipofisctomizados con o sin transplante de glándula parótida había sido realizada por métodos indirectos, bien sea estimulando la eosinopenia inducida por ACTH (Alvarez-Buylla y cols., 1964a) o mediante la excrección urinaria de 17-OH-cetosteroides antes y después del tratamiento con metopirona (Alvarez-Buylla 1967). Los niveles de 17-OH-corticosteroides según estos autores fueron un 11% más bajos en los perros hipofisectomizados y transplantados con glándula parótida en el mismo acto quirúrgico, que en los perros controles. Estos estudios fueron confirmados más tarde midiendo el cortisol plasmático por CBP (competitive binding protein) (Alvarez-Buylla y cols., 1979) encontrando que los niveles plasmáticos de cortisol disminuyen en los animales hipofisectomizados y se recuperan parcialmente con el transplante.

Asimismo la supervivencia se incrementa en los animales que reflejan mejor función adrenal, siendo la supervivencia media en los perros hipofisectomizados de  $6.3 \pm 0.6$  meses y de los transplantados con parótida de  $24 \pm 4.6$  meses (Alvarez-Buylla y cols., 1970ab) teniendo en cuenta que en los animales hipofisectomizados, la supervivencia varía mucho en relación a la edad y al peso del animal, sobreviviendo menos cuanto menor es la edad y el peso.

Según Curpide (1954) el cortisol secretado por las adrenales cae a las 24 horas de la hipofisectomía por la ausencia de ACTH hipofisaria. En base a estos datos y para evitar la muerte prematura de nuestros animales, fundamentalmente por una insuficiencia suprarrenal aguda secundaria al estrés del trauma quirúrgico, se les administro en el postoperatorio inmediato una dosis de dexametasona ( $80 \mu\text{g/ml}$  s.c.) que se mantiene en dosis decrecientes durante la primera semana del postoperatorio, asimismo se mantiene un exquisito cuidado en cuanto a condiciones de alojamiento, alimentación, sueros y prevención de cualquier tipo de infección. De este modo hemos conseguido una supervivencia en las ratas Hpx+Tp del 70% a las cuatro semanas de la operación y del 55% a las 35 semanas, mientras que en los otros dos grupos era significativamente menor. Este incremento en la supervivencia de las ratas Hpx+Tp podría explicarse por la aparición de niveles plasmáticos detectables de corticosterona ya a los quince días del postoperatorio, niveles que al tercer mes se incrementan significativamente (figura 34) coincidiendo también con el incremento de peso de las suprarrenales. En las ratas Hpx+Tp este es el 40% de los animales control mientras que las suprarrenales de las ratas Hpx+Tg o Hpx+C son prácticamente indetectables (figura 22).

Ganong y Hume (1956) en un estudio llevado a cabo en perros hipofisectomizados afirman que se puede encontrar una disminución de

peso de las adrenales sin que se produzca realmente atrofia en las mismas, por tanto el tamaño del órgano no guarda relación lineal con su estado funcional.

Todas estas observaciones sugieren que la sustancia hipofisaria que estimula la glándula adrenal se produce posiblemente en el tejido parotideo transplantado a través de los efectos de un factor hipotalámico y esos tres meses en los que concurren todos los eventos sea el tiempo que la célula parotidea tarda en desdiferenciarse y transformarse en una célula parecida a la hipofisaria.

El peso corporal inicial de las ratas hipofisectomizadas con transplante de parótida se redujo un 25% al mes de la operación, las transplantadas con grasa perdieron un 20% y las simplemente hipofisectomizadas un 30%. A los tres meses del postoperatorio los tres grupos de animales iban recobrando peso siempre en la misma proporción ya reseñada, pero esta recuperación ponderal era un 20% inferior al peso de los animales control a las 40 semanas de la operación (figuras 19 y 20). Esto sugeriría que en principio no hay una función GH recuperada importante, probablemente debido al predominio del efecto negativo de la SS. (Devesa y cols., 1992)

Los pesos de las suprarrenales y ovarios a las 35 semanas de la operación son significativamente más bajos en las ratas transplantadas que en los animales control, pero así como en las hembras transplantadas con grasa y las de cemento las suprarrenales eran prácticamente indetectables, en las transplantadas con glándula parótida el peso de las suprarrenales era aproximadamente el 40% del peso control (figura 22), lo que apoya el hecho de la recuperación parcial de la función de ACTH.

En relación al peso de los ovarios, también fue mayor en las ratas transplantadas con glándula parótida, un 55% más bajo en relación a los controles, un 25% en las transplantadas con grasa y un 30% en las de cemento (figura 21). Esto está de acuerdo con la existencia de mayor número de estros en los animales transplantados con parótida.

Llama la atención que las ratas simplemente hipofisectomizadas con cemento que lograron sobrevivir sin ningún trasplante, mantenían un peso superior al de las transplantadas con parótida o grasa. Ya en 1901, Cushing, estudiando la causa de pacientes con gran desarrollo de pániculo adiposo y ausencia de maduración sexual, practicaron numerosas hipofisectomías en perros jóvenes y algunos de los que lograron sobrevivir llegaban a tener una talla menor de lo normal, una falta de desarrollo sexual y obesidad. Ocho años más tarde Ashner (1909) sugiere que la obesidad observada en algunos animales hipofisectomizados era más bien debida a una actuación directa sobre la base del cerebro que sobre la hipófisis propiamente dicha.

Camus y Roussy en 1920 llegan a la conclusión de que la actuación sobre la zona postinfundibular del hipotálamo da lugar a síndrome adiposo genital y a la diabetes insípida.

Nuestros datos muestran una disminución muy marcada en cuanto al peso de los órganos diana (ovarios y suprarrenales) en relación a los controles, pero en el caso de los animales transplantados con glándula parótida, el peso de estos órganos diana se afecta menos en relación a los controles, fundamentalmente en aquellos animales que presentaron estados de estro y niveles más elevados de corticosterona, lo que avala un mejor estado funcional de las gónadas y las suprarrenales. Estos datos concuerdan también con los trabajos de Alvarez-Buylla y cols. de 1964ab, 1967, 1974 y 1979 y sugieren la presencia de algún factor hipotalámico que induzca la diferenciación de



la célula parotidea y su posterior transformación en una célula parecida a la hipofisaria con producción de ACTH y LH.

En cuanto a la determinación de medidas hormonales: los niveles plasmáticos de LH tanto basales como tras estímulo con LHRH fueron prácticamente indetectables en los tres grupos de animales al mes de la operación, se incrementaron ligeramente en el segundo mes, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas hasta el tercer y cuarto mes del postoperatorio, que es cuando los niveles basales de LH fueron más elevados, así como su respuesta al LHRH, no encontrando diferencias significativas entre los grupos A y B siendo en todo caso inferiores a las del grupo control (figuras 23, 24, 25 y 26). Los resultados más significativos se dieron en el 15% de los animales transplantados con parótida que fueron los que desarrollaron frotis vaginales de estro (por ejemplo R15) (figura 25). En estos animales los niveles de LH tanto basales como tras estímulo con LHRH fueron mucho más evidentes sobre todo a partir del tercer mes de la operación, Asimismo el peso ovárico de estos animales del grupo A fue un 50% inferior al peso ovárico control pero superior en un 50% y 45% respectivamente al de los grupos B y C (figura 21) lo que habla a favor de una cierta capacidad funcional gonadal de los animales transplantados con parótida.

Por otro lado se pudo detectar en el tejido parotideo transplantado la presencia de niveles de LH, si bien su contenido ( $28.8 \pm 14$  ng/mg proteína) era inferior al de las hipófisis normales ( $7800 \pm 300$  ng/mg proteína) pero en todo caso superior al de la glándula parótida in situ donde los niveles de LH fueron indetectables.

El hecho de que las diferencias respecto al grupo control en los niveles plasmáticos de LH de los animales del grupo A (Hpx+Tp) sean mayores a partir del tercer mes de la operación, que el peso de los

ovarios sea superior al de los grupos B y C, aunque significativamente inferior al de los animales control y que en el tejido parotideo transplantado se haya detectado la presencia de niveles de LH refuerza el hecho de la recuperación parcial de la función gonadal de los animales transplantados con parótida tras un periodo de déficit total transitorio, mientras se restablece la vascularización procedente del hipotálamo y se realiza la rediferenciación de la célula parotídea a célula parecida a la gonadotropa hipofisaria, lo que también corrobora los trabajos de Alvarez-Buylla y cols. (1973).

El pico de LH tras estímulo con LHRH en la rata hembra depende de la fase del ciclo estral en que se realice (Kalra y Kalra, 1989; Yen y cols., 1972). Cuando el animal se encuentra en diestro, se observan no solo valores de LH disminuidos sino también una disminución clara de la respuesta a LHRH. Además el aumento de las concentraciones circulantes de estradiol (fase de estro) desencadena la liberación al sistema portal hipofisario de concentraciones altas de LHRH (Fink, 1979) procedente fundamentalmente de neuronas hipotalámicas.

La pulsatilidad en la liberación hipotalámica de LHRH es característica de la actividad eléctrica neuronal, denominado por Knobil "generador hipotalámico de pulsos" (Knobil, 1994). Esta secreción fisiológicamente pulsátil de LHRH es capaz de desencadenar en las células gonadotropas de la hipófisis la liberación de LH y FSH, pero la magnitud de esta respuesta es proporcional al nivel de esteroides sexuales y de inhibina (Tresguerres, 1989).

El porqué no se recuperan totalmente los niveles hormonales de LH, ni tampoco ocurra esta recuperación parcial en todos los animales, probablemente esté en relación con diversos factores:

- 1.- Aunque los animales que utilizamos en este estudio fueron seleccionados en cuanto a técnica quirúrgica perfecta, hipofisectomía

Íntegra con el tallo, sin presencia de hemorragia, no se puede garantizar que el mismo trasplante, en algunos animales ocasione una compresión hipotalámica con las consiguientes dificultades de vascularización y por tanto la aparición de zonas necrosadas sin capacidad ya de transformación morfofuncional. Por otra parte y aunque la vigilancia del postoperatorio es intensiva, pequeñas microhemorragias sin repercusión orgánica podrían formar algún microcoágulo que de alguna manera también podría conllevar a alguna zona de necrosis.

Estudios de Alvarez-Buylla y cols. en 1979 de trasplantes de parótida en perros mostraron signos de diferenciación celular y observaron que principalmente en la zona del trasplante que está más próxima al tercer ventrículo se formaban estructuras foliculares de diferentes tamaños presentando diferentes afinidades de tinción, lo que sugiere que sea precisamente la presencia de algún factor hipotalámico que puede producir estos cambios en la parótida transplantada. Por el contrario, la parte del trasplante más separada del contacto con el tercer ventrículo desarrolló reacciones fibrosas. Esto podría dar una explicación a la existencia de trasplantes seminecrosados o necrosados totales de los animales estudiados por nuestro grupo, bien por no estar en íntimo contacto con el hipotálamo o por un exceso de compresión hipotalámica que dificultaría la vascularización y como consecuencia aparecerían las áreas de necrosis de manera parcial o total.

Los análisis histológicos con técnicas de Gomori mostraron la aparición de cambios en la estructura de la parótida a las 35 semanas de la operación. Se puede detectar el mantenimiento de las estructuras acinares de la glándula salival así como la presencia de conductos

excretoras a la vez que las células glandulares se hacen eosinófilas, lo que las convierte en este sentido en más parecidas a las células hipofisarias (figura 35).

Sobre estas modificaciones estructurales que en algunos trasplantes solo aparecen en forma de restos o nidos celulares dentro de áreas de necrosis, pudimos detectar mediante técnicas de inmunohistoquímica la presencia de células reactivas para LH. En la parótida normal no se pudo detectar positividad para esta hormona, mientras que en la hipófisis normal pueden observarse sin problemas como es lógico (figura 36). Estos resultados apoyan la hipótesis de la rediferenciación de la célula parotídea tras restablecimiento de la circulación procedente del hipotálamo (Alvarez-Buylla y cols., 1973) lo que sugiere la presencia de algún factor hipotalámico que induce estos cambios en la parótida transplantada.

2.- Los animales estudiados por nosotros tras la hipofisectomía, se encuentran en una situación de hipogonadismo hipogonadotropo evidente. Los simplemente hipofisectomizados por la ausencia de hipófisis, y los hipofisectomizados y transplantados con grasa, porque este tejido no se diferencia. Finalmente, incluso en los que tienen trasplante de tejido parotideo, dado que la diferenciación funcional de las células parotídeas a gonadotropas es inicialmente pobre o inexistente. Transcurridos tres meses de la operación, se observa sin embargo como en el grupo de animales transplantados con glándula parótida las cosas van cambiando y no así en los otros dos grupos de animales. Como es sabido, en las situaciones de hipogonadismo hipogonadotropo no hay respuesta al primer estímulo con LHRH, se necesita una estimulación crónica y pulsátil para que las células gonadotropas se estimulen y liberen LH (pulsos cada 90-120 minutos)

(Poyo-Guerrero y cols., 1989a). La frecuencia de los pulsos de LHRH no se influencia por los estrógenos, pero la capacidad de respuesta hipofisaria varía ampliamente (siempre que exista LHRH) bajo la influencia de los mismos.

Si la administración de LHRH se efectúa de modo continuo, los niveles de FSH y LH son bajos provocándose un fenómeno de "down-regulation" o desensibilización de los receptores hipofisarios para LHRH, comprobándose como la administración pulsátil de LHRH vuelve a restaurar la secreción de ambas gonadotropinas (Poyo-Guerrero y cols., 1989b).

Pero además cuando la liberación de gonadotropinas no es capaz por sí misma de inducir una maduración ovárica (hipogonadismo hipogonadotropo), la GH acelera dicha maduración aumentando la producción periférica de IGF-1 (Wilson y cols., 1988). Este factor, la IGF-1, estimula la esteroidogénesis folicular actuando de forma sinérgica con la FSH y el estradiol (Adashi y cols., 1985). Estas observaciones indican que la GH bien directamente o mediante la elevación de la síntesis de IGF-1 contribuye a la maduración folicular y al mantenimiento de la esteroidogénesis ovárica. Este hecho es muy a tener en cuenta en nuestro grupo de animales, dado que los niveles de GH son muy bajos hasta la semana 36 del postoperatorio, lo que sugiere que la síntesis de IGF-1 sería también más baja y como consecuencia se facilitaría el mantenimiento de la situación de hipogonadismo hipogonadotropo en estos animales.

En animales controles, la LH tras castración presenta un incremento de sus niveles circulantes hasta alcanzar un máximo (Esquifino y cols., 1977, Grandison y cols., 1977) mientras que en las ratas del grupo A (Hpx+Tp) los niveles basales y tras LHRH no sufren ningún incremento (figura 27), quizás porque no se haya completado el

proceso de diferenciación celular que hace que la célula parotidea se transforme en una célula de secreción hipofisaria o porque el número de células que se han diferenciado sea escaso o bien su funcionalismo sea muy reducido.

No se observó incremento ponderal ni de crecimiento en los animales del grupo A (Hpx+Tp) comparándolos con los B(Hpx+Tg) y C (Hpx+C) lo que vendría a confirmar datos de Alvarez-Buylla y cols. (1963) en los que no encontraban recuperación ponderal y de crecimiento en perros jóvenes y lo atribuían a una ausencia de la recuperación de GH probablemente debida a la particular regulación hipotalámica de dicha hormona con predominio del efecto negativo de la SS (Devesa y Tresguerres, 1992).

En los tres grupos de animales estudiados los niveles plasmáticos de GH tanto basales como tras GRF-piridostigmina fueron indetectables hasta la semana 36 del postoperatorio en la que solo el grupo de animales transplantado con parótida mostró un significativo incremento de los valores basales de GH pero no hubo ninguna respuesta al GRF-piridostigmina (figuras 28 y 29).

La secreción episódica de la hormona de crecimiento (como ya se describió en el capítulo correspondiente a la neuroregulación de la GH) depende del ritmo alternante hipotalámico en la liberación al sistema portal hipofisario de dos hormonas polipeptídicas hipotalámicas: la somatostatina (SS) de carácter inhibitor y la hormona liberadora de GH (GHRH, GRF, somatocrinina). Estas hormonas son a su vez moduladas por neurotransmisores centrales e influenciadas por otras hormonas y por sustratos metabólicos periféricos, bien actuando directamente sobre la hipófisis o modulando la secreción de GHRH y la SS (Devesa y Tresguerres, 1992; Devesa y cols., 1993).

Además la GH parece ejercer una autorregulación negativa de su

propia secreción hipofisaria, aumentando la liberación de SS y descendiendo la de GHRH a nivel hipotalámico (Conway y cols., 1985). En la rata, la secreción de GH como resultado del balance GHRH/SS ha sido claramente demostrada (Tannenbaum y Ling, 1984, Plotsky y Wale, 1985). La disminución aguda del tono somatostatinérgico en la rata condiciona un incremento de GH más marcado "in vivo" que "in vitro" (Kraicer y cols., 1986, Weiss y cols., 1987). Esta observación sugiere que el rebote de GH es causado por la acción del GHRH (Clark y cols., 1988, Miki y cols., 1988, Sugihara y cols., 1988) dato claramente demostrado por Wehremberg y cols. (1982b). No obstante, aunque queda mucho por esclarecer, parece que el papel fisiológico de GHRH no es preponderante sino que la pulsatilidad de GH viene dada por las fluctuaciones rítmicas del tono somatostatinérgico que en sus fases de nadir permitirían la liberación, en pulso de GH mediada por el efecto permisivo de unos niveles tónicos de GHRH, cuya acción en las fases de acmé (hipertónia somatostatinérgica) será la de estimular la síntesis de GH y su acumulación en un "pool" fácilmente liberable para ser segregado al disminuir la acción frenadora de la SS sobre la célula somatotropa.

Esta teoría la corroboran los trabajos de Devesa y cols. (1989) que observaron tipos de respuesta al GHRH variables dependiendo del momento de administración. Así mismo, estudios en humanos y en ratas (Lima y cols., 1993a, 1993b) demuestran que prácticamente todos los estímulos farmacológicos para la liberación de GH actúan mediante la inhibición del tono somatostatinérgico (Massara y cols., 1986a, Cappa y cols., 1993).

Por otro lado está demostrado que existe una relación entre la edad y la secreción de GH tanto en el hombre como en animales de

experimentación (Carlson y cols., 1972, Finkelstein y cols., 1972). Así, el patrón de secreción de GH tanto en el hombre adulto como en la rata adulta es muy bajo o puede incluso estar ausente (Sonntag y cols., 1980, Ceda y cols., 1986). Estos mismos autores han observado que el contenido hipofisario de GH va disminuyendo con la edad en los roedores y no se produce una respuesta de GH al GHRH. Como explicación, se ha postulado que los receptores hipofisarios para GHRH se van deteriorando con la edad (Aribat y cols., 1991) así como la sensibilidad del somatotropo al GHRH. Sin embargo la verdadera razón parece ser que la SS aumenta con la edad, por tanto en la etapa adulta y en la senectud, niveles elevados de SS impiden la actuación del GHRH. Cuando se trata a ratas viejas con un agonista  $\alpha_2$  como la clonidina que reduce los valores de SS, se restablece la respuesta al GHRH (Sonntag y cols., 1981).

Los datos aparentemente contradictorios que aparecen en la literatura en relación a la respuesta de GH al GHRH (Wehremberg y cols., 1983) son probablemente el reflejo de las diferentes situaciones hormonales que se encuentran en las distintas condiciones experimentales.

Además la SS es una hormona que presenta una gran ubicuidad en el organismo, se encuentra distribuida no solo en varias regiones del hipotálamo y del S.N.C. sino también en diversos componentes del aparato digestivo como las células D de los islotes pancreáticos y en las terminaciones nerviosas pancreáticas (Polak y cols., 1975). Estas células están en íntimo contacto anatómico con los demás tipos celulares del páncreas endocrino, permitiendo que la SS ejerza un control local (paracrino) de hormonas insulares principalmente insulina y glucagón (Orci y cols., 1975; Polack y cols., 1975; Gerich, 1981).

Así mismo está demostrado que las glándulas salivales también



contienen células secretoras de SS (Molnar y cols., 1976, Girod y cols., 1980). La parótida normal de rata, además de SS contiene VIP, PRL, sustancia P y EGF.

En este estudio, el número de células somatotropas en el trasplante parece ser muy bajo. Aunque en los datos de inmunohistoquímica obtenidos con anticuerpos específicos contra GH se observan algunas células positivas, estas no son tan abundantes como en el caso de LH y TSH (figuras 36, 37 y 39).

La posibilidad de que en el trasplante se produzca una infiltración de linfocitos y células plasmáticas, con la consiguiente producción de hormonas (LH, PRL, GH) por las células linfoides (Smith y Ebaugh, 1990, Hiestand y cols., 1986, Weigent y Blalock, 1991) aunque no es probable porque el tejido transplantado es del mismo animal y porque en el postoperatorio inmediato se comienza un tratamiento con dexametasona (que además de evitar el edema del trauma quirúrgico, inhibe la actividad del sistema inmunitario, condicionando un estado de linfopenia con disminución de la tasa de anticuerpos), si es sin embargo posible, y esto podría explicar la presencia de células GH positivas en la inmunohistoquímica, que luego no demuestran tener actividad funcional.

Además, la SS contenida en la parótida transplantada podría ejercer una regulación paracrina sobre las células propias o linfoides que contienen GH. También hay que tener en cuenta que el estado de desnutrición que padecen algunos animales, con la consiguiente pérdida de peso, pudiera implicar una disminución de la síntesis de IGF-1 y por tanto la GH no podría ejercer su acción a nivel periférico.

El control de la secreción de PRL al igual que el de otras hormonas hipofisarias implica al hipotálamo, pero en el caso de la PRL, este mecanismo de regulación hipotalámico a diferencia del resto de las

hormonas hipofisarias es predominantemente de tipo inhibitor. Es evidente que la dopamina es la sustancia responsable del efecto PIF que fisiológicamente inhibe la secreción de PRL (Weiner y Ganong, 1978) y que tiene acción preponderante en el control de dicha hormona. Recientemente se han descrito otros factores asimismo inhibidores de la secreción de esta hormona como:

-La proteína hipotalámica precursora de LHRH, contiene esta hormona y un péptido asociado de 56 aminoácidos, el GAP, capaz de inhibir la secreción de PRL (Fink y cols., 1987).

-El GABA (Schally y cols., 1977) y el ANP (Ohashi y cols., 1987).

De esta forma los factores hipotalámicos estimulantes como TRH, demostrado por Tashjian y cols. (1971) y otros factores que también se han implicado en la liberación de esta hormona como el VIP, oxitocina, endorfinas, encefalinas, histamina y sustancia P (Enjalbert y cols., 1980, Gibbs, 1984, Samson, 1989, Debeljuk, 1988), no pueden contrarrestar fácilmente el efecto negativo de los anteriores.

Los niveles plasmáticos de PRL en los tres grupos de animales estudiados, tanto basales como tras estímulo con TRH (figuras 23, 30, 31, 32 y 33), fueron significativamente más bajos que los del grupo control, pero a partir del tercer mes de la operación se produce un incremento tanto de los valores basales como tras estímulo con TRH en los animales del grupo A (Hpx+Tp) (figura 30). Esta respuesta es mucho más marcada en los animales que presentaron frotis de estro (figura 31) lo que sugiere que este grupo de animales tendría una mejor función gonadal con niveles estrogénicos que podrían ejercer un mayor efecto antidopaminérgico a nivel hipofisario (Raymond y cols., 1978) con la consiguiente liberación de PRL. Los niveles de PRL incrementados en el grupo A (Hpx+Tp) (figura 30) se corresponde así mismo con un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) en los niveles detectados en el

transplante.

En la parótida normal se detectaron niveles de PRL ( $1.1 \pm 0.1$  ng/mg proteína) muy bajos en relación con los de la parótida transplantada ( $20.2 \pm 7$  ng/mg) siendo los de las hipófisis controles de  $115 \pm 22$  ng/mg. Como la parótida "in situ" contiene células productoras de PRL, al transplantar este tejido a la silla turca y una vez restablecida la vascularización exclusivamente hipotalámica, estas células podrían desarrollar una mejor actividad funcional. Además el VIP y la sustancia P contenidos en el tejido parotideo podrían ejercer una regulación paracrina sobre las células propias que contienen PRL.

Alvarez-Buylla y cols. (1970a) observaron que al cruzar perras transplantadas con glándula parótida parían camadas normales pero sin embargo, no eran capaces de amamantar a sus crías, lo que sugería un fallo a nivel de PRL.

Nosotros no llevamos a cabo estudios en este sentido pues el desarrollo del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico no llegó a ser suficiente en los animales transplantados, pero si hemos detectado niveles de PRL no solo a nivel plasmático sino también en el transplante y mediante técnicas de inmunohistoquímica, lo cual hablaría de nuevo de diferencias entre la rata y el perro.

En relación al control de la secreción de PRL en estos animales, predominaría la acción inhibidora de la dopamina hipotalámica (Esquifino y Tresguerres, 1989), pero la secreción de DA en los vasos portales no es homogénea al menos en la rata. Se ha visto que la concentración de DA en los vasos portales localizados centralmente en el tallo hipofisario que reciben la secreción dopaminérgica de la región central de la eminencia media, es mayor que en los vasos portales localizados lateralmente que reciben la secreción de la región lateral de

la eminencia media (Reymond y cols., 1983). Estas diferencias en la concentración de DA portal parecen tener importantes consecuencias a nivel de las células productoras de PRL, ya que se sabe que la sangre portal no se distribuye homogéneamente sobre la pars distalis de la adenohipófisis (Porter y cols., 1971). Según esta teoría podría ocurrir que grupos de células parotideas productoras de PRL estuvieran inhibidas por una afluencia suficiente de DA desde los vasos portales, mientras que otras desarrollarían una mejor actividad funcional por un riego insuficiente de DA.

No se ha podido establecer una correlación entre los niveles plasmáticos de estradiol y los niveles circulantes de PRL en la rata hembra con ciclo normal. Tras castración ya sea quirúrgica o por ausencia de hormonas hipofisarias estimulantes como en los grupos de animales estudiados por nosotros, los niveles circulantes de PRL caen con el tiempo (Esquifino y cols., 1977) lo que sugiere que los estrógenos son necesarios para una correcta secreción de PRL, pero se sabe poco acerca de los efectos que la PRL pueda tener sobre la secreción de estrógenos actuando de forma directa sobre el ovario.

Durante el ciclo estral de la rata hay variaciones en la concentración de PRL (Chiochio y cols., 1980), concretamente se produce un incremento de PRL, LH y FSH en la fase de estro.

La castración quirúrgica o por ausencia de hormonas hipofisarias estimulantes, incrementa en la rata hembra el contenido de DA en la eminencia media (Gudelsky y Porter, 1981). La concentración de DA en la sangre portal de ratas hembra (tienen mayores niveles de estrógenos circulantes) es mayor que en los machos (Esquifino y cols., 1984) y varía a lo largo del ciclo estral en función de los niveles estrogénicos en cada fase. La síntesis de DA por las neuronas TIDAérgicas también es mayor

en la rata hembra que en la rata macho (Demarest y cols., 1981). Todos los efectos estimuladores de la actividad TIDAérgica inducidos por los estrógenos quedan abolidos en las ratas hipofisectomizadas (Demarest y cols., 1980). Parece ser que los estrógenos ejercen una acción estimuladora de la secreción de PRL a través de una acción antidopaminérgica a nivel hipofisario, reduciendo la eficacia de la DA para inhibir la secreción de PRL (Raymond y cols., 1978, Ferland y cols., 1979), además está demostrado que este efecto estrogénico se produce a través de una alteración de la sensibilidad de las células lactotropas a la inhibición dopaminérgica hipotalámica, por tanto al desaparecer los estrógenos por la ausencia de hormonas hipofisarias, se produce un incremento de la sensibilidad de las células parotideas en fase de diferenciación a la DA con lo que se produciría un efecto inhibitor más acusado (Judd y cols., 1966), ya que aunque los propios niveles de DA estén disminuidos se acompañaría de un descenso de los niveles circulantes de prolactina.

En el trasplante el número de células parotideas parecidas a las lactotropas está disminuido y hay una menor sensibilidad de estas células al TRH. Sin embargo los datos de inmunohistoquímica obtenidos con anticuerpos específicos para PRL muestran células positivas aunque no tan abundantes como en el caso de la LH (figura 38). En las parótidas normales no se detectaron células positivas para PRL LH, GH ni TSH (figuras 36, 37 y 38), en cambio, por RIA se detectaron niveles de PRL ( $1.1 \pm 0.1$  ng/mg de proteína) aunque muy bajos en relación con los de la parótida transplantada ( $20.2 \pm 7$  ng/mg) y no se detectó la presencia de otras hormonas. La diferencia encontrada entre las dos técnicas podría ser debida a una mayor sensibilidad del método bioquímico respecto al de inmunohistoquímica, ya que la cantidad de células productoras de PRL parece ser muy pequeña. Por otro lado, también

podría deberse a la existencia de reacciones cruzadas del anticuerpo anti-PRL con otras moléculas distintas de la PRL.

Está demostrado que la PRL juega un papel importante en la regulación del sistema inmunológico, fundamentalmente a nivel linfocitario. Se han identificado receptores para prolactina en la membrana de los diferentes tipos de linfocitos y se ha demostrado la capacidad de estos para producir y segregar PRL (Hiestand y cols., 1986).

Podría ocurrir, al igual que se ha observado para la GH, que en el trasplante se produjese una infiltración linfocitaria y que estos linfocitos fuesen la fuente de producción de PRL (Hiestand y cols., 1986), hecho poco probable ya que en este estudio se utiliza un autotrasplante y por tanto no es de esperar una reacción de rechazo. Además la detección de PRL en plasma y su capacidad de respuesta a TRH parecen descartar este hecho. Por otro lado ya ha sido comentado en otros apartados que los animales fueron tratados en el postoperatorio inmediato con dexametasona, lo que frenaría la posible respuesta de las células linfoides.

Ya en 1932, Smith afirmaba que cuando la hipófisis anterior se elimina en un 90%, se producen unas deficiencias gonadales, pero sin ningún cambio histológico de las glándulas suprarrenales.

En 1948, Keller y cols. estudiando este mismo problema en los perros, vieron como tras la hipofisectomía, la primera función que se alteraba era la gonadal, mientras que la función suprarrenal era la última. Estos autores afirman que si la hipofisectomía no es total, se produce atrofia adrenal, únicamente si hay daño hipotalámico; pero cuando la hipofisectomía es total, aun sin daño hipotalámico, se produce atrofia suprarrenal. En este sentido Hume en 1955 demuestra en el perro, que la destrucción de la eminencia media se asocia con una

incapacidad de la glándula adrenal para secretar 17-OH corticosteroides en respuesta al estrés, pero no produce atrofia adrenal, luego hay lesiones adrenales que no son debidas a cambios hipofisarios "per se".

La evaluación de la actividad adrenocortical de animales transplantados con glándula parótida en relación a los normales ya fue estudiada por Alvarez-Buylla y cols. a partir de 1964 en diferentes trabajos. En estos estudios se utilizaron métodos indirectos, bien estimulando la eosinopenia inducida por ACTH o midiendo la excrección urinaria de cetosteroides a las 24 horas de un tratamiento con metopirona, encontrando unos resultados bastante similares entre los perros normales y los transplantados con parótida (Alvarez-Buylla y E.R. Alvarez-Buylla 1964ab). Estos estudios fueron confirmados más tarde midiendo el cortisol plasmático por CPB (Alvarez-Buylla y Tsutsumi, 1979). En este estudio encuentran que los niveles plasmáticos de cortisol disminuyen en los perros hipofisectomizados y se recuperan en los transplantados con glándula parótida. La glándula adrenal de perros hipofisectomizados mostró una disminución de las zonas fasciculada y reticular debido a la caída de los niveles de ACTH, mientras que la de los perros transplantados con glándula parótida era normal, lo que sugiere que la glándula transplantada secreta ACTH en respuesta a la actuación de un factor hipotalámico sobre la glándula transplantada.

Nosotros evaluamos la actividad suprarenal mediante la determinación de corticosterona plasmática a partir de los 15 días del postoperatorio, observando un incremento en los niveles plasmáticos de la hormona, siendo claramente superiores a los niveles encontrados en los animales sin transplante al tercer mes del postoperatorio como ocurría con las otras hormonas estudiadas (figura 34), lo que apoya la sugerencia de Alvarez-Buylla antes mencionada.

Esto nos sugiere que la sustancia hipofisaria que estimula la

glándula adrenal se produce probablemente en el tejido transplantado a través de los efectos de un factor hipotalámico como también propuso Alvarez-Buylla.

El que tanto el incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona como el de otras hormonas tarde tanto tiempo en establecerse, parece relacionarse con las características de las células parotideas maduras en el adulto, que probablemente necesiten pasar por un periodo de desdiferenciación en las primeras semanas tras la operación antes de que se establezca la neovascularización hipotalámica como fué sugerido previamente (Alvarez-Buylla y cols., 1973).

La posibilidad de que células procedentes de tejidos adultos puedan sufrir una transformación morfofuncional, mediante cambios en la composición del medio de cultivo ya fue propuesta por Potter y cols. en 1986 en neuronas, si bien en tejidos adultos esta capacidad de cambio es menor y tarda más en aparecer. En este estudio, tres meses parece ser el tiempo que tardan en aparecer esos cambios morfofuncionales en el grupo de animales transplantados con parótida.

Green y cols. en 1987 observan también como células PC 12 altamente diferenciadas derivadas de un feocromocitoma son capaces de modificar de manera evidente sus características morfofuncionales en presencia de NGF desarrollando un fenotipo muy parecido al de las neuronas simpáticas. El medio endocrino también se ha descrito que es capaz de modificar las características de células procedentes de tejidos adultos. Bellows y cols. (1990) y Kasper y cols. (1990) observaron en células osteoblásticas que la paratohormona (PTH) y los andrógenos eran capaces de estimular la mitosis y la diferenciación. Yeh y cols., en 1989 describieron efectos similares en células intestinales estimuladas con corticosterona y Xuefan y Björntorp (1987) en preadipocitos tratados



con andrógenos.

Todos estos estudios apoyan nuestros resultados, y por tanto un tejido parotideo de rata adulta, transplantado en las mejores condiciones de vascularización procedente del hipotálamo, recibiría por esta vía factores de liberación hipotalámica que sumados a otros ya existentes en el tejido parotideo (EGF) podrían ser capaces de inducir los cambios morfofuncionales transformando las células parotideas en células parecidas a las hipofisarias.

## **9.CONCLUSIONES**

1.- La técnica de hipofisectomía por vía parafaríngea, con control microscópico, permite la extracción de la hipófisis "in toto" sin alterar su estructura y pudiéndose comprobar su integridad anatómica. Permite asimismo un campo quirúrgico ideal para el trasplante.

2.- El trasplante de parótida incrementa la supervivencia a largo plazo de los animales hipofisectomizados si se compara con el trasplante de grasa o simplemente cemento de dentista. Esto coincide con niveles más elevados de corticosterona en dichos animales.

3.- El trasplante de parótida determina a los tres meses un incremento en los niveles plasmáticos de LH y de su respuesta a LHRH cuando se compara con el trasplante de grasa o con solo cemento tras hipofisectomía, si bien no llegan a alcanzar valores de los animales control. El contenido de LH en el trasplante es mucho mayor en la parótida que en grasa. Esto se comprueba con inmunohistoquímica. Coincide con la presencia de frotis de estro en las ratas con parótida al cabo de tres meses del trasplante.

4.- Los niveles de GH prácticamente no se incrementan o lo hacen muy poco y solo en el grupo de parótida. No hay respuesta al GHRH. A pesar de que la inmunohistoquímica muestra células GH positivas, estas no deben ser funcionalmente útiles, pues las ratas no varían en su peso.

5.- La prolactina si sufre un incremento en el plasma de los animales transplantados con parótida y en el propio trasplante, pero su funcionalismo no queda del todo aclarado.

6.- Parece pues que el trasplante de parótida en la silla turca esfenoidal tras la hipofisectomía, es capaz de asumir de forma parcial las funciones de la hipófisis, siempre que reciba su revascularización desde las estructuras hipotalámicas exclusivamente.

## **10.BIBLIOGRAFIA**

- Abribat N, Deslauriers P, Brazeau P, Gaudreau P (1991). Alterations of pituitary growth hormone-releasing factor binding sites in aging rats. *Endocrinology* 128:633-635.
- Adams JH, Daniel PM, Prichard ML (1966). Some effects of transection of the pituitary stalk. *Brit Med J* 2:1619.
- Adashi EY, Resnick CE, D'Eecole AJ, Svoboda ME, Wan Wyk JJ (1985). Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 6:400.
- Aguilera G, Hyde CL, Catt KJ (1982). Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs. *Endocrinology* 111:1045.
- Alvarez-Buylla R y Alvarez-Buylla ER (1963). Regulation of hypoglycemia in hypophysectomized dog with glandular transplants in the sella turcica. *Acta Fisiologica Latinoamericana*. 13:306-312.
- Alvarez-Buylla R y Alvarez-Buylla ER (1964a). Eosinopenia provoked by insulin in dogs in which the hypophysis has been substituted by transplants of salivary gland or adrenal tissue. *Acta Fisiologica Latinoamericana*. 3:245-250.
- Alvarez-Buylla R y Alvarez-Buylla ER (1964b). The reflex mechanism which controls the release of ACTH stored in the hypophysis. *Acta Physiol Latinoam Vol. 14* 3:251-254.
- Alvarez-Buylla R y Alvarez-Buylla ER (1967). The metopirone test in hypophysectomized dogs with salivary or adrenal gland transplants. *Acta Fisiológica Latinoamericana*. 4:253-257.
- Alvarez-Buylla R, Mandoki J, Alvarez-Buylla ER (1970a). Survival comparison between totally hypophysectomized dog and dogs with a transplant of salivary gland in the place of the extirpated hypophysis. *Acta Fisiologica Latinoamericana*. 20:20-23.
- Alvarez-Buylla R y Alvarez-Buylla ER (1970b). Adrenocortical activity in normal dogs, hypophysectomized dogs and dogs with a transplant of salivary gland in the place of the extirpated hypophysis. *Acta Fisiologica Latinoamericana*. 13:306-312.
- Alvarez-Buylla R, Erlij D, Alvarez-Buylla ER (1970c). <sup>131</sup>I Uptake by thyroid of hypophysectomized dogs with salivary gland transplants in the sella turcica. *Acta Fisiologica Latinoamericana*. 20:13-19.

- Alvarez-Buylla R, De Leon I Alvarez-Buylla ER (1973). Gonadal function in hypophysectomized dogs with glandular transplants in the sella turcica. *Acta Fisiologica Latinoamericana*. 2:75-82.
- Alvarez-Buylla R y Alvarez-Buylla ER (1974). Nuevos estudios sobre la función del sistema hipotálamo-adenohipofisario. *Boletín del Instituto Estudios Médicos y Biológicos. Monografías de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas*. 1:165-173.
- Alvarez-Buylla R, Tsutsumi V (1979). Adrenocortical function in hypophysectomized dogs with parotid gland transplants in direct contact with the basal hypothalamus. *Acta Endocrinologica* 92:710-719.
- Andres KH (1987) Zur methodik der perfusionsfixierung des zentralnervensystems von sügern. *Mikrokopie* 21:169.
- Antoni (1986). Oxytocin receptors in rat adenohypophysis: Evidence from radioligand binding studies. *Endocrinology* 119:554.
- Arbogast LA, Ben-Jonathan N (1988). The preovulatory prolactin surge: An evaluation of the role of dopamine. *Endocrinology* 123:2690.
- Arce V, Cella SG, Loche S, Chigo E, Devesa J, Müller EE (1990). Synergistic effect of growth hormone releasing hormone and clonidine in stimulating GH release in young and old dogs. *Brain Res* 537:359-362.
- Arnaout MA, Garthwaite TL, Hartison DR, Hagen TL (1986). Vasoactive intestinal polypeptide is synthesized in anterior pituitary tissue. *Endocrinology* 119:2052.
- Ashner B (1909). Citado por Anderson E (1969). En: *The Hypothalamus*. Haymayer W, Anderson E y Nauta WJH (Eds.). Charles C. Thomas. pp1-12.
- Baker BL y Jaffe RB (1975). The genesis of cell types in the adenohypophysis of the human fetus as observed with immunocytochemistry. *Am J Anat* 143:137-162.
- Bansal SA, Lee LA, Woolf PD (1981). Dopaminergic modulation of arginine mediated growth hormone and prolactin release in man. *Metabolism* 30:649-653.
- Bargmann W (1949). Über die neurosekretorische verknüpfung von hypothalamus und neurohypophyse. *Zeitung Zellforschung* 34:610-634.

- Beck E y Daniel PM (1959). Some changes in the hypothalamus and proximal pituitary stalk after stalk section. *J Physiol (London)* 146:22.
- Bellows CG, Ishida H, Aubin JE, Heersche JN (1990). Parathyroid hormone reversibly suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells into functional osteoblasts. *Endocrinology* 127:3111-3116.
- Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ, Mical RS, Porter JC (1977). Dopamine in hypophyseal portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* 100:452.
- Ben-Jonathan N (1985). Dopamine: a prolactin inhibiting hormone. *Endocr Rev* 6:564.
- Berelowitz M, Szabo M, Firestone S, Chu L, Hintz R, Frohman LA (1981). Somatomedin C effects in hypothalamic somatostatin and pituitary growth hormone release in vitro: Evidence for a negative feed-back role in the regulation of GH secretion. *Clin Res* 29:503.
- Bergland RM, Ray BS, Torack RM (1968). Anatomical variations in the pituitary gland and adjacent structures in 225 autopsy cases. *J Neurosurg* 28:93-99.
- Blake CA y Sawyer CH (1974). Effects of hypothalamic deafferentation on the pulsatile rhythm in plasma concentrations of luteinizing hormone in ovariectomized rats. *Endocrinology* 94:730.
- Blake CA (1976). Stimulation of the proestrous luteinizing hormone (LH) surge after infusion of LH-releasing hormone in phenobarbital-blocked rats. *Endocrinology* 98:451.
- Boyd AE, Levowitz HE, Pfeifer SB (1970). Stimulation of human growth hormone secretion by L-Dopa. *New England Journal of Medicine* 283:1425-1429.
- Boyd JD (1956). Observations on the human pharyngeal hypophysis. *J Endocrinol* 14:66-67.
- Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M (1988). The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55:505-518.
- Bramnert M y Hökfelt B (1987). Naloxona enhances the increase in plasma growth hormone induced by alpha2-adrenergic stimulation in healthy males. *Acta Endocrinologica* 114:308-313.



- Braund W, Roeger DC, Judd SJ (1984). Synchronous secretion of luteinizing hormone and prolactin in the human luteal phase: Neuroendocrine mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 58:293.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive growth hormone. *Science* 179:77-79.
- Brekenridge LJ, Warren RL, Warner AE (1987). Lithium inhibits morphogenesis of the nervous system but not neuronal differentiation in *Xenopus laevis*. *Development* 99:353-370.
- Brown WA, Von Woert MH, Ambani LM (1973). Effect of apomorphine on growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 37:463-465.
- Burt AS, Landing BH, Sommers SC (1954). Amphophil tumors of the hypophysis induced mice by  $^{131}\text{I}$ . *Cancer Res* 14:497.
- Cappa M, Grassi A, Benedetti S, Drago F, Loche S, Chigo E (1993). Effect of the enhancement of the cholinergic tone by pyridostigmine on the exercise-induced growth hormone release in man. *J Endocr Invest* 16:421-424.
- Camus J y Roussy G (1920). Citado por Anderson E (1969). En: *The Hypothalamus*. Haymayer W, Anderson E y Nauta WJH (Eds.). Charles C. Thomas. pp1-12.
- Carlson HE, Gillin JC, Corden P, Snyder F (1972). Absence of sleep-related growth hormone peaks in aged normal subjects and acromegaly. *J Clin Endoc Metab* 34:1102-1105.
- Carmeliet P y Denef C (1988). Immunocytochemical and pharmacological evidence for an intrinsic cholinomimetic system modulating prolactin and growth hormone release in rat pituitary. *Endocrinology* 123:1128.
- Carrillo AJ, Sharp ZD, De Paolo LV (1987). Correlation of rat pituitary prolactin messenger ribonucleic acid and hormone content with serum levels during the estrogen-induced surge. *Endocrinology* 121:1993.
- Casanueva FF, Villanueva L, Dieguez C, Cabranes JA, Cabezas-Cerrato J, Fernandez-Cruz A (1984). Cholinergic mediation of growth hormone secretion elicited by arginine, clonidine and physical exercise in man. *J Clin Endocrinol Metab* 59:526-530.

- Casanueva FF, Villanueva L, Dieguez C, Cabranes JA, Diaz Y, Szoke B, Scanlon MF, Schally AV, Fernandez-Cruz A (1986). Atropine blockade of growth hormone-releasing hormone induced GH secretion in man is not exerted at pituitary level. *J Clin Endocrinol Metab* 62:186-191.
- Casanueva FF, Burguera B, Murrais C, Dieguez C (1990). Acute administration of corticoids a new and peculiar stimulus of GH secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 70:234-237.
- Castrillo JL, Bodner M, Karin M (1989). Purification of growth hormone-specific transcription factor GHF-1 containing homebox. *Science* 243:814-817.
- Cattabeni F, Maggi A, Monducci M, De Angelis L, Racagni G (1978). GABA: Circadian fluctuations in rat hypothalamus. *J Neurochem* 31:365.
- Ceda GP, Hoffman AR (1985). Growth hormone-releasing factor. Desensitization in rat anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 116:1334-1340.
- Ceda GP, Valenti G, Butterini V, Hoffman AR (1986). Diminished pituitary response to growth hormone-releasing factor in aging male rats. *Endocrinology* 118:2109-2114.
- Chihara K, Kashio Y, Kita T, Okimura Y, Kaji H, Abe H, Fujita T (1986). L-Dopa stimulates release of hypothalamic growth hormone-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 62:466-473.
- Childs GV, Naor Z, Hazum E, Tilbolt R, Westlund KN, Hancock MB (1983). Cytochemical characterization of pituitary target cells for biotinylated gonadotropin releasing hormone. *Peptides* 4:549.
- Childs GV, Hazum E, Amsterdam A, Limor R, Naur Z (1986). Cytochemical evidence for different routes of gonadotropin releasing hormone processing by large gonadotrophs and granulosa cells. *Endocrinology* 19:1329.
- Chiocho SR, Chafuen S, Tramezzani JH (1980). Changes in adenohipophyseal DA related to PRL release. *Endocrinology* 106:1682.

- Clark RG, Carlsson LM, Rafferty B, Robinson IC (1988). The rebound release of growth hormone (GH) following somatostatin infusion in rats involves hypothalamic GH-releasing factor release. *J Endocrinol* 119:397-404.
- Clarke IJ, Cummings JT, Karsch FJ, Seeburg PH, Nikolics K (1987). GnRH associated peptide (GAP) is cosecreted with GnRH into the hypophyseal portal blood of ovariectomized sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 143:665.
- Cohen S (1960). Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc Natl Acad Sci USA* 46:302-311.
- Cohen HN, Hay ID, Thomson JA, Logue F, Tatcliffe W, Beastall GH (1979). Metoclopramide stimulation: A test of growth hormone reserve in adolescent males. *Clin Endocrinol Metab* 11:89-93.
- Conklin JL (1968). The development of the human fetal adenohypophysis. *Anat Rec* 160:79-91.
- Conway S, McCann SM, Cruhde L (1985). On the mechanism of growth hormone autofeedback regulation: Possible role of somatostatin and growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 117:2451.
- Curpide EH (1954). Modification de la sécrétion des 17-hydroxycorticostéroïnes surrénales par l'hypophysectomie et l'ACTH. *C r Seanc Soc Biol* 148:906-907.
- Cushing H (1901). Citado por Anderson E (1969). En: *The hypothalamus*. Haymayer W, Anderson E y Nauta WJH (Eds.). Charles C. Thomas. pp 1-12.
- Dandy WE, Goetsch E (1911). The blood supply of the pituitary body. *Am J Anat* 11:137-150.
- Daniel PM, Prichard MML, Schurr PH (1958). Extent of the infarct in the anterior lobe of the human pituitary after stalk section. *Lancet* 1:1101.
- Daniel PM, Prichard MML, Treip CS (1959). Traumatic infarction of the anterior lobe of the pituitary gland. *Lancet* 2:927.
- Daniel PM, Prichard MML (1975). Etudies of the hypothalamus and pituitary gland with special reference to the effects of transection of the pituitary stalk. *Acta Endocrinologica* 80, suppl 201:1-216.

- Dawson AB (1948). The relationship of the pars tuberalis to the pars distalis in the hypophysis of the rhesus monkey. *Anat Rec* 102:103-121.
- Dechepper CF, Crumrine DA, Ganong WF (1986). Evidence that the gonadotrophs are likely site of production of angiotensin II in the anterior pituitary of the rat. *Endocrinology* 119:36.
- Debeljuk L, Coijams G, Seilicowich A, Diaz MC, Rettori V (1980). Effect of aminooxyacetic acid and bicuculline on prolactin release in castrated male rats. *Life Sci* 27:2025.
- Debeljuk L, Torres-Aleman I, Schally AV (1985). Antiserum to LHRH blocks haloperidol-induced hyperprolactinemia in female rats. *Neuroendocrinology* 40:185.
- Debeljuk L, Torres-Aleman I, Schally AV (1986). D-Trp-6-luteinizing hormone-releasing hormone inhibits hyperprolactinemia in female rats. *Endocrinology* 116:2227.
- Debeljuk L (1988). Control de la secreción de prolactina: Algunos avances recientes. *Endocrinología* 35:58.
- Delitala G, Maovili M, Pacifico A, Briauda SA, Palermo M, Manerelli M (1983). Cholinergic receptor control mechanism for L-Dopa, apomorphine and clonidine-induced growth hormone secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 57:1145-1149.
- Delitala G, Palermo M, Ross R, Coy D, Besser GM, Grossman A (1987). Dopaminergic and cholinergic influences on the growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in man. *Neuroendocrinology* 45:243-247.
- Demarest KT, McKay DW, Reigle GD, Moore KE (1981). Sexual differences in TIDA nerve activity induced by neonatally androgen exposure. *Neuroendocrinology* 32:108.
- Demarest KT y Moore KE (1980). Accumulation of L-Dopa in the median eminence:: an index of TIDA nerve activity. *Endocrinology* 106:463.
- Denef C y Andries M (1983). Evidence for paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 112:813.
- Descarries I y Schöder JM (1968). Fixation du tissu nerveux par perfusion à grand débit. *J Microscopie* 7:281-286.

- Desclin L (1963). Cytologie de l'adénohypophyse. Benoit J y Da Lage C (Eds.). Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris p.111.
- Devesa J, Lima L, Lois N y cols., (1989). Reasons for the variability in growth hormone (GH) responses to GHRH challenge: The endogenous hypothalamic-somatotroph rhythm (HSR). Clin Endoc (Oxford) 30:367-377.
- Devesa J, Arce V, Lois N, Tresguerres JAF, Lima L (1990). Alpha-2-Adrenergic agonism enhances the growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone (GHRH) through an inhibition of hypothalamic somatostatin release in normal men. J Clin Endocrinol Metab 71:1581-1590.
- Devesa J, Diaz MJ, Tresguerres JAF, Arce V, Lima L (1991). Evidence that  $\alpha$ 2-adrenergic pathways play the major role in growth hormone neuroregulation:  $\alpha$ 2-adrenergic agonism counteracts the inhibitory effect of muscarinic cholinergic receptor blockade on the GH response to GHRH, while  $\alpha$ 2-adrenergic blockade diminishes the potentiating effect of increased cholinergic tone on such stimulation in normal men. J Clin Endocrinol Metab 73:251-256.
- Devesa J, Lima L, Tresguerres JAF (1992). Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. Trends Endocrinol Metabol 3:175-183.
- Devesa J, Lima L, Arce V, Diaz MJ, Tresguerres JAF (1993). En: State of the art 92 in GH control in two decades of GH control. Pombo y Rosenfeld (Eds.) pp 81.
- Dhashi M, Fujio N, Nawata H, Kato K, Matsuo H, Ibayashi H (1987). Effect of alpha-human atrial natriuretic polipeptide on anterior pituitary function in men. Endocrinol Japon 34:659.
- Dieguez C, Valcavi R, Page MD, Zini M, Oasoli P, Edwards CA, Portioli I, Scanlon MF (1987). L-Dopa releases GH via GRF dependent mechanism in normal human subjects, whereas arginine, clonidine and adrenaline plus propanolol do not. 3rd Meeting of the European Neuroendocrine Association, London, Abstract 126.
- Dieguez C, Page MD, Scanlon MF (1988). Growth hormone neuroregulation and its alterations in disease states. Clin Endocrinol 28:109-143.

- Eikelboom R, Tannenbaum GS (1983). Effects of obesity inducing ventromedial hypothalamic lesions on pulsatile growth hormone and insulin secretion: Evidence for the existence of a growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 112:212-219.
- Ellis GB, Desjardins C, Fraser HM (1983). Control of pulsatile LH release in male rats. *Neuroendocrinology* 37:177.
- Enjalbert A, Arancibia S, Ruberg GM, Priam M, Bluet-Pajot MT, Rotsztein W, Kordon C (1980). Stimulation of in vitro prolactin release by vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology* 31:200.
- Esquifino AI, Tejero A, Aguilar E, Fernandez-Galz C, Vaticon MD (1977). Niveles de prolactina en ratas macho. Efecto de la castración y del tratamiento postnatal con benzoato de estradiol. *Endocrinología* 24:17.
- Esquifino AI, Tresguerres JAF (1979). Plasma LH response in hyperprolactinemic male rats to LHRH before and after bromocriptine treatment and castration. *Acta Endocrinologica Suppl* 225:141.
- Esquifino AI, Ramos JA, Tresguerres JAF (1984). Possible role of DA in changes in LH and PRL concentrations after experimentally induced hyperprolactinemia in rats. *J Endocr* 100:141.
- Evans PJ, Dieguez P, Foord S, Peters JR, Hall R, Scanlon MF (1985). The effect of cholinergic blockade on the growth hormone and prolactin response to insulin hypoglycaemia. *Clin Endocrinol* 22:733-737.
- Evans NP, Dahl GE, Glover BM, Karsch FJ (1994). Central regulation of pulsatile GnRH secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRh surge in the ewe. *Endocrinology* 134:1806-1811.
- Everett JW (1988). Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. En: Knobil E y Neill J (Eds.). *The physiology of reproduction*. Raven Press. New York. p 1143.
- Ezrin C y Murray S (1963). The cells of the human adenohypophysis in pregnancy, thyroid disease and adrenal cortical disorders. Benoit J y Da Lage C (Eds.). *Editions du Centre National de la Recherche Scientifique*, Paris p.183.

- Fand SB (1965). Demonstration of  $\alpha$ -glycerophosphatedehydrogenase in the human pituitary gland with special reference to the cells of the pars tuberalis. *Endocrinology* 77:320.
- Ferland L, Labrie F, Eward C, Raymond JP (1979). Antidopaminergic activity of strogens on PRL release at the pituitary levels in vivo. *Moll Cell Endocrinol* 14:199.
- Filicori M Butler JP, Crowley WF (1984). Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion. *J Clin Invest* 73:1638.
- Fink G (1979). Neuroendocrine control of gonadotropin secretion. *Br Medical Bull* 35:155.
- Fink G (1985). Has the prolactin inhibiting peptide at last been found?. *Nature* 316:487.
- Fink G (1988). Gonadotropin secretion and its control. En: Knobil E y Neill J (Eds.). *The physiology of reproduction*. Raven Press. New York. p 1349.
- Finkelstein JW, Roffwarg HP, Boyar RM, Kream J, Hellman L (1972). Age related change in the twentyfour-hour spontaneous secretion of growth hormone. *J Clin Endoc Metab* 35:665-670.
- Foncin JF (1966). Études sur l'hypophyse humaine au microscope électronique. *Path Biol* 14:893.
- Freeman ME (1988). The ovarian cycle of the rat. En: Knobil E y Neill J (Eds.). *The physiology of reproduction*. Raven Press. New York. p 1893.
- Furshpan EJ, Landis SC, Matsomoto SG, Potter DD (1986). Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. I. Secretion of norepinefrine and acetilcholine. *Journal of Neuroscience* 6:1061-1079.
- Ganong WF y Hume DM (1956). The effect of graded hypophysectomy on thyroid, gonadal and adrenocortical function in the dog. *Endocrinology* 59:293-305.
- Ganten D, Hermann K, Bayer C (1983). Angiotensin in the brain and increased turnover in hypertensive rats. *Science* 221:869.

- Gerich JE (1981). Somatostatin and diabetes Am J Med 70:619-616.
- Gibbs D (1984). High concentrations of oxytocin in hypophyseal portal plasma. Endocrinology 114:1216.
- Girod C, Dubois MP, Durand N (1980). Immunocytochemical evidence for the presence of somatostatin-like immunoreactivity in scattered cells of the duct system of the submandibular glands in the monkey macaca irns. Histochemistry 69:137-143.
- Goluboff LG, Ezrin C (1969). Effects of pregnancy on the somatotroph and the prolactin cell on the human adenohypophysis. J Clin Endocrinol Metab 29:1533-38.
- Gomez-Pan y Rodriguez Arnao (1983). Somatostatin and growth hormone releasing factor: synthesis, location, metabolism and function. Clin Endocrinol Metab 12:469-507.
- Goodgier CG, De Stephano L, Lal WH, Guyda HJ, Posner BI (1984). Characterization of insulin-like growth factor receptors in rat anterior pituitary, hypothalamus and brain. Endocrinology 114:1187-1195.
- Grandison L, Hodson C, Chen HT, Advis T, Simpkins J, Meites J (1977). Inhibition by prolactin of postcastration rise in luteinizing hormone. Neuroendocrinology 23:312.
- Grandison L, Guidotti A (1979). Gamma-aminobutyric acid and receptor function in rat anterior pituitary gland: Evidence for control of prolactin release. Endocrinology 105:754.
- Greene LA, Tischler AS (1987). En: Enc of Neuroscience II. Gedelman (Ed.). Birkhäuser, Boston. p 938.
- Gudelsky GA, Porter JC (1981). Sex-related difference in the release of DA into hypophyseal portal blood. Endocrinology 109:1394.
- Guillemin R (1978). Peptides in the brain: The new endocrinology of the neurone. Science 202:390-402.
- Guillemin R, Brazeau P, Böhlen P y cols. (1982) Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. Science 218:585-587.



- Hagen TC, Arnaout MA, Scherzer WJ, Martinson DR, Garthwaite TL (1986). Antisera to vasoactive intestinal polypeptide inhibits basal prolactin release from dispersed anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 43:641.
- Harris GW (1937). Induction of ovulation in the rabbit by electrical stimulation of the hypothalamo-hypophyseal mechanism. *Proc R Soc (London) Series B* 122:374-94.
- Harris GW Jacobson D (1952). Functional grafts of the anterior pituitary gland. *Proc R Soc (London) Series B* 139:263-76.
- Herland M (1960). Étude critique de deux techniques nouvelles destinées à mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentes dans la glande pituitaire. *Bull Micr Appl* 10:37.
- Herland M (1963). Apport de la microscopie électronique à l'étude du lobe antérieur de l'hypophyse. *Cytologie de l'adénohypophyse*. Benoit J y Da Lage C (Eds.). Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris p.183.
- Herland M (1965). Les cellules responsables de l'activité gonadotrope dans l'hypophyse humaine. *Rev Eur Endocrin* 2:113-114.
- Hiestand PC, Mekler P, Nordmann R, Grieder A, Permmongkol C (1986). Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2899-2603.
- Houssay BA (1936). The hypophysis and metabolism. *New Engl J Med* 214:961-1086.
- Horacek MJ, Campbell GT, Blake CA (1989). Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone: Effects of induction of LH, Follicle-stimulating hormone, and prolactin cell differentiation. *Endocrinology* 124:1800-1806.
- Hume DM y Nelson DW (1955). *Endocrinology* 57:355.
- Hyde JF, Maray I, Ben-Jonathan N (1987). The rat posterior pituitary contains a potent prolactin-releasing factor: studies with perfused anterior pituitary cells. *Endocrinology* 121:153.
- Hyde JF y Ben-Jonathan N (1988). Characterization of prolactin-releasing factor in the rat posterior pituitary. *Endocrinology* 122:2533.

- Jacobson D (1966). The techniques and effects of hypophysectomy, pituitary stalk section and pituitary transplantation in experimental animals. En the pituitary gland. Butterworths. London. Vol 11, pp1-29.
- Jansson JO, Eden S, Isaksson O (1985). Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 6:128-150.
- Johnston CA y Negro-Vilar A (1988) Role of oxytocin on prolactin secretion during proestrous and in different physiological or pharmacological paradigms. *Endocrinology* 112:341.
- Jordan V, Dieguez C, Lafaffian I Rodriguez-Arno MD, Gomez-Pan A, Hall R, Scanlon MF (1986). Influence of dopaminergic, adrenergic and cholinergic blockade and TRH administration on GH responses to GRF-1-29. *Clinical Endocrinology* 24:291-298.
- Judd SJ, Rakoff JS, Yen SSC (1978). Inhibition of gonadotropin and prolactin release by dopamine: Effect of endogenous estradiol levels. *J Clin End Met* 47:494.
- Kalra SP (1986). Neural circuitry involved in the control of LHRH secretion: A model for preovulatory LH release. En: Martin L, Ganong WF,(Eds.). *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press. New York. Vol. 9 pp 31-75.
- Kalra SP, Kalra PS (1989). Do testosterone and estradiol 17 $\beta$  enforce inhibition or stimulation on LHRH secretion. *Biol Reprod* 41:559-570.
- Kalra SP (1993). Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocrine Rew.* 5:507-538.
- Karsch FJ (1987). Central actions of ovarian steroids in the feed-back regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. *Ann Rev Physiol* 49:365.
- Kasperk C, Fitzsimmons R, Strong D, Mohan S, Jennings J, Wergedal J, Baylink D. (1990). Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells.. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1322.
- Keller AD (1948). *Texas Rep Biol Med* 6:275.

- Kepes JJ y Fritzen TJ (1964). Large invasive chromophobe adenoma with well-preserved pituitary gland: Report of a case. *Neurology (Minneapolis)* 14:537.
- Kinji I y Takafumi S (1991). Conversion of growth hormone-secreting cells into prolactin-secreting cells and its promotion by insulin and insulin like growth factor-1 in vitro. *Exp cell Res* 195:53-58.
- Klarke IJ, Cummings JT, Karsch FJ, Seeburg PH, Nikolics K (1987). GnRH associated peptide (GAP) is cosecreted with GnRH into the hypophyseal portal blood of ovariectomized sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 143:665.
- Knobil E y Neill JD (1994). *The Physiology of reproduction*. Raven Press. New York.
- Kracht J, Zimmerman HD, Hachmeister V (1966). Immunhistologischer ACTH nachweis in einem R-zellen-adenom des hypophysenvorderlappens bei M Cushing. *Virchow Arch Path Anat* 340:270.
- Kraicer J, Cowan JS, Sheppard MS, Lussier B, Moor BC (1986). Effect of somatostatin withdrawal and growth hormone (GH) releasing factor on GH release in vitro: Amount available for release after diinhibition. *Endocrinology* 119:1047-2051.
- Kuljis RV, Advis JP (1989). Immunocytochemical and physiological evidence of a synapse between dopamine and luteinizing hormone releasing hormone containing neurons in the ewe median eminence. *Endocrinology* 124:1579.
- Lal S, Tolis G, Martin JB, Brown GM, Guyda H (1975a). Effect of clonidine on growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and thyroid stimulating hormone in the serum of normal men. *J Clin Endocr Metab* 41:827-832.
- Lal S, Martin JB, De la Vega CE, Friesen HG (1975b). Comparison of the effect of apomorphine and levodopin on serum growth hormone levels in normal men. *Clin Endoc* 4:277-285.
- Langford LA, Coggeshall RE (1980). The use of potassium ferricyanide in neural fixation. *Anat Rec* 197:297-303.

- Levine JE, Pavk KY, Ramirez VD, Jackson GL (1982). Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanaesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology* 111:1449.
- Levy-Montalcini R y Hamburguer V (1951). Selective growth-stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 116:321-362.
- Leznof A, Fishman J, Goodfriend L, McGarry E, Beck J, Rose B (1960). Localization of fluorescent antibodies to human growth hormone in human pituitary glands. *Proc Soc Exp Biol Med.* 104:232.
- Leznoff A, Fishman J, Talbot M, McGarry EE, Beck JC, Rose B (1962). The cytological localization of ACTH in the human pituitary. *J Clin Invest* 41:1720.
- Li CH (1959). The relation of chemical structure to the biologic activity of pituitary hormones. *Lab Invest* 8:574.
- Lima L, Arce V, Diaz MJ, Lois N, Devesa J (1990). Diferente funcionalismo de las vías dopaminérgicas y colinérgicas en el control de la liberación pulsátil y rítmica de somatostatina: ¿Puede ello ser la causa de la liberación pulsátil y rítmica de la hormona del crecimiento? *Endocrinología* 37:154.
- Lima L, Arce V, Tresguerres JAF, Devesa J (1993a). Clonidine potentiates the GH response to CHRH in NE synthesis-inhibited rats. *Neuroendocrinology* 57:1155-1160.
- Lima L, Arce V, Tresguerres JAF, Devesa J (1993b). Studies on  $\alpha_2$ -adrenergic modulation of hypothalamic somatostatin secretion in rats. *Life Sci* 53:665-668.
- Lincoln DW (1986). Physiology of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH). En: Bloom SR, Jacobs HS (Eds.). *Therapeutic applications of LHRH. International Congress and Symposium Series.* Royal Society of Medicine Services. London. p 1.
- López FJ, Dominguez JR, Sanchez-Franco F, Negro-Vilar A (1989). Role of dopamine and vasoactive intestinal peptide in the control of pulsatile prolactin secretion. *Endocrinology* 124:527.

- Lumpkin MD, Samson WK, McCann SM (1985). Effects of intraventricular growth hormone releasing factor on growth hormone release: Further evidence for ultrashort loop feedback. *Endocrinology* 116:2070-2074.
- Mackeehan WL (1982). Papel de los nutrientes celulares en el control del crecimiento y la diferenciación de células normales y con transformación tumoral. *Mol Intern Nutrit Cancer* p 249.
- MacLeod RM y Lehmeyer JE (1974). Studies on the mechanism of the dopamine mediated inhibition of prolactin secretion. *Endocrinology* 94:1077-1085.
- MacPhie JL, Beck JS (1973). The histological features and human growth hormone content of the Pharyngeal pituitary gland in normal and endocrinologically-disturbed patients. *Cin Endocrinol* 2:157-173.
- Martha PM, Blizzard RM, McDonald JA, Thorner MU y Rogol AD (1988). A persistent pattern of varying pituitary responsivity to exogenous growth hormone in GH deficient children: Evidence supporting periodic somatostatin secretion. *J Clin End Metab* 67:449-454.
- Martin JB (1973). *Neural regulation of growth hormone secretion*. *New England J Med* 288:1384-1393.
- Martin JB, Brazeau P, Tannenbaum GS, Villoughby JO, Epelbaum J, Terry LC, Durand D (1978). Neuroendocrine organization of growth hormone regulation. En: *The hypothalamus*. Reichlin S, Baldessarini RJ y Martin JB (Eds.). Raven Press, New York. pp 329-372.
- Martin GB (1984). Factors affecting the secretion of luteinizing hormone in the ewe. *Biological Reviews* 59:1.
- Martinez de la Escalera G, Guthrie J, Weiner RI (1988a). Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH but not VIP: Stimulation via Ca<sup>2+</sup>/protein kinase C pathway. *Neuroendocrinology* 47:38.
- Martinez de la Escalera G, Weiner RI (1988b). Effect of dopamine withdrawal on activation of adenylatecyclase and phospholipase C in enriched Ictotrophs. *Endocrinology* 123:1682.
- Massara F, Chigo E, Goffi S, Molinati GM, Müller EE, Camanni F (1984). Blockade of hp-CRF-40 induced GH release in normal men by a cholinergic muscarinic antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 59:1025-1026.

- Massara F, Chigo E, Molinatti GM, Mazza E, Locatelli V, Müller EE, Camanni F (1986a). Potentiation of cholinergic tone by pyridostigmine bromide re-instates and potentiates the growth hormone responsiveness to intermittent administration of growth hormone-releasing factor in man. *Acta Endocrinologica* 113:12-16.
- Massara F, Chigo E, Demishis K, Tangolo D, Mazza E, Locatelli V, Müller EE, Molinatti GM, Camanni F (1986b). Cholinergic involvement in the GHRH-induced GH release: Studies in normal and acromegalic subjects. *Neuroendocrinology* 43:670-675.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally AV (1971). Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1334-91.
- McCann SM, Dhariwal AP (1966). Hypothalamic releasing factors and the neurosecretory link between the brain and the anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 1:261.
- Melchionna R y Moore RA (1938). The pharyngeal pituitary gland. *Amer J Path* 14:763.
- Mendelson WB, Sitaram N, Wyatt RJ, Gillin JC (1978). Methscopolamine inhibition of sleep-related growth hormone secretion. Evidence for a cholinergic secretory mechanism. *J Clin Invest* 61:1683-1690.
- Miki N, Ono M, Shizume K (1984). Evidence that opiate and alpha-adrenergic mechanisms stimulate rat growth hormone release via growth hormone releasing factor (GRF). *Endocrinology* 114:1950-1952.
- Miki N, Ono M, Shizume K (1988). Withdrawal of endogenous somatostatin induces secretion of growth hormone-releasing factor in rats. *J Endocrinol* 117:245-252.
- Milbrandt J (1988). Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1:183-188.
- Minamitani N, Chihara K, Kaji H, Kodama H, Kita T, Fujita T (1989). Alpha2-Adrenergic control of growth hormone (GH) secretion in conscious male rabbits: Involvement of endogenous GH-releasing factors and somatostatin. *Endocrinology* 125:2839-2845.

- Molnar J, Arimura A, Kastin AS (1976). Presence of immunoreactive somatostatin in the salivary gland and saliva. *Fed Proc* 35:782 (3172A).
- Morris CJ, Russell DS, Landgrebe FW, Mitchell GM (1956) The melanophore-expanding and corticotrophic activity of human pituitary tissue. *J Endocr* 14:263.
- Mortimer GH, Besser GM, Hook J, McNeilly AS (1974). Intravenous, intramuscular, subcutaneous and intranasal administration of LH, FSH-RH. The duration of effect and occurrence of asynchronous pulsatile release of LH and FSH. *Clin Endocrinol* 3:19.
- Muggleton-Harris AL y Higbee N (1987). *Development* 99:25.
- Mulchaney JJ, Neill JD (1982). GABA levels in hypophyseal stalk plasma of rats. *Life Sci* 31:453.
- Muller EE, Dal Pra P, Pecile A (1968). Influence of brain neurohumours injected into the lateral ventricle of the rat on growth hormone release. *Endocrinology* 83:983-986.
- Muller EE (1987). Neural control of somatotropic function. *Physiol Rev* 67: 952-1053.
- Müller W (1958). On pharyngeal hypophysis. *Endocrine aspects of breast cancer*. Currie AR (Ed.). E & S Liumstone Ltd., Edimburgo.
- Murai I, Reichlin S, Ben-Jonathan (1989). The peak phase of the proestrous prolactin surge is blocked by either posterior pituitary lobectomy or antisera to vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 124:1050.
- Nelson C, Albert VR, Elsholtz HP, Lu LI, Rosenfeld MG (1988). Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcript factor. *Science* 239:1400-1405.
- Nistico G y Scapagnini V (1980). Central nervous system pharmacology and neuroendocrine secretion. *Perspectives in Clinical Endocrinology* 2:47-123.
- Ohashi M, Fujio N, Nawata H, Kato K, Matsuo H, Ibayashi H (1987). Effect of alpha-human atrial natriuretic polypeptide on anterior pituitary function in men. *Endocrinol Japon* 34:659.

- Orci L, Baetens D, Dubois MP y Rufener C (1975). Evidence for the D-cell of the pancreas secreting somatostatin. *Horm Metab Res* 7:401-402.
- Paget GE y Eccleston E (1960) Simultaneous specific demonstration of thyrotroph, gonadotroph and acidophil cells in the anterior Hypophysis. *Stain Techn* 35:119.
- Palay SL, McGee-Russell SM, Gordon S, Grillo MA (1962). Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide. *J Cell Biol* 12:385-410.
- Palen TD, Harris RB, Wypis DM, Wilson IB (1987). Substrate specificity of a hypothalamic neurosecretory granule enzyme capable of processing pro-gonadotropin releasing hormone precursor protein. *Peptides* 8:21.
- Pateels JL (1960). Recherches experimentales sur le role de L'hypothalamus dans la differentiation cytologique de L'hypophyse diez pleurodeles walthi. *Arch Biol* 68:65-114.
- Patterson PH (1977). *Developmental Biology* 56:263.
- Peiper DR, Gala RR, Schiff MA, Regiani SR, Marshall JC (1984). Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor responses to GnRH in hypothalamus-lesioned rats: Inhibition of responses by hyperprolactinemia and evidence that testosterone and estradiol modulate gonadotropin secretion at postreceptor sites. *Endocrinology* 115:1190.
- Peñalva A, Villanueva L, Casanueva FF, Cavagnini F, Gomez-Pan A, Muller EE (1983). Cholinergic and histaminergic involvement in the growth hormone releasing effect of an enkephalin analog FK 33824 in man. *Psychopharmacol* 80:120-125.
- Perkins SN, Evans WS, Thorner MO, Cronin MJ (1983). Beta-adrenergic stimulation of growth hormone release from perfused rat anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 37:473-475.
- Petrovic SL, McDonald JK, Snyder GD, McCann SM (1983). Characterization of beta-adrenergic receptors in rat brain and pituitary using a new high affinity ligand 125-iodocyanopindolol *Brain Res* 261:249-259.



- Philips HS, Nikolics K, Branton D, Seeburg PH (1985). Immunocytochemical localization in rat brain of a prolactin releasing-inhibiting sequence of gonadotropin releasing hormone prohormone. *Nature* 316:..
- Plotsky PM, Vale W (1985). Patterns of growth hormone releasing factor and somatostatin secretion into the hypophyseal-portal circulation of the rat. *Science* 230:461-463.
- Plotsky PM (1986). New insights into hypothalamic hormone secretion into pituitary portal blood. Program of the 68th Annual Meeting of the Endocrine Society. Anaheim CA. p25 (Abs.).
- Pohl CR, Weiner RI, Smith MS (1988). Relation between luteinizing hormone and prolactin pulses in ovariectomized rats with or without dopamine inhibition. *Endocrinology* 123:159.
- Polak J, Pearse AGE, Grimelius L, Bloom S, Arimura A (1975). Growth-hormone-release inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cell. *Lancet* 1:1220-1222.
- Popa GT y Fielding U (1930). A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region. *J Anat* 65:88-91
- Porter JC, Mical RS, Ondo JC, Kamberi IA (1971). Perfusion of the rat anterior pituitary via a cannulated portal vessel. *Acta Endocrinologica Suppl* 158:249.
- Potter DD, Landis SC, Matsumoto SG, Furshpan EJ (1986). *Journal of Neuroscience* 6:1080.
- Poyo-Guerrero PR, Castel IP, Tresguerres JAF (1989) Dinámica de la secreción pulsátil de LHRH. *An Med Intern* 7:376-380.
- Poyo-Guerrero PR, Castel IP, Tresguerres JAF (1989) Posibilidades actuales en el diagnóstico de los hipogonadismos hipogonadotropos. *An Med Intern* 11:598-602.
- Purves HD, Griesbach WE (1951). The site of thyrotropin and gonadotropin production in the rat pituitary studied by McManus-Hotchkiss staining for glycoprotein. *Endocrinology* 49:244.
- Purves HD, Griesbach WE (1954). The site of follicle stimulating and luteinizing hormone production in the rat pituitary. *Endocrinology* 65:785.

- Purves HD (1966). The pituitary gland. Harris GW & Donovan BT (Eds.). Butterworth Co. Ltd., London, Vol. 1 p 147.
- Ramirez VD, Feder HH, Sawyer CH (1984). The role of brain catecholamines in the regulation of LH secretion: a critical inquiry. En: Martini L y Ganong WF (Eds.). Frontiers in neuroendocrinology. Raven Press. New York. Vol. 8 p 27.
- Ramon y Cajal S (1894). Algunas contribuciones al conocimiento de los ganglios del encéfalo. Anales de la Sociedad Española de Historia Natural 23:214-215.
- Rasmussen AT (1930). Origin of the basophilic cells in the posterior lobe of the human hypophysis. Amer J Anat 46:461.
- Rasmussen AT (1958). The proportions of the various subdivisions of the normal adult hypophysis cerebri and the relative number of the different types of cells in pars distalis, with biometric evaluation of age and sex differences and special consideration of basophilic invasion into infundibular process. En "The pituitary gland". Williams & Wilkins (Eds.) Assoc Res Nerv Ment Dis, Baltimore pp 118-150.
- Raymond V, Beanliban M, Labrie F, Boissier J (1978). Potent antidopaminergic activity of E<sub>2</sub> at the pituitary level of PRL release. Science 200:1173.
- Reichelt W, Dettmer D, Brueckner G, Brust P, Eberhardt E, Reichenbach A (1989). Potassium as a signal for both proliferation and differentiation of rabbit retinal (Mueller) glia growing in cell culture.. Cellular Signaling 1:187-194.
- Reymond MJ, Speciale SG, Porter JC (1983). DA in plasma of lateral and medial hypophysial portal vessels: Evidence for residual variation in the release of hypothalamic DA into hypophyseal portal blood. Endocrinology 112:1958.
- Rioch D, Wislocki GB, O'Leary JL (1940) A precis of preoptic hypothalamic and hypophyseal terminology with atlas. Res Publ Assoc Nerv Ment Dis 20:3-30.
- Robyn C, Bossaert Y, Hubinont P, Pasteels JL, Herlant M (1964). Détection des cellules LH dans L'hypophyse humaine par une réaction d'immunofluorescence. C R Acad Sci 259:1226.

- Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1988). Plasma prolactin and luteinizing hormone profiles during the estrous cycle of the female rat: Effects of surgically induced persistent estrous. *Neuroendocrinology* 47:133.
- Rudnick MS, Dannies PS (1981). Muscarinic inhibition of prolactin production in cultures of rat pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 101:689.
- Sansom WK, Lumpkin MD, McCann SM (1986). Evidence for a physiological role for oxytocin in the control of prolactin secretion. *Endocrinology* 119:554.
- Sansom WK, Bianchi R, Moge RJ, Rivier J, Vale W, Melin P (1989). Oxytocin mediates the hypothalamic action of vasoactive intestinal peptide to stimulate prolactin secretion. *Endocrinology* 124:812.
- Sarkar DK, Gibb D (1984). Cyclic variation of oxytocin in the blood of pituitary portal vessels of rats. *Neuroendocrinology* 39:481.
- Sasaki F, Iwana Y (1988). Correlation of spatial differences in concentrations of prolactin and growth hormone cells with vascular pattern in the female mouse adenohypophysis. *Endocrinology* 112:1622.
- Schaeffer JM, Hsueh AJW (1980). Acetylcholine receptors in the rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 30:344.
- Schally AV, Bowers CY, Redding TW y Barret JF (1966). Isolation of thyrotropin releasing factor (TRH) from porcine hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 25:165-169.
- Schally AV, Coy DH y Meyers CA (1978). Hypothalamic regulatory hormones. *Annual Review of Biochemistry* 47:89-128.
- Schally AV, Redding TW, Arimura A, Dupont A, Linthicum GL (1977). Isolation of gamma-aminobutyric acid from pig hypothalamus and demonstration of its prolactin release inhibiting (PIF) activity in vivo and in vitro. *Endocrinology* 100:681.
- Scharrer E y Scharrer B (1954). Hormones produced by neurosecretory cells. *Recent Progress in Hormone Research* 10:183-240.
- Shealy CN, Jackson CCR, Pearson O, Kaufman B. (1963). Submucosal intranasal transphenoidal hypophysectomy. *Bull Los Ang Neurol Soc* 33:185-196.

- Sheehan HL (1968). Neurohypophysis and the hypothalamus. En: Endocrine Pathology. Bloodworth JMB, Williams JR, Wilkins (Eds.). Baltimore. pp 12-74.
- Sheehan HL y Stanfield JP (1961). The pathogenesis of postpartum necrosis of the anterior lobe of the pituitary gland. *Acta Endocrinol* 37:479-510.
- Sherwood NM, Chiappa SA, Sarkar DK, Fink G (1980). Gonadotropin releasing hormone (GnRH) in pituitary stalk blood from proestrous rat: Effects of anesthetics and relationship between stored and released GnRH and luteinizing hormone. *Endocrinology* 107:1410.
- Shin SH y Reifel CW (1988). Adenohypophysis has an inherent property for pulsatile prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 47:186.
- Shivers BD, Harlan RE, Morell JI, Pfaff DW (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 304:345.
- Silverman AJ (1988). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry. En: Kobil E y Neill J (Eds.). *The physiology of reproduction*. Raven Press. New York.
- Sims KB, Hoffman DL, Said SI, Zimmerman EA (1980). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: An immunocytochemical study. *Brain Res* 186:165.
- Siperstein ER (1955). Histochemical demonstration of glycogen in the mouse pituitary. *Proc Soc Exp Biol Med* 88:296.
- Siperstein ER y Allison VF (1965). Fine structure of the cell responsible for secretion of adrenocorticotrophin in the adrenalectomized rat. *Endocrinology* 76:70.
- Smith EM, Phan M Coppenhauer D, Kruger TE, Blalock JE (1983). Human lymphocyte production of immunoreactive thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6010-6013.
- Smith EM y Ebaugh MJ (1990). Luteogenic activity from human leukocytes. *Ann NY Acad Sci* 594:492-493.
- Smith MS, Pohl CR, Weiner RI (1986). Evidence for hypothalamic regulation of pulsatile prolactin secretion in the rat. 16th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington DC, USA.

Smith PE (1930). Amer J Anat 45:205-273.

Smith PE (1932). Anat Rec 52:191.

Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J (1980). Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. Endocrinology 107:1875-1879.

Sonntag WE, Forman LJ, Miki N, Steger RW, Ramos T, Arimura A (1981). Effects of CNS active drugs and somatostatin antiserum on growth hormone release in young and old male rats. Neuroendocrinology 33:73-77.

Sugihara H, Wakabayashi I, Minami S, Takahashi F, Shibasaki T, Ling N (1988). Effect of alpha-methyl-p-tyrosine and an antiserum to rat growth hormone (GH)-releasing factor (GRF) on plasma GH secretory profile during a continuous infusion of human GRF in rats. Brain Res 475:128.

Tannenbaum GS, Guyda HJ, Posner BI, Posner BI (1983). Insulin like growth factor: a role in growth hormone negative feed-back and body weight regulation via brain. Science 220:77-79.

Tannenbaum GS, Martin JB, Colle E (1976). Ultradian growth hormone rhythm in the rat. Effects of feeding, hyperglycaemia and insulin induced hypoglycaemia. Endocrinology 99:720-727.

Tannenbaum GS, Ling N (1984). The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. Endocrinology 115:1952-1957.

Tashjian AR, Borowski NJ, Jensen BK (1971). Thyrotropin releasing hormone: Direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. Biochem Biophys Res Commun 43:516-523.

Tatar R, Vigas M (1984). Role of alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors in the growth hormone and prolactin response to insulin induced hypoglycaemia in man. Neuroendocrinology 39:275-280.

Tresguerres JAF, Esquifino AI (1983). Posibles mecanismos de interacción entre gonadotropinas y prolactina en un modelo de hiperprolactinemia experimental. Acta Fisiológica Latinoamericana 33:257.

Tresguerres JAF (1987). Somatomedinas. Pediatría 45:46-55.

- Tresguerres JAF (1989). En: Fisiología Endocrina. Eudema. Madrid.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and  $\beta$ -endorphine. *Science* 213:1394-97.
- Vance ML, Kaiser DL, Frohman LA, Rivier J, Vale WW, Thorner MV (1987). Role of dopamine in the regulation of growth hormone secretion. Dopamine and bromocriptine augment growth hormone (GH) releasing hormone-stimulated GH secretion in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1136-1141.
- Vincent SR, Hokfelt T, Wu JY (1982). GABA neuronsystem in the hypothalamus and the pituitary gland. *Neuroendocrinology* 34:117.
- Walker DG, Simpson ME, Asling CW y Evans HM (1950). *Anat Rec* 106:539-554.
- Wass JAH (1983). Growth hormone neuroregulation and clinical relevance of somatostatin. *Clin Endocrinol Metabolism* 12:695-724.
- Waynforth HB (1980). Experimental and surgical techniques in the rat. Academic Press. London. pp 143-152.
- Weigent DA, Blalock JE (1991). The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cell Immunol* 135:55-65.
- Weiner RI, Ganong WF (1978). Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol Rev* 58:905.
- Weiss J, Cronin MJ, Thorner MO (1987). Periodic interactions of GH-releasing factor and somatostatin can augment GH release in vitro. *Am J Physiol* 253:E508-E514.
- Wehrenberg WB, Brazeau P, Luben R, Bohlen P, Gullemin R (1982a). Inhibition of the pulsatile secretion of growth hormone by monoclonal antibodies to the growth hormone-releasing factor (GRF). *Endocrinology* 111:2147-2148.
- Wehrenberg WH, Ling N, Bohlen P, Esch F, Brazeau P, Guillemin (1982b). Physiological roles of somatostatin in the regulation of growth hormone secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 109:562-567.

- Wehrenberg WB, Ling N (1983). The absence of an age-related change in the pituitary response to growth hormone-releasing factor in rats. *Neuroendocrinology* 37:463-466.
- William F, Ganong WF, Hume D (1956). The effect of graded hypophysectomy on thyroid, gonadal and adrenocortical function in the dog. *Endocrinology* 59.
- Willoughby JO, Koblar S, Jervois PM, Menadue MF, Oliver JR (1983). Evidence that the regulation of growth hormone secretion is mediated predominantly by a growth hormone-releasing factor. *Neuroendocrinology* 36:358-363.
- Wilson JM, Traub AI, Sheridan B, Thompson W, Atkinson AB (1988). Conventional dose intravenous pulsatile GnRH therapy does not induce ovulation in polycystic ovarian disease. *Acta Endocrinologica* 117:289.
- Wislocki GB y King LS (1936). The permeability of the hypophysis and the hypothalamus to vital dyes with a study of the hypophyseal vascular supply. *Am J Anat* 58:421-472.
- Wolf PD, Lantigua R, Lee LA (1979). Dopamine inhibition of stimulated growth hormone secretion: Evidence for dopaminergic modulation of insulin and L-Dopa induced growth hormone secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 49:326-330.
- Xuefan XV, Björntorp P (1987). Effects of sex steroid hormones on differentiation of adipose precursor cells in primary culture. *Exp Cell Res* 173:311-321.
- Yeh KY, Yeh M, Holt PR (1989). Induction of intestinal differentiation by systemic and not by luminal corticosterone in adrenalectomized rat pups. *Endocrinology* 124:1898-1904.
- Yen SSC, Hoff JD, Lasley BC, Casper RD, Sheehan K (1980). Induction of prolactin release by CRF and CRF-antagonist. *Life Sci* 26:1963.
- Ying SY (1988). Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 9:267.

Yu WH, Seeburg PH, Nikolics SK, McCann SM (1988). Gonadotropin-releasing hormone-associated peptide exerts a prolactin-inhibiting and weak gonadotropin-releasing activity in vivo. *Endocrinology* 123:390.

Zarrow WX, Yochim JM, McCarty JL (1964). *Experimental endocrinology, a source book of basic techniques*. Academic Press. New York. pp 308-310.