

163
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología

**REGULACION DEL CRECIMIENTO TUMORAL DE LA
ADENOHIPOFISIS EN DISTINTAS VARIETADES DE
RATAS POR ESTROGENOS Y HORMONAS HIPOTALAMICAS.**

T E S I S

Para Obtener el Título de :

B I O L O G O

Presenta :

JULIETA PONZANELLI VELAZQUEZ

México, D. F. 1991.

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

PROLOGO.....	1
INTRODUCCION.....	3
1) Generalidades.....	3
2) Generalidades de la Regulación Endócrina.....	6
3) Regulación Endócrina de los Lactotropos.....	9
4) Alteraciones en la Regulación de los Lactotropos.....	11
5) Regulación Estrogénica de los Lactotropos en Distintos Estadios Fisiológicos y Clínicos.....	13
a) Ciclo Reproductor Femenino.....	15
b) Embarazo.....	18
c) Lactancia.....	19
d) Envejecimiento.....	21
e) Ratones Hipogonádicos.....	22
6) Tumorigenesis Adenohipofisiaria en Ratas : Participación de Estrógenos.....	22
a) Características del Tumor.....	22
b) Sensibilidad Variable a los Estrógenos en Ratas de Diversas Cepas.....	24
OBJETIVOS	31
PROCEDIMIENTOS	32
1) Animales.....	32
2) Diseño Experimental.....	32

3) Manipulaciones.....	33
a) Ovariectomía.....	33
b) Implantación de Cápsulas con 17 β -estradiol.....	34
c) Desimplantación de Cápsulas con 17 β -estradiol.....	35
4) Determinaciones.....	35
5) Análisis Estadístico.....	36
RESULTADOS	37
1) Curvas de Crecimiento Corporal y Adenohipofisiario en Ratas Hembra Wistar Intactas.....	37
2) Efectos del 17 β -estradiol en Ratas Hembra de la Cepa Wistar.....	37
a) Efecto Sobre el Crecimiento Adenohipofisiario.....	37
b) Efecto Sobre los Niveles de PRL en Sangre.....	39
c) Efecto Sobre el Peso Corporal de los Animales.....	40
3) Efectos del 17 β -estradiol en Ratas Hembra de la Cepa Sprague-Dawley.....	40
a) Efecto Sobre el Crecimiento Adenohipofisiario.....	41
b) Efecto Sobre los Niveles de PRL en Sangre.....	42
c) Efecto Sobre el Peso Corporal de los Animales.....	42
DISCUSION	44
BIBLIOGRAFIA	66

PROLOGO

Una de las líneas de investigación en el laboratorio en el que trabajo, se ocupa del estudio de los mecanismos de regulación de ciertos procesos neuroendócrinos y los factores y condiciones que pueden conducir a disfunciones y alteraciones patológicas en los mismos en diversos organismos. Indudablemente, algunos de los fenómenos biológicos que llaman más la atención lo constituyen las alteraciones halladas en diversos procesos de secreción y en los distintos mecanismos de regulación de la proliferación celular. Estas alteraciones resaltan por la incidencia que alcanzan en la población humana y por el detrimento que tienen sobre la vida del individuo.

Como fines de estudio, nosotros hemos elegido un modelo de crecimiento tumoral adenohipofisiario inducido en ratas por la administración de estrógenos, que involucra principalmente a las células llamadas lactotopos y cuya patología se conoce con el nombre de prolactinoma. Este modelo es fácilmente reproducible y, si bien ha sido caracterizado ampliamente en los últimos 40 años, aún no se conocen los mecanismos finos por los cuales los estrógenos ejercen estos efectos. Aún más llamativo resulta el hecho de que los mecanismos de disparo y/o control de la hiperplasia de los lactotopos en roedores parecen ser una característica altamente variable dado que la sensibilidad a los estrógenos es dramáticamente distinta según la variedad de rata. Consideramos que un acercamiento al problema podría lograrse mediante el estudio de este fenómeno en ratas ubicadas en los extremos opuestos de la gama de sensibilidad ya mencionada. Entre estas se encuentran las ratas pertenecientes a las cepas Wistar (W) y Sprague-Dawley (SD), a las que tenemos acceso en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM.

Pensamos que, para conocer el grado de participación que tienen los estrógenos en la inducción tumoral de la adenohipófisis (AH) de la rata, es necesario conocer el efecto que provocan en el crecimiento y en el funcionamiento de la glándula, es decir, las alteraciones que pueden producir en la proliferación y metabolismo de los lactotopos, en la síntesis y en la secreción de prolactina (PRL). Con este fin, realizamos una serie de determinaciones que consistieron en la medición del peso en fresco de la adenohipófisis, del contenido total de proteínas y de ácido

desoxirribonucleico (ADN) en esta glándula, así como de los niveles de PRL en sangre. También se registró el peso corporal de los animales durante el tratamiento experimental.

Hay que mencionar que el modelo de crecimiento tumoral adenohipofisiario en la rata, inducido por la aplicación de estrógenos, puede considerarse un modelo útil en el estudio de los posibles mecanismos y factores que participan en el desarrollo de este tipo de tumores en el hombre, ya que presentan características morfológicas y funcionales semejantes y pueden ser manipulados a conveniencia.

INTRODUCCION

1) Generalidades.

El propósito del presente trabajo es resaltar la importancia del estudio de los fenómenos de tumoración por dos razones : primero, por tratarse de procesos biológicos en los que participan diversos, y aún no bien caracterizados, factores y mecanismos de regulación y, segundo, por tratarse de problemas sobresalientes de salud pública.

La importancia manifiesta del estudio de los tumores y de las alteraciones en la secreción de la glándula hipofisaria se hace evidente por la incidencia que alcanzan y por el impacto que tienen sobre la población humana en edad reproductiva. A continuación se expondrán algunos datos epidemiológicos que hablan de la relevancia del problema.

Los desórdenes de la hipófisis encontrados más frecuentemente en la práctica clínica son los que involucran a las alteraciones de tipo proliferativo y secretor de las células secretoras de PRL o lactotropos, que originan las patologías conocidas como prolactinomas e hiperprolactinemia (1-4). Se sabe que los tumores de la hipófisis representan el 10 % de todas las neoplasias intracraneales (1, 3) y que, incluso, el examen rutinario de la glándula durante las autopsias revela una tasa de prevalencia de microadenomas en la población hasta del 25 (1) y 27 % (5). Se estima que la incidencia de prolactinomas es de 10 a 20 veces mayor en las mujeres que en los hombres (6). Por otro lado, la aparición del cuadro hiperprolactinémico en mujeres se asocia, en gran medida, con la presencia de este tipo de tumores adenohipofisarios (6, 7). Así, se presume que el desarrollo de estos prolactinomas es responsable, por lo menos, del 30 % de los casos de mujeres con hipersecreción de PRL (7). La hiperprolactinemia se ha encontrado en un 70 % de los pacientes con anomalías de la silla turca (estructura ósea en la base del cráneo en donde se aloja la hipófisis) que no presentan hipersecreción de la hormona de crecimiento ni de la hormona corticotrópica o ACTH (3, 6).

Actualmente se reconoce a la hiperprolactinemia y a los tumores hipersecretorios de prolactina como una de las causas principales del síndrome de galactorrea-oligomenorrea en mujeres y de infertilidad e impotencia en hombre (1, 2). Se considera que la hiperprolactinemia es la

segunda causa de amenorrea secundaria (1), llegando a producir hasta el 40% de los casos (8). Aproximadamente del 25 al 30% de los casos de infertilidad en la mujer se deben a dicha alteración (1). En los hombres la hiperprolactinemia se presenta como la causante del 5 al 25% de los casos de impotencia (1).

Estos datos justifican el interés en el estudio de los mecanismos que producen estas alteraciones ya que, en buena medida, es la población en edad reproductiva la más vulnerable.

Por otra parte, no puede considerarse de menor importancia el estudio científico del proceso de tumoración en un modelo experimental como el que resulta de la inducción estrogénica en la rata, ya que permite la manipulación necesaria para la disertación de los posibles factores y mecanismos involucrados tanto en un crecimiento de tipo patológico como en uno normal. Entre otros de los muchos fenómenos de estudio que también nos son accesibles gracias al modelo experimental de la rata, se encuentran el de la reproducción y el del envejecimiento que, junto con el de tumoración, presentan interesantes correlaciones en el organismo.

Como se demuestra a continuación, es un hecho muy conocido que la formación de tumores adenohipofisarios, particularmente aquellos hipersecretores de prolactina, es una característica del envejecimiento de la rata, a la vez de que representan la patología más común a edad avanzada (9-11)

Existen reportes de que estas alteraciones proliferativas en las ratas de diversas cepas (Wistar, Sprague-Dawley, Holtzman, Long-Evans, etc.) son más frecuentes en las hembras que en los machos (9-11). Este fenómeno se correlaciona de igual forma en los humanos (6), lo que pone de manifiesto una asociación entre la incidencia de la patología y la condición sexual, estando, evidentemente, implicados los niveles circulantes de hormonas estrogénicas, de las que las hembras son preponderantemente productoras (12, 13).

Es sabido que las alteraciones proliferativas de los lactotopos en la rata comienzan a manifestarse desde mediana edad (más de 10 meses de vida) siendo comunes cuando los animales envejecen (más de 24 meses de edad) (9-11). Esto también parece tener correlación con lo reportado en el hombre, ya que aunque el desarrollo de prolactinomas llama el interés por las implicaciones que tienen sobre las personas en edad reproductiva, su

expresión, sin embargo, parece acrecentarse también conforme avanza la edad (14, 15).

Por otra parte, tanto la formación de tumores espontáneos de la adenohipófisis en ratas, como aquellos inducidos por el tratamiento estrogénico en estos animales, se presentan como un fenómeno altamente variable según el tipo de cepa de rata e, incluso, según el grupo de ratas analizado dentro de una misma cepa (11, 16-22). A continuación, expondré algunos datos sobre la incidencia de estos tumores espontáneos de los lactotropos en las ratas de diversas cepas.

Se ha reportado para la cepa Wistar/ Furth/ Ico una incidencia del 32.7 % de prolactinomas en ratas de más de 10 meses de edad, cifra que alcanza su máximo (56.2 %) entre los 28 y 32 meses de edad. En el primer caso la incidencia en hembras es del 74.2 % y en el segundo de 88.8 %. Además, se encuentra una correlación lineal entre el logaritmo del peso del prolactinoma o del tamaño del tumor y el logaritmo del grado de prolactinemia alcanzado (11).

También se ha observado que, en machos de la cepa Charles River, de aproximadamente 25 meses de edad, existe una incidencia del 70 % de prolactinomas, y que en la cepa Wistar/ Furth es del 60 %. Por otro lado, se encontró que las ratas que portan adenomas tienen un peso corporal menor que las que carecen de ellos (9), fenómeno que se expresa de igual forma en ratas tratadas con estrógenos, como se verá más adelante.

Finalmente, se ha reportado una incidencia de más del 50 % de prolactinomas en la población de ratas macho de la cepa Long-Evans mayores de 36 meses de edad. También se observó que algunos prolactinomas mostraron una actividad multihormonal pues, además de PRL, secretaron otras hormonas como GH, ACTH, etc. (10).

Debido a las características morfológicas y a las respuestas farmacológicas similares que presentan, no es de extrañar que ya algunos autores (10, 11) hayan propuesto al modelo de tumoración espontánea que involucra a los lactotropos de ratas como un modelo útil para el estudio de dicha patología en humanos.

En su mayoría, ambos prolactinomas, el de humanos y el de roedores, se presentan como adenomas hemorrágicos, es decir, muy vascularizados (23). Las células que predominan en el tumor presentan pocos gránulos y

en su mayoría son positivas a la inmunotinción con anticuerpos anti-PRL y presentan bien desarrollado el retículo endoplásmico rugoso (2, 11).

Sin embargo, en todos los tumores de este tipo existe una variación estructural considerable, lo que, entre otras cosas, ha llevado a algunas personas a tratar de clasificarlos como micro y macroadenomas y como adenomas lactotrópicos densa y pobremente granulados (1, 2, 4, 5). Además de las variaciones morfológicas, también se han observado variaciones funcionales en ellos puesto que, mientras para algunos pacientes resulta conveniente cierta terapia farmacológica o quirúrgica, para otros resulta ineficiente (1, 4, 5). Estas variaciones bien pudieran estar sugiriéndonos mecanismos distintos de regulación por los cuales se estarían generando estas patologías, entre los que posiblemente se encuentran alteraciones en la regulación que el hipotálamo ejerce sobre los lactotropos, especialmente a través de la hormona dopamina o DA (24), y/o bien en los que la acción directa e indirecta de factores periféricos, como es el caso de los esteroides ováricos, pudiera ejercer un papel importante (32).

En realidad, se requieren de estudios más finos en el escrutinio de la glándula adenohipofisaria y de criterios más unificados para resolver lo que, en algunos casos, a la vista se revela inconexo, como es lo que se observa ante la existencia de un estado hiperprolactinéxico sin el aparente desarrollo tumoral de la AH, pudiendo sí haberlo (12). Como mencionan Furth y cols, (15), no hay que perder de vista que los tumores de la hipófisis parecen ser más frecuentes en el hombre y en la rata de lo que se reporta en la literatura, ya que no se realiza la examinación rutinaria de la glándula en necropsias y a que, de hecho, muchos tumores son microscópicos, de lenta evolución y comúnmente se presentan como "adenomas silenciosos".

2) Generalidades de la Regulación Endócrina.

Las funciones del cuerpo están reguladas en forma integrativa por tres sistemas principales de control : el nervioso, el inmunológico, y el hormonal o endócrino. En general, este último, mediate la producción y liberación de efectores químicos llamados hormonas, se relaciona con las diversas funciones metabólicas del organismo, controla la intensidad de funciones químicas en las células, rige el transporte de sustancias a través de las membranas celulares y otros aspectos del metabolismo de las células,

como crecimiento y secreción (25). La mayor parte de las hormonas se producen y secretan en las glándulas endócrinas y son transportadas por la sangre hacia todo el cuerpo (25). Algunos efectos hormonales se producen en segundos, otros requieren días para iniciarse y pueden mantenerse desde segundos hasta meses (25).

Existe una unión íntima entre los sistemas nervioso y endócrino al nivel del hipotálamo y la hipófisis que sirve para integrar a los dos sistemas en una unidad de control funcional (13), el llamado sistema neuroendócrino. El regulador central endócrino de las demás glándulas endócrinas periféricas que controla una gran diversidad de funciones y que además se halla regulada de manera compleja es la glándula hipófisis (26).

La hipófisis tiene grandes influencias sobre el metabolismo celular de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; sobre el balance hídrico y electrolítico; sobre la diferenciación celular; sobre el crecimiento, maduración, metabolismo y temperatura corporal; en la regulación de funciones cardiovasculares y en los fenómenos de reproducción y lactancia; en la pigmentación de la piel; en la modulación del comportamiento; en la resistencia al estrés e infecciones, etc. (26).

La hipófisis se halla alojada sobre una estructura ósea en la base del cráneo conocida como silla turca y está unida al hipotálamo por el tallo hipofisiario. Desde el punto de vista fisiológico, la hipófisis se divide en dos porciones: la hipófisis anterior o adenohipófisis, y la hipófisis posterior o neurohipófisis (25).

En gran parte, la secreción de la hipófisis está controlada por señales hormonales o nerviosas provenientes del hipotálamo. La secreción de la hipófisis posterior está controlada por fibras nerviosas originadas en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo (25). En contraste, no existe una conexión nerviosa directa entre el cerebro y la adenohipófisis, por lo que el arreglo especial de neuronas de la parte inferior del hipotálamo que terminan en una región conocida como "eminencia media", es la que ejerce control sobre la AH mediante la liberación de factores hipotalámicos de tipo estimulatorio e inhibitorio que se transportan a la glándula a través de pequeños vasos porta, del llamado sistema porta hipotálamo-hipofisiario (5, 25). Así, la AH recibe la mayoría de su aporte sanguíneo a través de la circulación porta-hipofisiaria. En ella, la

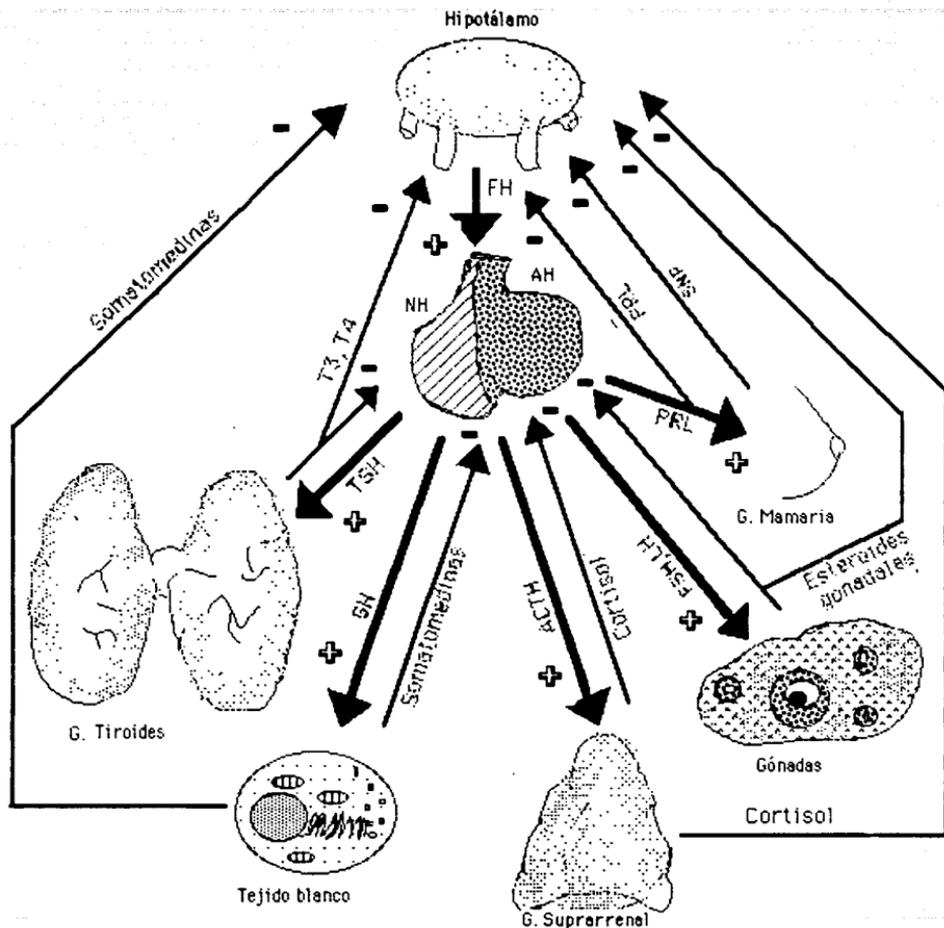
concentración de los factores hipotalámicos reguladores es varios órdenes de magnitud mayor que en la circulación periférica (23).

En la adenohipófisis existen cinco tipos celulares bien definidos, cada uno de ellos especializado en la síntesis y secreción de hormonas bien caracterizadas. Así, los somatotropos producen a las hormonas de crecimiento (GH), los corticotropos a la corticotropina (ACTH), los tirotropos a la hormona estimulante del tiroides (TSH), los gonadotropos producen a la hormona luteinizante (LH) y a la hormona estimulante del folículo (FSH) y, finalmente, los lactotropos están especializados en la síntesis y secreción de la prolactina (PRL) (25).

La secreción hormonal de estas células está regulada a distintos niveles y constituye parte importante de sistemas endócrinos en los que operan mecanismos de retroalimentación, como son los sistemas hipotálamo-hipófisis-órganos periféricos. Así, diversos factores proteicos provenientes del hipotálamo regulan la secreción de las hormonas de la hipófisis. Estas hormonas hipofisarias, a su vez, se desplazan por la circulación periférica ejerciendo sus efectos en órganos blanco, en su mayoría glándulas. Como respuesta de la comunicación hormonal, estos órganos blanco liberan también distintas hormonas que, además de participar en diversos procesos, retroalimentan nuevamente al sistema a nivel nervioso central y/o hipofisiario.

Un ejemplo de esto lo muestra el sistema hipotálamo-hipófisis-gónadas. La hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH) actúa sobre los gonadotropos de la AH induciendo la producción y secreción de FSH; ésta actúa sobre las gónadas estimulando la producción de hormonas sexuales como los estrógenos. Estos, además de jugar un papel fundamental en los fenómenos de reproducción, promoviendo, por ejemplo, la proliferación y diferenciación del tracto reproductivo y de la glándula mamaria en ciertos períodos y de participar en el control de la maduración ósea, en el metabolismo del calcio, en promover la síntesis de varias proteínas del hígado, en contribuir a la regulación del metabolismo de lípidos y a la distribución de grasa y en muchos procesos más, retroalimentan nuevamente al hipotálamo y a la hipófisis regulando, así, su propia producción (26).

Igualmente, como se ilustra en el esquema siguiente, existen otros órganos blanco para las distintas hormonas producidas en la adenohipófisis,



Esquema. Representación esquemática de la función de los sistemas de retroalimentación hipotálamo-hipófisis-principales órganos blanco. Las flechas con símbolos negativos representan la inhibición del sistema sobre la síntesis y secreción de factores reguladores, mientras que las flechas con símbolo positivo representan la estimulación del sistema. Adenohipófisis (AH), neurohipófisis (NH), glándula (G.), factores hipotálámicos (FH), triyodotironina (T3), tetrayodotironina (T4), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona de crecimiento (GH), hormona adenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), prolactina (PRL), sistema nervioso periférico (SNP).

como son : la glándula tiroides para TSH, la glándula mamaria y otros tejidos para PRL, las glándulas suprarrenales para ACTH y prácticamente todos los tejidos del cuerpo para GH (26).

3) Regulación Endócrina de los Lactotropos.

Es notorio como la mayoría de las células adenohipofisarias dependen para su funcionamiento de factores hipotalámicos de tipo estimulador, ya que el bloqueo de la acción hipotalámica, ya sea por medio de lesiones en el tallo hipofisario, o por la inducción de alteraciones electrolíticas en la eminencia media, o debido al transplante de la AH fuera del alcance hipotalámico en las ratas (bajo la cápsula renal, por ejemplo), ocasiona que casi todas las células sufran atrofia y pierdan la habilidad de producir y secretar sus hormonas (25, 26). La única excepción a esto lo constituyen los lactotropos ya que, bajo las mismas condiciones, la síntesis y secreción de PRL se ve estimulada (5, 25).

Esto se debe a que el hipotálamo ejerce predominantemente una inhibición tónica sobre la síntesis y secreción de PRL, principalmente mediante la dopamina (5, 27). Numerosos trabajos, tanto *in vivo* como *in vitro* en los que se emplean agonistas dopaminérgicos, como son los derivados del ergot, apoyan lo anterior (5, 28, 29). En forma contraria, se ha observado que el empleo de agentes bloqueadores de la acción dopaminérgica, como son los que impiden su síntesis (α metil p-tirosina) o los que compiten por los receptores (Haloperidol, Perfenazina, etc.), estimulan la síntesis y liberación de PRL (5). Además, hay evidencia de que en la regulación de la síntesis y secreción de PRL participan también factores hipotalámicos de tipo estimulador como son la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), serotonina, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), etc. (5). Igualmente, la PRL tiene efectos retroalimentadores sobre su propia secreción, en este caso negativos, ya que, en la circulación, estimula a las neuronas tuberoinfundibulares del hipotálamo provocando la liberación de DA (30, 31).

Los factores hipotalámicos de tipo inhibitorio y estimulador actúan como intermediarios de estímulos fisiológicos como son la succión, el ciclo luz-oscuridad y el estrés, y en procesos biológicos como son la lactancia, el ciclo circádico y el ciclo ovulatorio, en los que también participan hormonas

y factores periféricos, como los estrógenos y la progesterona, que llegan a la AH a través de la circulación sistémica y/o que alteran la regulación directa del hipotálamo sobre la glándula (5, 32).

Se sabe que los estrógenos estimulan la síntesis y secreción de PRL y que también tienen un efecto hipertrófico y mitogénico sobre los lactotrofos (1, 20, 22, 32-35). Existe conocimiento de que parte de dicha regulación depende de mecanismos directos de los estrógenos sobre los lactotrofos. Esto se evidencia en estudios *in vitro* en los que los estrógenos estimulan la síntesis y secreción de PRL y la proliferación de los lactotrofos, pero lo hacen en menor medida que cuando se administran directamente a los animales (20, 36, 37). Así además de los efectos directos, se cree que los estrógenos regulan también a estas células, a través de mecanismos indirectos alterando la acción de neuronas hipofisiotrópicas, ya sea contrarrestando la regulación inhibitoria que ejerce el hipotálamo, o favoreciendo la regulación por agentes estimulatorios, como es TRH (5, 32, 38). Incluso, se ha encontrado que los estrógenos inducen la producción de diversos factores de crecimiento en ciertos órganos (cerebro, riñón, hígado, útero), capaces de estimular la proliferación y funcionamiento de los lactotrofos (39).

Otro agente periférico que también tiene influencia sobre los lactotrofos es la progesterona, contrarrestando el efecto estimulatorio que los estrógenos tienen sobre la liberación de PRL (40).

A su vez, el interés en el estudio de la regulación en el funcionamiento y crecimiento de los lactotrofos se pone de manifiesto por los datos que se describen a continuación.

La prolactina es la más versátil de todas las hormonas de la hipófisis, tanto por el número como por la diversidad de procesos fisiológicos que regula (29). Se han reportado 85 distintos efectos de la PRL en los vertebrados (41), lo que indica la importancia de esta hormona en la fisiología y evolución de los vertebrados. El efecto de la PRL que se ha estudiado más ampliamente es el que tiene sobre la glándula mamaria. En los mamíferos, la prolactina juega un papel decisivo en la preparación y mantenimiento de la glándula mamaria para la síntesis y evacuación de la leche durante la lactancia (29, 42), de ahí que también se la haya llamado hormona mamotrópica o lactogénica (41).

La llamada prolactina no es una molécula única si no una familia de variantes moleculares que difieren, unas de otras, en su actividad biológica e inmunológica (5, 29). Tal parece que diferentes formas moleculares de PRL son preferencialmente liberadas en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos (5, 43). Esto podría explicar, en parte, las considerables discrepancias que se han notado en consideración a la cuantificación del contenido de PRL en la glándula hipofisiaria y en la sangre usando diferentes sistemas de bioensayos, de métodos electroforéticos y de radioinmunoensayos (5). Igualmente, se ha sugerido la existencia de una heterogeneidad funcional de los lactotrofos en la glándula adenohipofisiaria normal en base a resultados obtenidos con métodos de separación celular, como son los de sedimentación, y al análisis del patrón de secreción de PRL de células individuales, ante diferentes procesos fisiológicos (5). No sería de extrañar, que en determinadas condiciones patológicas, como son la formación de tumores hipersecretorios de PRL, algunas de las "subpoblaciones" de lactotrofos y algunas de las variantes moleculares de la PRL estuvieran más o menos favorecidas en su expresión dependiendo del posible tipo de mecanismo que ha dado origen a dicha alteración, lo que concordaría con las variaciones morfológicas observadas en los prolactinomas y las discrepancias halladas en la cuantificación de PRL por diversos métodos.

4) Alteraciones en la Regulación de los Lactotrofos.

Hasta la fecha, la etiología de los tumores adenohipofisarios hipersecretorios de prolactina en humanos y roedores es aún poco conocida.

En base a lo expuesto en la sección anterior, cabe suponer que el origen de dicha patología obedece, al menos en parte, a disfunciones en cualquiera, o en ambos, de los sistemas hipotalámicos o periféricos que regulan a la adenohipófisis. Concretamente, en estos últimos, en lo que concierne a la acción ejercida por los estrógenos.

Para muchos autores la fisiopatología común en todos los desórdenes que involucran a la hiperprolactinemia parece ser un defecto en los mecanismos de regulación que ejerce el hipotálamo y en especial la dopamina sobre los lactotrofos (1, 4, 5, 15, 44, 45). Esto se basa en el hecho de que lesiones en el tallo hipofisario, el transplante de la AH de ratas a

sitios alejados de la influencia hipotalámica (como es la cápsula renal), y a que el empleo de drogas antagonistas de la acción dopaminérgica, inducen una hipersecreción de PRL (1, 5, 23, 26).

Se han planteado hipótesis alternativas por las que alteraciones en el sistema hipotálamo-hipófisis podrían estar induciendo la formación de prolactinomas. Por un lado, se piensa que podrían encontrarse dañadas las neuronas tuberoinfundibulares que son las que producen la DA que llega a la AH, y que, por lo tanto, el aporte de esta hormona a los lactotropos estaría reducido. Por otra parte, se postula que un estado de insensibilidad de estas células al estímulo dopaminérgico podría originarse por alteraciones en los elementos de la comunicación, por ejemplo, en los receptores (24).

Otra propuesta interesante sobre cómo se podrían generar los prolactinomas en el hombre y en la rata la hace el grupo de R. Weiner (23, 46). Se ha observado que en la mayoría de los casos, en el tumor adenohipofisiario del hombre y de la rata, existe la formación adicional de vasos provenientes de la carótida (19, 23, 46). Estos vasos estarían supliendo a la AH de una irrigación adicional de sangre periférica, lo que traería como consecuencia una dilución de las concentraciones de DA que llegan a la AH por el sistema porta-hipofisiario, ocasionando un "escape" de los lactotropos del tono inhibitorio dopaminérgico.

Estas suposiciones podrían explicar, en un momento dado, las disfunciones halladas en la maquinaria sintética y secretora del lactotrofo pero hasta la fecha no hay información contundente de que, por sí sola, la ausencia del factor dopaminérgico pueda provocar cambios en la tasa de división celular de los lactotropos. En un estudio particular (47) observan que lesiones en el hipotálamo medio basal en ratas ovariectomizadas (que carecen de esteroides ováricos) incrementan la secreción de PRL y aumentan el volumen adenohipofisiario ocupado por los lactotropos. Sin embargo, no logran discriminar si dicho aumento se debe a una hipertrofia o a una hiperplasia celular.

Por otro lado, la suposición de alteraciones hipotalámicas explica parcialmente el problema, ya que si bien el tratamiento con agonistas dopaminérgicos, como es el caso de la bromocriptina, revela, en la mayoría de los casos, resultados satisfactorios, para algunos pacientes no resulta exitoso (1, 48). Por otra parte, si bien la administración de agentes

dopaminérgicos puede resolver en alguna medida el problema, ésto no necesariamente quiere decir que una alteración en la acción dopaminérgica fuera la causa de dicha patología, puesto que las dosis tan elevadas de los fármacos que se administran hacen responder al sistema favorablemente impidiéndonos conocer los mecanismos reales del origen de la patología.

En realidad, hay que pensar al fenómeno de forma integrativa entendiéndolo como resultado de la interacción de múltiples y diversos factores actuando quizás bajo condiciones distintas. En este sentido, valdría la pena pensar que alteraciones en los sistemas de regulación periférica sobre la AH, como los que se ejercen a través de la acción de los estrógenos, estarían teniendo también una participación en la inducción y/o regulación del proceso de tumoración adenohipofisaria.

Tanto en el hombre como en la rata, existen distintos estadios fisiológicos en los que los estrógenos mantienen una regulación importante sobre los lactotrofos (49-52), como se detallará más adelante. Sin embargo, se presenta un hecho muy llamativo que sugiere que el desarrollo de tumores espontáneos hipersecretorios de PRL en la rata parece ser un proceso mediado principalmente por esteroides ováricos y se basa en el hecho de que la administración de estrógenos en estos animales induce la formación de prolactinomas (16, 17, 19, 20, 22, 33, 53-55).

Como ya se mencionó, la acción estrogénica responsable del origen y mantenimiento del prolactinoma puede ser mediada directamente sobre los lactotrofos o puede expresarse de forma indirecta modificando la regulación inhibitoria y estimulatoria que mantiene el hipotálamo, a la vez que promueve la participación de otros factores de tipo estimulatorio capaces, también, de actuar en la AH (38, 39, 56).

5) Regulación Estrogénica de los Lactotrofos en Distintos Estadios Fisiológicos y Clínicos.

Se sabe que los estrógenos tienen numerosos efectos y a distintos niveles sobre el funcionamiento de los lactotrofos, que van desde la secreción hasta la replicación celular. Sobre los mecanismos que regulan la replicación de estas células prácticamente no existe información. Sobre el proceso de transcripción de la PRL existe información de 9 años a la fecha, mientras que para la síntesis de PRL de hace 15 años. Es definitivamente en

el estudio de los procesos de secreción en donde se cuenta con una gran cantidad de trabajos. En su mayoría se trata de investigaciones agudas por lo práctico que resultan. Es por ésto, que en algunos de los casos quedará mejor expuesto lo relacionado a la síntesis y secreción de PRL pero no por ello hay que perder de vista la posibilidad de que estos efectos se ejerzan a distintos niveles.

En estudios iniciales sólo se podía tener una idea del grado de producción de PRL en la AH estimando el contenido total de dicha hormona en la glándula, lo cual no necesariamente revela el estado funcional del sistema, puesto que pueden existir condiciones fisiológicas en las que las glándulas endócrinas liberen muy poco de su producto, lo que al cabo del tiempo se traduce en la presencia de niveles hormonales elevados en dichas glándulas y no estrictamente en altos niveles de producción.

Un mejor acercamiento para entender el fenómeno de producción hormonal lo constituye el empleo de métodos en los que se puede estimar la síntesis proteica, y obviamente hormonal, ya que se puede evaluar la actividad celular conociendo la cantidad producida de una proteína por unidad de tiempo. Uno de tales métodos se basa en la incorporación de aminoácidos marcados en las células. Un método más fino para abordar lo mismo se basa en la detección celular de niveles de RNA mensajero específicos para determinadas proteínas, puesto que éstos son los precursores inmediatos de las mismas y tienen una vida media corta lo que haría imposible su almacenamiento.

Por otro lado, existen estudios en los que se trata de correlacionar el contenido y la secreción de PRL en la AH, lo cual no resulta muy fácil por la variación y la complejidad en la que se regulan estos procesos. Así, puede haber casos en los que se detecten bajos niveles de PRL en la AH y elevados en la circulación, lo que nos estaría hablando de que al mismo tiempo existe una gran producción y liberación de dicha hormona, es decir, que la actividad de los lactotrofos está muy aumentada. De otra forma, pueden coincidir bajos niveles de PRL tanto en AH y como en sangre, sugiriendo que este sistema endócrino está casi apagado. Como éstos, podemos encontrar muchos ejemplos más.

Es conocido que en distintos estadios fisiológicos, los estrógenos ejercen una regulación sobresaliente sobre el funcionamiento de los lactotrofos. Aunque estos fenómenos se presentan en todos los mamíferos,

están mejor estudiados en la rata y en el hombre. Sin embargo, todavía quedan poco claros los mecanismos por los que dichas hormonas median su acción. Además, el uso de esteroides ováricos en la población humana, con fines anticonceptivos y terapéuticos, ha despertado una polémica sobre la posible participación de estas hormonas en el desarrollo de alteraciones en los lactotrofos, como se verá más adelante.

a) Ciclo Reproductor Femenino.

Se sabe que la síntesis y secreción de PRL cambia durante el ciclo estral de la rata y que los niveles de estrógenos circulantes durante este período parecen ser el principal factor que regula dicho fenómeno (32, 49, 50, 52, 57).

Es reconocido que el pico de estrógenos que se da en la tarde del proestro es el responsable de la secreción característica no sólo de PRL si no de LH en ese período (5, 32, 50, 52). Se ha encontrado que el contenido de PRL en la AH está elevado en la mañana del proestro mientras que en la tarde alcanza su nivel más bajo como resultado de su liberación masiva a la circulación (57). Los niveles de mensajero de PRL en la AH presentan un pico en el proestro y otro en el estro; el primero se explica como resultado de la acción de los estrógenos, y el segundo como consecuencia de la estimulación en la proliferación de los lactotrofos, inducida también por estas hormonas (57, 58). De igual forma, la concentración más baja de PRL en sangre se observa durante el diestro II (50), correspondiendo con el bajo nivel de los estrógenos (59). El pico de PRL del proestro puede ser prevenido con la aplicación de antiestrógenos, como es el caso del Tamoxifén (60) y con anticuerpos contra estrógenos (52), lo que evidencia el control estrogénico sobre el patrón cíclico de la secreción de PRL.

Cabe mencionar que los niveles de PRL reportados en ratas durante el ciclo estral varían según los estudios, lo cual puede deberse a la variabilidad que existe entre las distintas cepas de rata, al método de cuantificación empleado, etc. Por ejemplo, se reporta que la cepa Wistar/Furth presenta un promedio de 120.7 ± 24.7 ng/ ml de PRL en el proestro y 20 ± 3.4 ng/ ml en el diestro II (50). En las ratas de la cepa Sprague-Dawley se observa un promedio de 68.5 ± 7.4 ng/ml de PRL en el estro (lo reportan como el nivel más alto) y 27.6 ± 5 ng/ml en el diestro II

(49). Incluso, se reportan diferencias en los niveles de PRL en el ciclo estral en una misma cepa de rata en diferentes laboratorios (50), lo cual nos habla de que a pesar de existir un comportamiento general se presentan variaciones entre grupos de organismos aislados reproductivamente y aún entre individuos. A groso modo, se observa que los niveles más elevados de PRL durante el ciclo estral van de 2 a 6 veces aquellos encontrados en el diestro II (49, 50).

Además de existir mecanismos directos por los que los esteroides ováricos regulan el ciclo reproductivo, también hay evidencia de que estas hormonas participan de forma indirecta alterando el comportamiento de neuronas neurohipofisiotrópicas. Estas hormonas sexuales también pueden estar modificando la sensibilidad de la AH a determinados agentes tróficos mediante la regulación a nivel de receptores. Concretamente, el pico de PRL hallado en el proestro puede verse favorecido por la inducción de modificaciones en el funcionamiento de neuronas dopoaminérgicas, ya que en algunos estudios (56, 61) se ha encontrado que los estrógenos provocan una inhibición en la liberación de DA en sangre portal en este período. También, se ha reportado que los estrógenos provocan el incremento en el número de receptores al secretagogo TRH en el mismo período (38).

Por otra parte, los estrógenos, además de regular el comportamiento de la secreción de PRL en el proestro, también regulan sus niveles en otras fases del ciclo estral puesto que cuando se practica la ovariectomía en los animales, estos niveles disminuyen significativamente y pueden restablecerse con la administración exógena de estrógenos (12, 32, 49, 50). Esto también se observa con métodos que detectan directamente niveles del mensajero de PRL en muestras de pequeño tamaño (62).

En un estudio particular, se encontró que en ratas de mediana edad (10 a 12 meses de edad) el efecto de la ovariectomía por un período prolongado (por más de 7 meses) provocó una disminución notable de la secreción de PRL y también redujo la proporción de células secretoras de PRL incluso por debajo de lo encontrado en ratas jóvenes (2 a 3 meses de edad). Aunque el primer parámetro se revierte con la aplicación de estrógenos, como ya se mencionó, queda ligeramente suprimida la respuesta al secretagogo TRH y aumentada la sensibilidad a DA en estas células. Se observa, que de alguna forma la presencia de los esteroides

ováricos durante la vida del animal tiene un marcado efecto sobre la replicación y la susceptibilidad de los lactotropos (38).

Todo esto se refuerza con lo encontrado en las ratas macho adultas, en las que los niveles de PRL son bajos y no sufren fluctuaciones, lo mismo que los niveles de estrógenos (49, 59).

En cuanto al comportamiento cíclico de los niveles de PRL en el ciclo reproductivo de la mujer, hasta la fecha existe poco consenso. Algunos estudios indican poca variación durante el ciclo menstrual mientras que otros reportan niveles elevados de PRL aparejados a los de LH (32), o por lo menos considerablemente más elevados durante la fase lútea del ciclo (13).

Igualmente se considera dudosa la relación que existe entre la ingesta de estrógenos en forma de anticonceptivos orales y el desarrollo de prolactinomas y de un estado de hiperprolactinemia (1, 63, 64). Si bien se ha reportado que los niveles de PRL en sangre son similares tanto en mujeres que ingieren estas hormonas como en las que no (63), hay que tener presente que los métodos que se utilizan para la detección de la PRL no son capaces de detectar todas las variantes que resultan del procesamiento natural de la hormona que pudieran estar involucradas durante la génesis y/o regulación, no sólo de los tumores adenohipofisarios, si no también, de otros tumores como es el de la glándula mamaria (46).

La existencia de mecanismos estrogénicos indirectos sobre los lactotropos podrían explicar, en parte, el que el 25 % de las mujeres que discontinúan la ingesta de estas hormonas presentan el síndrome de la hiperprolactinemia (1), y en mujeres en las que ya se presentaban algunos signos de la patología éstos se ven recrudescidos (8). En un estudio se encontró que más que el uso de estas hormonas para el control de la natalidad, es su uso para corregir transtornos de la menstruación el que involucra un riesgo significativo en la génesis del prolactinoma (65). Por otro lado, es factible pensar que la presencia adicional de estrógenos pudiera causar la expresión de lesiones preexistentes en la adenohipofisis (3).

Finalmente, un hecho llamativo lo marca la alta incidencia de prolactinomas que se presentan en personas que ingieren estrógenos para corregir su fenotipo sexual (64, 66).

b) Embarazo

Un fenómeno ampliamente conocido que expresa una regulación directa de los estrógenos sobre los lactotopos se presenta en mujeres embarazadas.

Es sabido que el incremento en el tamaño de la adenohipófisis, en el número de lactotopos y en la secreción de PRL durante el embarazo en mujeres está correlacionado con el aumento en los niveles endógenos de estrógenos (1, 3, 5, 64). Los niveles de estradiol en sangre se elevan progresivamente desde comienzo del embarazo, alcanzando niveles de hasta 130 veces entre las semanas 4 y 38 de gestación, mientras que los niveles de PRL se elevan 19 veces durante el mismo intervalo (13).

Esta estimulación en los niveles de PRL depende directamente de los estrógenos puesto que en mujeres con deficiencia de sulfatasa placentaria, que a su vez presentan bajos niveles de estrógenos, existen también niveles disminuidos de PRL (32).

En mujeres embarazadas, en las que previamente se ha detectado un prolactinoma y éste ha sido tratado terapéuticamente, existe un incremento en el crecimiento de este tumor (1), indicando la alta susceptibilidad de este tejido a la presencia de estrógenos.

Por el contrario, se sabe que durante el periodo de gestación de la rata los niveles de PRL en adenohipófisis y en sangre, así como los niveles de RNAm de PRL en AH, aparecen disminuidos durante la mayor parte del tiempo, elevándose significativamente uno o dos días antes del parto (40, 49, 50, 62). Una posible explicación de ello, es que se ha encontrado que los niveles de estrógenos en la sangre de venas del ovario permanecen bajos durante la mayor parte de la gestación y sólo se elevan al final de este período, al mismo tiempo que los niveles de progesterona decaen, la cual se ha encontrado que inhibe la acción estimulante de los estrógenos sobre la liberación de PRL (40, 49, 50).

c) Lactancia.

La lactancia constituye la última fase del ciclo reproductivo de todos los mamíferos (42, 67), en la cual la secreción de un compuesto con propiedades nutritivas, la leche, es el responsable de la supervivencia de los neonatos y por lo tanto de la especie (42).

El proceso de la lactancia tiene lugar gracias a la activación de mecanismos neuroendócrinos en los que el estímulo neurogénico de la succión juega el papel predominante, quedando en segundo término, entre otros, factores periféricos como los estrógenos (42, 67, 68). En estos mecanismos participan, principalmente, un complejo de hormonas (complejo galactopoiético) cuyos componentes varían de acuerdo con las especies y entre las que destaca la PRL, y que son las que determinan la secreción de la leche por la glándula mamaria (42, 68).

Durante el período de la lactancia es que se pueden encontrar los niveles más elevados en la síntesis y secreción de PRL en la rata y en el hombre (13, 49, 62), y es precisamente en donde se presenta y se ha estudiado mejor una de las regulaciones hipotalámicas más complejas e importantes sobre la síntesis y secreción de esta hormona. Dicha regulación también es de tipo pleiotrópico porque participan múltiples factores en interacciones diversas. Así pues, la secreción de PRL no debe considerarse como el resultado de la adición de factores inhibitorios y estimulatorios actuando sobre los lactotropos, si no como la integración de múltiples señales hormonales (69).

El mecanismo de regulación de la secreción de PRL durante la lactancia ya había sido anticipado por Grosvenor y Mena (69, 70) y ha sido confirmado con numerosos estudios. En realidad, forma parte de un sistema de retroalimentación en el que el estímulo neurogénico de la succión activa un reflejo neuroendócrino que genera la liberación de PRL hacia la circulación (68).

A groso modo, se ha encontrado que el estímulo de la succión genera impulsos nerviosos que convergen en el sistema nervioso central (SNC) modificando la actividad de las neuronas TIDA en el hipotálamo. Como consecuencia de esto, se crea inmediatamente una disminución transitoria en los niveles de DA que alcanzan a la AH, permitiendo una respuesta

potenciada de la secreción de PRL en los lactotropos por factores liberadores de PRL, como es TRH (71). En otras palabras, es el escape transitorio a la acción dopaminérgica lo que potencia la acción estimuladora de la liberación de PRL por varios secretagogos hipotalámicos (71). Se ha descrito, además, que este proceso ocurre en forma "fásica" ya que se requiere de la transformación de la hormona antes de que ésta sea liberada (68). La liberación potenciada de la PRL persiste en presencia del estímulo de la succión, cuando éste cesa, el control sobre la secreción de PRL es reasumido nuevamente por todos los estímulos y factores de los que ya hemos estado hablando (68). Incluso, como ya se ha mencionado, la regulación en la secreción de PRL también está mediada por los propios niveles circulantes de la hormona (31, 61). El incremento en los niveles de PRL en la sangre, como ocurre en la lactancia, estimula la actividad de las neuronas TIDA originando un mayor recambio en la síntesis de DA, lo que finalmente se traduce en una considerable inhibición sobre la liberación de PRL (31, 61).

En el modelo de la lactancia es en donde mejor se ha estudiado la regulación hipotalámica de la secreción de PRL porque permite el control experimental preciso del estímulo, en este caso la succión, cosa que no resulta fácil en el estudio de la regulación que ocurre en el proestro del ciclo estral de la rata. Gracias a las convenientes condiciones experimentales de dicho modelo es que se han podido estudiar mecanismos de regulación a nivel celular como es la señalización mediada por segundos mensajeros, por el comportamiento de canales iónicos como los de calcio, etc. (69).

d) Envejecimiento.

A diferencia de lo que ocurre en la lactancia, en el envejecimiento los estrógenos parecen tener una participación importante en las alteraciones de tipo proliferativo y secretor que involucran a los lactotrofos.

Aunque la aparición del cuadro hiperprolactinéxico y el desarrollo de prolactinomas son patologías que resaltan por el impacto que tienen en la población en edad reproductiva, se ha observado que de alguna manera su incidencia se incrementa con el envejecimiento (14, 15). Esto es especialmente evidente en la rata (11, 50, 51, 72).

A pesar de que en algunos de los casos (5, 32, 65) se consideran estos fenómenos como resultado de posibles defectos en el control inhibitorio que ejerce el hipotálamo a través de la DA sobre los lactotrofos, no debemos dejar de pensar en la intervención de múltiples factores actuando a distintos niveles y quizás en diferentes períodos de tiempo en la vida del organismo.

Hay que mencionar que, aún cuando a la vista resulta paradójico, el hecho de que estas alteraciones se hacen más frecuentes en una etapa de la vida en la que los niveles endógenos de estrógenos se encuentran disminuídos, como es el caso de la vejez (12), no por ello se puede excluir la participación de dichas hormonas en la génesis del fenómeno, ya que se piensa que, como resultado de una larga exposición a estas hormonas durante la vida reproductiva del animal, se puede haber creado un estado de mayor sensibilidad a estas hormonas en los lactotrofos y que, incluso, pudieron haber tenido lugar efectos acumulativos sobre las células de la AH, entre ellos de tipo mitogénico, que se expresarían posteriormente en la vida del animal (38). Se ha observado que la ovariectomía a temprana edad previene la hiperprolactinemia que se encuentra en ratas de edad avanzada, mostrando de nuevo la participación de los esteroides ováricos en la expresión de esta patología (12).

e) Ratones Hipogonádicos.

Un caso interesante que muestra la influencia de los estrógenos sobre el funcionamiento de los lactotrofos la presentan los ratones hipogonádicos. Como resultado de una mutación, estos ratones carecen del gen de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por lo que tienen una marcada deficiencia en la síntesis de gonadotropinas (FSH y LH) lo que no permite el desarrollo de las gónadas y, por lo tanto, de la secreción de estrógenos. Como resultado, las hembras presentan bajos niveles de PRL en adenohipófisis y en sangre, que pueden elevarse con la administración exógena de estrógenos (73).

6) Tumorción Adenohipofisiaria en Ratas : Participación de Estrógenos.

a) Características del Tumor.

Se han hecho propuestas para considerar a los tumores adenohipofisarios espontáneos de las ratas viejas como un modelo de estudio del tumor adenohipofisario en el hombre por las similitudes histológicas y funcionales que presentan (11). Sin embargo, el estudio de esta condición difícilmente hubiera podido revelar alguna luz sobre la etiología de los prolactinomas en ambas especies ya, que nos enfrentamos a un fenómeno espontáneo en el que es difícil controlar el estímulo tumorigénico y en el que se desconoce cuáles animales presentan la patología, por lo que ni siquiera se podría monitorear el crecimiento tumoral y, si este fuera el caso, consumiría mucho tiempo.

En cambio, experimentalmente está comprobado que la administración de estrógenos en ratas, origina el desarrollo de prolactinomas que muestran similitudes morfológicas y funcionales con los prolactinomas humanos (1, 16), además de acompañarse, en algunos de los casos, del desarrollo de tumores mamaros y/o de trastornos en la lactancia (21, 64, 74). Este consigue ser un modelo útil de estudio porque el fenómeno es altamente repetitivo, de rápida evolución y se puede manipular a conveniencia, controlando múltiples variables.

Así pues, numerosos estudios coinciden en que el tratamiento agudo o crónico con estrógenos en ratas hembra y macho genera un incremento en

el metabolismo general de la AH, lo que se refleja en la inducción de prolactinomas, en el incremento del tamaño de la adenohipófisis, en el aumento del número y tamaño de los lactotropos, en una acelerada actividad de la transcripción y síntesis de PRL y en una hipersecreción de esta hormona (1, 15-17, 20-22, 33, 54, 55, 75).

En contraste, la suspensión del estímulo estrogénico en estas ratas provoca la involución tumoral de la glándula y la reversión de todos los parámetros anteriormente señalados (22, 55, 75).

En la mayoría de los casos, estos tumores se muestran hemorrágicos y cuando son muy grandes llegan a ser invasivos (15, 44).

Con la ayuda del microscopio electrónico y con técnicas de inmunohistoquímica se ha resuelto que estos tumores, antes catalogados como cromóforos, en realidad en su mayoría constan de células productoras de PRL (16). La mayoría de las células presentan núcleo grande y nucleolo bien definido, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi muy hipertrofiados, ocupando la mayor parte del volumen celular, y un número moderado a reducido de gránulos secretorios de forma irregular pero de gran tamaño; indicios de una acelerada actividad secretoria (16, 20, 53). Se presentan cambios de marcada hipertrofia e hiperplasia celular, con un contenido moderado de figuras mitóticas (16, 20, 33, 53). Como se observa, estas características son semejantes a las halladas en prolactinomas espontáneos en el hombre y en la rata (11, 19, 44).

Hasta la fecha, en lo que respecta a la interpretación sobre el tipo de crecimiento observado en la AH de ratas tratadas con estrógenos, existe poco consenso. La gran mayoría de los autores (15-17, 19, 21, 22, 53-55, 58) lo nombran un crecimiento de tipo tumoral, en algunos de los casos (17, 19), haciendo referencia al término arbitrario utilizado por Clifton y Meyer (1956), (53) y, en otros, como Wiklund y cols, (22), con base en el tamaño anormal de la glándula y a la apariencia alterada de las células. Otros autores (76) opinan que este crecimiento hiperplásico no debe ser llamado "tumor" porque cesa en cuanto se retira el estímulo que lo produjo.

Si bien lo último es cierto, hay que mencionar que este tipo de proliferación celular puede dar lugar a verdaderos tumores autónomos, ya que repetidos trasplantes de estos tumores primarios en ratas previamente estrogenizadas permite, finalmente, el crecimiento de dicho tejido en un ambiente hormonal normal e incluso en uno carente de

esteroides ováricos como es el caso de ratas gonadectomizadas. Aún así, algunos de estos tumores retienen su respuesta a los estrógenos (74).

A pesar de que en el crecimiento adenohipofisiario inducido en ratas por la aplicación de estrógenos aún no existe un criterio morfológico para diferenciar un crecimiento hiperplásico de uno tumoral, nosotros, con fines prácticos, nos referiremos a esta patología como un prolactinoma o tumor de los lactotrofos.

b) Sensibilidad Variable a los Estrógenos en Ratas de Diversas Cepas.

A pesar de que el desarrollo de prolactinomas en ratas tratadas con estrógenos es un fenómeno ampliamente conocido, es importante destacar que los mecanismos de disparo y/o control de la hiperplasia de los lactotrofos parecen ser una característica altamente variable dado que la sensibilidad a los estrógenos es dramáticamente distinta según la variedad de rata (1, 3, 15, 17, 22).

Aunque se han reportado datos variables según distintos laboratorios, en general, se ha encontrado que la adenohipofisis de ratas de las cepas Fischer 344 manifiesta una estimulación constante ante el efecto estrogénico, lo que al cabo del tiempo se traduce en el desarrollo de grandes prolactinomas (15, 16, 19, 20, 22, 23, 34, 55, 75). Si bien en muchos trabajos se considera que las ratas de la cepa Wistar presentan el mismo tipo de respuesta que la observada en las ratas Fischer 344 (20), hay que mencionar que lo encontrado en la literatura revela más variaciones al respecto de lo que se ha creído (34, 54, 77-79). Por el contrario, las ratas de la cepa Holtzman presentan una respuesta tardía a dicho estímulo, por lo que se requiere de una exposición prolongada a estas hormonas (más de 9 meses ó 40 semanas de tratamiento) antes de poder observar crecimiento alguno (22, 53). Lo mismo parece ocurrir en las ratas de la cepa ACI (17). Finalmente, las ratas de la cepa Sprague-Dawley presentan una respuesta transitoria a dicho estímulo por lo que el crecimiento de su adenohipofisis se ha reportado como pequeño (35, 46) o incluso nulo (17).

Cabe aclarar que las variaciones encontradas en la respuesta al estímulo estrogénico en diversos trabajos se pueden deber a variaciones en el período de exposición al estímulo estrogénico, a las dosis, forma de administración y tipo de agente estrogénico empleado, así como al tipo de

vehículo con el que se aplica el estrógeno, y también a las variaciones intrínsecas que existen entre las distintas cepas de rata.

En diversos estudios sobre las ratas de la cepa Fischer 344 se han observado incrementos en el tamaño de la AH que van de 5 a 10 veces en respuesta al estímulo estrogénico. Al parecer, lo que varía en ellos es el tiempo requerido para observarlos. Mostrando algunos ejemplos, Wiklund y cols, (22), reportan un crecimiento de la adenohipófisis de ratas hembra Fischer 344 entre 6 y 10 veces mayor que el de ratas control por el implante durante 8 semanas de cápsulas de silastic conteniendo dietilestilbestrol (DES). En otros estudios se reporta el mismo crecimiento a las 7 (16, 19) y a las 12 semanas (20) con el mismo tratamiento. En un estudio (75), se observa que el implante con 17 β -estradiol por 4 semanas induce un incremento de 5 veces en el peso de la AH de ratas tratadas (peso promedio por AH de 64.5 ± 4.7 mg) que en ratas ovariectomizadas (peso promedio por AH de 10.0 ± 0.3 mg).

En estudios realizados en las ratas de la cepa Wistar se han encontrado las variaciones más extremas en el crecimiento y funcionamiento de la glándula AH en respuesta a estrógenos. En lo que toca al tamaño de la AH, se han observado incrementos de 2 hasta 21 veces sobre los controles. Hay que mencionar que en algunos casos las comparaciones resultan un tanto difíciles por la complejidad de los protocolos experimentales.

Así se ha reportado que la implantación con cápsulas de silastic conteniendo tanto DES como 17 β -estradiol durante 3 semanas, fué capaz de aumentar en más del doble el peso de la AH de ratas hembra Wistar/Furth (34). Por otra parte, se ha observado un incremento en el tamaño de la AH de ratas Wistar de 5-6 veces por la implantación con cápsulas de silastic con DES durante 9 semanas (77). La aplicación de dipropionato de estradiol (inyecciones de 5 mg a intervalos de 4 semanas) induce incrementos progresivos en el peso de la AH de ratas hembra Wistar. En un estudio se reportó que en las primeras 4 semanas de tratamiento dicho parámetro no alcanza a ser el doble de los controles, mientras que a las 24 semanas resulta 4 veces mayor (79). En otro estudio (78) se observó en estas ratas un crecimiento adenohipofisiario 6 veces mayor a las 16 semanas con el mismo tratamiento pero a intervalos más cortos (2 semanas). Por otra parte, el tratamiento con valerato de estradiol (inyecciones de 2 mg cada 3

y 1/2 semanas durante 21 semanas) induce incrementos 21, 6 y 8 veces mayores que los controles al cabo de 7, 18 y 28 semanas de concluido el tratamiento (54).

En ratas hembra ACI se observó un crecimiento adenohipofisario de 1.5, 2 y 5 veces mayor que el de los controles por la implantación de comprimidos de 5 mg de DES por 4, 8 y 30 semanas respectivamente (17). Como se ve, se requiere de un tiempo muy prolongado (30 semanas) para obtener un crecimiento considerable de la AH (de 5 veces).

Aunque se ha reportado por algunos laboratorios (17) que el tratamiento con DES (implante de 5 mg hasta por 30 semanas) es incapaz de alterar el crecimiento de la AH en las ratas de la cepa Sprague-Dawley, en otros casos (23), se ha observado que el tratamiento con 17 β -estradiol (implante de silastic por 9 semanas) induce un aumento del tamaño de la AH dos veces mayor que el de los controles.

El hecho de que el tratamiento estrogénico provoca no sólo el incremento en el tamaño de la AH si no también el aumento en el tamaño y número de lactotopos, lo que además se refleja en la gran proporción de estas células en la glándula, se demuestra por diversos métodos que revelan no sólo el aumento en el número de los lactotopos si no también el aumento en el contenido de ácido desoxirribonucleico en la adenohipofísis.

En ratas Fischer 344, el porcentaje de lactotopos en la AH cambia del 30 % en condiciones normales al 70 % después de 8 semanas del tratamiento con DES, obteniéndose un incremento de 7 veces en el número de estas células al cabo de dicho período (20). De forma semejante, en ratas Wistar/Furth se observa un cambio en la proporción de los lactotopos en la AH del 30 al 60 % al cabo de 9 semanas con el mismo tratamiento (77).

Wiklund y cols, (22), observaron que el incremento en el peso adenohipofisario de las ratas Fischer 344 tratadas con DES fué acompañado por incrementos paralelos en el contenido de ADN en la AH. En otro estudio se observó que el contenido de ADN en la AH fué casi 5 veces mayor en estas ratas al cabo de 4 semanas de tratamiento con 17 β -estradiol que en los respectivos controles ovariectomizados (75). Igualmente, en ratas Wistar el tratamiento con valerato de estradiol (2 mg cada 3 1/2 semanas durante 21 semanas) provocó que el contenido de ADN en la AH se incrementara 9, 6 y 7 veces respecto a los controles al cabo de 7, 18 y 28 semanas de concluido el tratamiento.

Otros métodos utilizados para determinar el grado de replicación celular se basan en la determinación de la síntesis de ADN mediante la incorporación de nucleótidos marcados. Haciendo uso de éstos, se observó que la síntesis de ADN fué más del doble en ratas Fischer 344 implantadas con DES por 8 semanas que en los controles (16, 55).

En ratas de la cepa Sprague-Dawley se han realizado estudios a corto plazo en los que se evalúa el grado de replicación de los lactotropos en respuesta a estrógenos. En un reporte se ha encontrado que la actividad mitótica de los lactotropos se incrementa al doble durante los primeros 6 días posteriores a la inyección (12 mg) de dipropionato de dietilestilbestrol (DESD) en ratas macho (35). Curiosamente, en otro estudio (80), se observa que aunque este tratamiento (con 10 mg) no parece aumentar el contenido de ADN en la AH, sí logra elevar la síntesis de ADN hasta 4-5 veces durante los primeros 3 días posteriores a la aplicación estrogénica, al cabo de lo cual, sin embargo, se detecta una caída considerable en este parámetro.

Tanto las características funcionales como ultraestructurales de los prolactinomas evidencian un marcado aumento en la síntesis de proteínas, especialmente en la producción de PRL.

En prolactinomas inducidos en ratas Fischer 344 por la implantación con DES durante 7 semanas se ha observado que la síntesis proteica total (expresada como la incorporación de aminoácidos marcados en todas las proteínas) es 10 veces mayor que la de ratas intactas (19).

Una gran cantidad de trabajos muestran que el tratamiento estrogénico a corto o largo plazo eleva los niveles de PRL en la adenohipófisis y en la sangre como resultado del aumento en la síntesis y secreción de esta hormona (22, 40, 49, 50, 81).

La síntesis de PRL representa del 40 al 50 % de la síntesis proteica total en la AH de ratas Fischer 344 estimuladas por 8 semanas con DES, mientras que en ratas intactas es aproximadamente del 7 % (22). Al parecer, este efecto se consigue muy pronto puesto que la síntesis de PRL equivale a más del 50 % de la síntesis proteica total en adenohipófisis de ratas hembra o macho Sprague-Dawley analizadas tan solo 24 hrs. después de la aplicación de una dosis de 10 µg de 17 β-estradiol (81).

Una observación común es que el contenido de PRL en las adenohipófisis de ratas estrogenizadas se incrementa aunque no de forma

marcada (49) y dada la alta tasa de síntesis proteica, en particular de PRL, y los niveles tan elevados de esta hormona en sangre, es que se puede deducir que, además de estarse produciendo y liberando PRL en grandes cantidades, en realidad no existe un almacenamiento considerable de esta hormona en la glándula AH. Esto contrasta con el hecho de que en ratas Sprague-Dawley la administración de benzoato de estradiol (0.1 y 1 μ g por 6 días) eleva los niveles adenohipofisarios de PRL 2 y 3-4 veces respecto a los controles ovariectomizados (230 y 360 ng/mg vs. 130 ng/mg)(40).

Se incrementa el número de estudios en los que se reportan niveles elevados del mensajero de PRL (RNAm de PRL) en la AH de ratas por la aplicación de estrógenos (34, 82, 83).

Así, en un estudio, se observaron niveles elevados de RNAm de PRL en adenohipofisis de ratas hembra púberes y en machos tratados con 17 β -estradiol (inyecciones de 10 μ g por 3 a 6 días). En este trabajo, los niveles del mensajero alcanzados después del tratamiento se correlacionaron con el grado de síntesis de PRL en las glándulas. En otro estudio, se observaron niveles elevados de RNAm de PRL en tumores adenohipofisarios inducidos con DES en ratas hembra Wistar (34). Particularmente, el tratamiento con 17 β -estradiol (inyecciones de 10 μ g durante 14 días) en ratas ovariectomizadas elevó también los niveles de RNAm de PRL en AH en cuestión de minutos (83).

Los mecanismos por los que los estrógenos regulan la expresión del gen de PRL son poco conocidos y son motivo de múltiples estudios en la actualidad, pero de lo que aún nada se sabe y queda mucho por resolver es sobre su participación en los mecanismos que regulan la replicación celular.

En lo que toca a la secreción de PRL, se ha observado que en ratas de cepas altamente susceptibles al estímulo estrogénico, los niveles de PRL circulante aumentan progresivamente a medida que se desarrolla el tumor adenohipofisario (17, 22).

En ratas de la cepa Fischer 344 se han reportado niveles de PRL en sangre que van de 4 a 100 veces sobre valores normales dependiendo, principalmente, del tiempo de tratamiento.

Así, ratas de la cepa Fischer 344 llegan a presentar niveles de PRL en sangre de 4 a 80 veces más elevados que sus respectivos controles al cabo de 3 y 12 semanas de tratamiento con DES (288 \pm 66 vs. 75 \pm 9 ng/ml en el primer caso, y 8,884 \pm 66 vs. 107 \pm 9 ng/ml en el segundo, Lloyd), y de 65

a 100 veces más elevados al cabo de 7 semanas (16). La implantación con 17 β -estradiol por 4 semanas provocó, en estas mismas ratas, niveles de PRL en sangre hasta 65 veces más elevados que en los controles ovariectomizados (75).

En ratas de la cepa Wistar se ha encontrado que los niveles de PRL circulante no llegan a ser tan elevados como los de las ratas Fischer 344. Aún más, bajo prácticamente los mismos tratamientos, distintos laboratorios reportan niveles contrastantes en este parámetro en estas ratas.

Así, se ha reportado que la aplicación de dipropionato de estradiol (inyecciones de 5 mg a intervalos de 4 semanas) en ratas hembra Wistar indujo niveles de PRL circulante 5, 4.3 y 8.3 veces más elevados que los de ratas intactas al cabo de 4, 12 y 24 semanas de tratamiento (79). En cambio, el mismo tratamiento pero a intervalos menores (2 semanas) elevó los niveles de PRL en sangre 50 veces (3,013 ng/ml) sobre los de los controles (60 ng/ml) al cabo de 16 semanas de tratamiento (78). En otro estudio, la aplicación estrogénica (inyecciones de 2 mg de valerato de estradiol por intervalos de 3 semanas) provocó que la concentración de PRL en sangre aumentara 12 veces respecto a la de los controles después de 7 semanas de tratamiento (54).

En ratas de cepas con poca susceptibilidad al desarrollo de prolactinomas por el tratamiento con estrógenos, se observan discrepancias en relación al efecto que los estrógenos tienen sobre la secreción de PRL. En el caso de ratas de la cepa Sprague-Dawley, la mayoría de los estudios no se observan valores tan elevados de PRL en la circulación como los alcanzados por la cepa Fischer 344. En contraste, ésto no parece ser el caso para las ratas de la cepa Holtzman ya que presentan niveles tan elevados de PRL en sangre como los de las ratas de la cepa Fischer 344 en tan sólo 8 semanas de tratamiento estrogénico (22), requiriéndose, en cambio, más de 40 semanas (9 meses) bajo la acción de estas hormonas para desarrollar un crecimiento significativo de la AH (53).

Holtzman y cols, (17), reportan que el implante con DES en ratas hembra Sprague-Dawley por períodos de 1.4, 4, 8 y 30 semanas provocaron incrementos de PRL en sangre de 3.4, 9.7, 7 y 3.6 veces respecto a los controles. Como se observa el pico más alto se encuentra a las 4 semanas y luego comienza a declinar hasta valores encontrados al inicio del

tratamiento. En contraste, Weiner y cols.(23), observaron que los niveles de PRL en sangre en estas ratas se elevaron 6, 20 y 28 veces con la implantación de cápsulas de silastic conteniendo 17 β -estradiol durante 1 1/2, 4 y 9 semanas. En este caso los niveles de PRL parecen ir aumentando con el tiempo de tratamiento.

En todos los casos, es una observación muy común el que el peso corporal de ratas sometidas al tratamiento estrogénico aumenta en menor proporción que el de ratas intactas (20-22, 54).

Por otra parte existe el consenso general de que la aplicación de estrógenos en ratas provoca en la adenohipófisis una ligera reducción en el número de somatotropos y de otros tipos celulares (16, 20) pero que tiene poco o ningún efecto sobre la transcripción del gen de la hormona de crecimiento (82), sobre la síntesis de esta hormona (19, 22, 81) y sobre el contenido de esta en la glándula y en la circulación (54).

OBJETIVOS

Como se ha estado mencionando, hasta la fecha los factores y los mecanismos que pueden estar implicados en la inducción tumoral de la adenohipófisis de la rata por la aplicación de estrógenos se encuentran poco claros. Es por ésto, que para su estudio resulta sumamente útil contar con variedades de ratas ubicadas en los extremos opuestos de la gama de sensibilidad ya mencionada. Entre éstas, se encuentran las cepas Wistar y Sprague-Dawley, a las que tenemos acceso como líneas reproducidas endogámicamente por largos períodos de tiempo en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Con este fin, nos hemos propuesto determinar, en primera instancia, las diferencias en la susceptibilidad al estímulo estrogénico que pudieran existir entre las ratas hembra de las cepas Wistar y Sprague-Dawley a las que tenemos acceso; y, en segunda, pretendemos determinar el grado de participación y los mecanismos que tienen los estrógenos en la inducción tumoral de la adenohipófisis de estas ratas.

Para abordar lo anterior, pensamos que es necesario conocer el efecto que los estrógenos provocan en el crecimiento y funcionamiento de la adenohipófisis, es decir, los cambios que pueden producir en la replicación y comportamiento de los lactotropos, en la síntesis y en la secreción de PRL.

Esto no podría conseguirse sin la caracterización más amplia posible del fenómeno, la que pensamos lograr mediante el desarrollo de los siguientes puntos :

- 1) Inducir la formación del tumor adenohipofisiario en respuesta a estrógenos para determinar la velocidad de crecimiento de la glándula mediante la determinación de varios parámetros como son : el peso en fresco de la AH, el contenido total de ADN y proteínas en la misma, y la concentración de PRL en la circulación.

- 2) Establecer la evolución de dichos prolactinomas para conocer si su desarrollo persiste indefinidamente en presencia del estímulo estrogénico o si llega a presentar un valor de crecimiento máximo.

- 3) Describir el comportamiento de regresión tumoral de la adenohipófisis ante la suspensión abrupta del estímulo estrogénico en ratas cuya glándula ha alcanzado previamente un crecimiento importante por dicho tratamiento.

PROCEDIMIENTOS

1) Animales.

En nuestro estudio empleamos ratas hembra reproducidas endogámicamente por largos períodos de tiempo (más de 10 años) en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y derivadas tempranamente de Wistar y Sprague-Dawley. Convenimos trabajar con ratas sexualmente maduras dado que la génesis del prolactinoma se manifiesta como una patología de la reproducción. Si bien la rata hembra Wistar comienza su ciclo estral fértil aproximadamente a los 42 días de edad, con un peso corporal promedio equivalente a los 88 g (84), se pretende que también estén por completar su madurez sexual, la cual se estima entre los 85 a 90 días de edad ó 200 g de peso corporal (85). Por otra parte, es conveniente el evitar trabajar con ratas viejas porque presentan una alta tasa de prolactinomas "espontáneos" (9, 11, 72).

Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de humedad y temperatura, bajo un ciclo de 12 hrs. luz y 12 hrs. oscuridad, alimentándose ad libitum con alimento preparado para roedores y agua.

2) Diseño Experimental.

En forma preliminar y en un grupo de 50 ratas Wistar intactas determinamos las curvas de peso corporal y adenohipofisiario con el fin de identificar la fase más apropiada para llevar a cabo el resto del estudio.

Este comprendió tres grupos experimentales y en cada uno de ellos se trabajó en forma paralela con ratas Wistar y Sprague-Dawley :

a) Grupo Testigo.

Este estuvo integrado por grupos de cinco ratas que permanecieron ovariectomizadas por 1, 2, 4 ó 9 semanas.

b) Inducción Tumoral de la Adenohipófisis.

En este grupo se aplicaron estrógenos por períodos variables. Las ratas fueron ovariectomizadas e implantadas subcutáneamente en la región dorsal con cápsulas de silastic conteniendo aproximadamente 14 mg de 17 β -estradiol cristalino. Igualmente, grupos de cinco ratas fueron sacrificados al cabo de 1, 2, 4 ó 9 semanas de tratamiento.

c) Regresión Tumoral de la Adenohipófisis.

En este grupo se estudió la regresión tumoral de la adenohipófisis de ratas tratadas con estrógenos. Una vez determinado en el grupo anterior el tiempo en el que la adenohipófisis de ratas estrogenizadas alcanzó su crecimiento máximo, y que observamos fué a las 4 semanas para las ratas de la cepa Wistar, procedimos a tratar con estradiol a grupos de cinco ratas por dicho período y subsecuentemente suspendimos abruptamente el tratamiento estrogénico retirando el implante de estos animales por 1/2, 1, 2 ó 4 semanas, al cabo de lo cual los animales fueron sacrificados.

3) Manipulaciones.

a) Ovariectomía.

El objetivo de realizar la ovariectomía es conseguir la eliminación de la fuente endógena de estrógenos en los animales, lo que permite asegurar que los resultados obtenidos por el tratamiento estrogénico se deban exclusivamente a dicho manejo. Para dar validez a la curva de regresión tumoral de la adenohipófisis de ratas tratadas con estrógenos debemos asegurar que no quede presente ningún estímulo estrogénico en el animal una vez que se ha retirado el implante.

Para realizar la ovariectomía se anestesian a las ratas con éter y se afeitan dorsalmente cubriendo una extensión de aproximadamente 8 cm de largo y 4 cm de ancho. Se practica una incisión dorsal en la piel desinfectada con alcohol a 1.5 cm por debajo de la última costilla. Se procede a separar, por disección roma, la piel de la capa muscular en dirección diagonal anterolateral y a continuación se realizan dos incisiones ventrolaterales, de medio centímetro cada una, sobre la pared muscular para extirpar cada uno de los ovarios. Al final se sutura la incisión sobre piel.

Este resulta un método de gonadectomía muy conveniente porque es muy rápido y fácil de ejecutar permitiendo, además, un alto índice de supervivencia en los animales (en nuestras manos, aproximadamente de cada 100 ratas una muere por esta intervención).

b) Implantación de Cápsulas con 17 β -estradiol.

Se ha escogido al 17 β -estradiol como el agente estrogénico porque se trata de una hormona que se produce naturalmente en los animales. Aunque existen muchos trabajos (16, 17, 19-22, 53) en los que se utiliza a una hormona estrogénica de tipo sintético (DES) para inducir la formación del prolactinoma en la rata, también se ha reportado que el mismo efecto lo tiene el 17 β -estradiol (22, 23, 54, 75, 78, 79).

Consideramos que la mejor forma de aplicar el tratamiento estrogénico es mediante la implantación subcutánea de cápsulas de silastic ya que dicho material contiene un poro de tamaño adecuado para asegurar la liberación constante y prolongada del estrógeno por el tiempo en el que el implante permanece en el animal. Por otro lado el manejo es sencillo y no resulta traumatizante para el animal. Se ha reportado que un implante de este tipo, conteniendo 2.5 mg de 17 β -estradiol o de DES, es más que suficiente para inducir y mantener la formación del tumor adenohipofisario en ratas Fischer 344 por un período de 8 semanas; así, se calcula que la tasa de liberación de la hormona es de 45 μ g por día. Hay que mencionar que el efecto observado en la glándula no se alteró con dosis mayores a las señaladas por el mismo período (22). Pensamos que en nuestro caso, la implantación con una cápsula de silastic conteniendo aproximadamente 14 mg (13.8 \pm 0.1 mg) de 17 β -estradiol es más que suficiente para observar efectos durante el período de estudio.

Los implantes se preparan cortando tubo de silastic (Dow Corning, Midland, MI, diámetro interno 0.076 y diámetro externo 0.125 pulgadas) de 2 cm de largo, tapando un extremo con 1/2 centímetro de madera, agregando 1 cm de 17 β -estradiol cristalino (Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO.) y bloqueando también el otro extremo con 1/2 centímetro de madera. Posteriormente se cubre cada punta con adhesivo médico silastic y se deja secar todo un día.

Los implantes se colocan subcutáneamente en la región anterodorsal del animal recién ovariectomizado por la misma incisión realizada en la piel.

c) Desimplantación de Cápsulas con 17 β -estradiol.

Para poder suspender el tratamiento estrogénico hay que anestésicar con éter a la rata, afeitarla en la región anterodorsal (aproximadamente en un área de 3 cm cuadrados), realizar una pequeña incisión, menor de 1/2 cm, en la piel desinfectada con alcohol y extraer el implante sin romperlo. Al final se sutura la abertura sobre piel. Así pues, otra de las ventajas del manejo de implantes físicos es la facilidad con la que se puede retirar el estímulo introducido en el animal.

4) Determinaciones.

Para su sacrificio las ratas fueron anestesiadas con éter y decapitadas. De la cabeza se extrajo la adenohipófisis de cada animal, retirando previamente a la neurohipófisis, y se obtuvo el peso en fresco de la glándula, en una balanza analítica con precisión de décima de miligramo, como una estimación de su grado de crecimiento. Esta se conservó en mitades a -20 $^{\circ}$ C.

Posteriormente se realizó la homogenización de dicho tejido por medio de la sonicación de las muestras manteniendo una relación de 1 mg de tejido por cada 100 μ l de buffer de carbonatos de sodio 0.05 M 0.1 % de Tritón X 100.

En 10 μ l de este homogenado se cuantificó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (86) y posteriormente se calculó el contenido total de proteína por AH como un índice alternativo del crecimiento de la glándula adenohipofisaria. Reuniendo, por grupo experimental (5 ratas), alícuotas individuales de 100 μ l de este homogenado, se determinó también el contenido de ADN por glándula a través del método colorimétrico de Burton (87) como una estimación indirecta de la actividad replicativa de las células.

Por otra parte, se obtuvo el suero de cada animal, y se congeló a -20 $^{\circ}$ C hasta su empleo. Se determinaron los niveles de PRL en sangre, como un índice de la actividad secretora de los lactotropos, mediante la técnica del radioinmunoensayo (RIA) con reactivos provistos por el National Institute

of Arthritis, Metabolic and Digestive Diseases (NIADDK) a través del Rat Pituitary Hormone Distribution Program, usando el anticuerpo S-9 y la preparación RP-3 como estándar. Todas las muestras se analizaron por duplicado y se requirió desde 1 hasta 100 μ l de suero para llevar a cabo las determinaciones, según el grupo experimental. La dosis mínima detectable de PRL fué de 0.2 ng/tubo.

Finalmente, el peso corporal de cada animal fué monitoreado a lo largo del experimento.

5) Análisis Estadístico

Las comparaciones entre grupos se analizaron con el método de análisis de varianza (ANOVA) unifactorial, para una probabilidad mayor del 95%, acoplado a la prueba de Fisher para comparaciones múltiples. Esto se realizó con la ayuda de un paquete estadístico (StatView-SE, Abacus Concepts Inc.) diseñado para el sistema Macintosh (Macintosh Classic, Apple Computers Inc.). En algunos casos la comparación entre grupos se realizó con la prueba estadística " t student " .

RESULTADOS

1) Curvas de Crecimiento Corporal y Adenohipofisario en Ratras Hembra Wistar Intactas.

Al analizar el desarrollo que tiene el peso corporal y adenohipofisario durante las primeras 26 semanas de vida de ratas hembra Wistar intactas, se observa que la pendiente de crecimiento en estos dos parámetros es más acelerada en las primeras 12 semanas de edad, presentándose menores incrementos posteriores a este tiempo (figuras 1 y 2). Dado el interés de emplear ratas sexualmente maduras y la conveniencia de trabajar en los rangos de menor variación en estos parámetros y a que el manejo de un número tan grande de animales impide su abastecimiento temporal en un corto período de tiempo y dificulta, por ende, el manejo de ratas de la misma edad, es que en estudios posteriores se decidió emplear ratas mayores de 12 semanas de edad.

2) Efectos del 17 β -estradiol en Ratras Hembra de la Cepa Wistar.

a) Efecto Sobre el Crecimiento Adenohipofisario.

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos en 3 grupos de ratas Wistar como peso adenohipofisario en fresco a lo largo de hasta 9 semanas de tratamiento. En comparación con el grupo testigo, es decir, aquellas ratas ovariectomizadas el día cero de tratamiento, cuya curva de crecimiento adenohipofisario muestra una pendiente casi nula, el grupo de animales ovariectomizados y estrogenizados el día cero de tratamiento, mostró una pendiente acelerada de crecimiento adenohipofisario hasta alcanzar un plateau a partir de las 4 semanas de tratamiento. El valor promedio del peso adenohipofisario del grupo de animales estrogenizados fué significativamente mayor que el valor correspondiente del grupo testigo a partir de la semana de tratamiento y esta diferencia se mantuvo hasta la novena semana, en la que finalizó el experimento.

Un segundo experimento, que también se ilustra en la figura 3, consistió en implantar con estrógenos a ratas ovariectomizadas en el día cero y retirar quirúrgicamente el implante a las 4 semanas de tratamiento, en el momento en el que el efecto de crecimiento adenohipofisario ha

alcanzado su valor máximo y que equivale aproximadamente al doble del peso registrado en el grupo testigo. En estas condiciones, el tamaño de la adenohipófisis mostró una pendiente muy acelerada de disminución a la 1/2, 1 y 2 semanas de desimplantación, en la que los valores alcanzaron aquellos del grupo testigo, y a partir de este momento no se observó diferencia alguna con este último.

Una expresión que ha sido muy socorrida y que algunos autores consideran como más objetiva que el peso adenohipofisiario, como índice de crecimiento adenohipofisiario, es el contenido total de proteína por AH. En la figura 4 se muestra este parámetro en función de las semanas de tratamiento en los mismos 3 grupos previamente descritos. De hecho, las determinaciones de proteína se hicieron en los mismos animales y muestras de aquellos ilustrados en la figura 3 y, esencialmente, los cambios registrados en el contenido de proteína son idénticos a aquellos observados por la determinación del peso fresco de la AH. Si bien las variaciones en algún punto son ligeramente mayores que las observadas en la figura 3, el análisis estadístico muestra las mismas diferencias entre los grupos experimentales, ya sea por medio de la determinación de este parámetro (contenido total de proteína por AH) como por lo presentado en la figura 3 (peso en fresco de la AH).

Como índice adicional del crecimiento adenohipofisiario, determinamos el contenido de ADN por AH en el grupo de ratas estrogenizadas y en el testigo, ilustrados en la figura 3 y 4. Una limitación técnica, sin embargo, dada la sensibilidad del ensayo utilizado, consistió en el tamaño de la muestra mínima necesaria por determinación. Debido a ésto, tuvimos que juntar todo el material proveniente de las 5 ratas que constituían cada grupo experimental y realizar una determinación única. Estas determinaciones se ilustran en la figura 5, en que se muestra una tendencia relativamente estable en el contenido de ADN en las adenohipófisis de los animales ovariectomizados, en contraposición con un incremento sustancial de este parámetro en el grupo de animales estrogenizados. Nuevamente, el valor máximo se registró a las 4 semanas y su magnitud fué aproximadamente 50 % mayor de la observada en la correspondiente determinación del grupo testigo.

En la tabla I se ilustra, en forma comparativa, el grupo de ratas que mostró el mayor efecto de los estrógenos (a las 4 semanas) contra el grupo

de ratas intactas. Para esta comparación, se utilizaron las tres determinaciones a las que hemos hecho referencia y que son : el peso fresco de la AH expresado en mg, el contenido total de proteína adenohipofisiaria, en mg también, y el contenido de ADN adenohipofisiario en ug, así como el cociente entre el contenido de ADN y, por un lado, el peso fresco de la AH, y por otro, el contenido total de proteína. Como se puede observar, el peso fresco adenohipofisiario prácticamente se duplicó por el tratamiento estrogénico, siendo 124 % mayor en el grupo de ratas estrogenizadas que en el de intactas. El contenido total de proteína mostró un cambio semejante, siendo 90 % mayor en el grupo de ratas estrogenizadas que en el de intactas. En cambio, el contenido total de ADN por AH sólo aumentó 50 % por el efecto estrogénico, debido a ello, cuando la expresión se hace como el cociente del contenido de ADN en relación al peso fresco de la AH o al contenido total de proteína, éste disminuye por el tratamiento estrogénico.

b) Efecto Sobre los Niveles de PRL en Sangre.

Los niveles de PRL en sangre en estas ratas a lo largo de las 9 semanas de tratamiento se muestran en la figura 6. En comparación con el grupo testigo, cuyos niveles de PRL en sangre se mantienen constantes durante las 9 semanas de tratamiento en valores de 3 a 10 ng/ml, el tratamiento estrogénico provocó un marcado aumento en los niveles de PRL circulante, cuyo máximo fué registrado a las 4 semanas de tratamiento estrogénico, mostrando posteriormente, a las 9 semanas, una disminución sustancial que, sin embargo, se mantiene por arriba de los niveles encontrados en el grupo testigo.

Los niveles de PRL circulante de ratas estrogenizadas a las 4 semanas de tratamiento se elevan 58 veces por arriba de los niveles hallados en las ratas ovariectomizadas y 34 veces por encima de los niveles encontrados en las ratas intactas, mientras que a las 9 semanas sólo lo hacen 6 veces por encima del grupo ovariectomizado.

Por otro lado, la suspensión abrupta del estímulo estrogénico por la desimplantación al cabo de 4 semanas de tratamiento, produjo la disminución inmediata y dramática, total a las 2 semanas de desimplantación, de los niveles de PRL en sangre a valores control (figura 6).

Una amplificación de la respuesta del grupo ovariectomizado de la figura 6 se ilustra en la figura 7, y permite observar cómo el efecto de la ovariectomía provoca una disminución rápida pero transitoria de los niveles de PRL circulante hallados en ratas intactas, ya que a las 4 semanas, y sobretudo a las 9 semanas, los niveles retornan a valores comparables a los observados en animales intactos (6 - 64 ng/ml).

c) Efecto Sobre el Peso Corporal de los Animales.

Como se observa en la figura 8, este parámetro mostró una tendencia al aumento en los 3 grupos de animales estudiados, siendo el de las ratas estrogenizadas el que sufrió la menor pendiente de crecimiento, el de los animales exclusivamente ovariectomizados el que mostró la pendiente más pronunciada, y el de las ratas intactas mostró un valor intermedio. Aunque más notorio en las ratas ovariectomizadas, las curvas muestran que el crecimiento fué mayor durante las primeras 5 semanas que durante las últimas.

En la figura 9 se muestran las curvas de crecimiento corporal de los grupos de ratas desimplantados por distintos tiempos después de haber estado implantados por 4 semanas. El peso corporal, que sufrió pocas variaciones durante el período de estrogenización, e incluso después de media semana después de la desimplantación, mostró una tendencia de crecimiento acelerada en los animales desimplantados por 1 semana o más.

3) Efectos del 17 β -estradiol en Ratas Hembra de la Cepa Sprague-Dawley.

En las ratas de esta cepa no se llevaron a cabo todas las determinaciones realizadas en las ratas de la cepa Wistar, sin embargo, se efectuaron las más importantes como fueron las del peso en fresco de la AH, del contenido total de proteína por AH, de los niveles de PRL en sangre, y de los valores del peso corporal de los animales durante el período de tratamiento.

a) Efecto Sobre el Crecimiento Adenohipofisario.

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos en la determinación del peso en fresco de la AH de 3 grupos de ratas Sprague-Dawley durante 9 semanas de tratamiento. A diferencia del grupo testigo, de ratas crónicamente ovariectomizadas a partir del día cero, en el que la curva de crecimiento adenohipofisario muestra una pendiente con ligeras variaciones durante el período de tratamiento, en el grupo de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas el día cero de tratamiento, se observó una pendiente acelerada de crecimiento adenohipofisario hasta las 2 semanas de tratamiento, a partir de las cuales este crecimiento declinó a valores encontrados en el grupo testigo a partir de la cuarta semana de tratamiento, a pesar de encontrarse presente el estímulo estrogénico. Al igual que en las ratas de la cepa Wistar, el valor de crecimiento máximo de la glándula adenohipofisaria en respuesta a estrógenos, que se observó a las 2 semanas de tratamiento, fué aproximadamente el doble del encontrado tanto en el correspondiente grupo testigo como en el grupo de ratas intactas.

En otro grupo experimental, ilustrado también en la figura 10, se implantó con estrógenos a ratas ovariectomizadas en el día cero y al cabo de 4 semanas de tratamiento se procedió a suspender abruptamente el estímulo estrogénico retirando el implante de estos animales. De esta manera se observó que el peso de la AH disminuyó en forma inmediata y marcada, en sólo media semana después de la desimplantación, a valores incluso significativamente menores de los presentados por el grupo testigo, de ratas ovariectomizadas. Sin embargo, después de esta sobresaliente caída, el peso adenohipofisario de animales desimplantados mostró un incremento a valores comparables a los del grupo testigo al cabo de 2 semanas de desimplantación.

Como se ha mencionado, una medición socorrida como alternativa al peso de la AH se considera como un indicador del crecimiento adenohipofisario, lo constituye la determinación del contenido total de proteína en la glándula. En la figura 11 se expresa este parámetro en función de las semanas de tratamiento en las mismas ratas de los 3 grupos descritos en la figura anterior. Prácticamente, las variaciones registradas en

el contenido de proteína por AH en estos 3 grupos son idénticas a las observadas por la determinación del peso fresco de la glándula.

b) Efecto Sobre los Niveles de PRL en Sangre.

Los niveles de PRL en sangre en las ratas de esta cepa durante las 9 semanas de tratamiento se ilustran en la figura 12. En contraste con el grupo testigo, cuyos niveles de PRL circulante se mantuvieron constantemente bajos después de la ovariectomización y durante las 9 semanas de tratamiento en valores entre los 2 y 22 ng/ml, el efecto de la implantación estrogénica produjo un marcado aumento en los niveles de PRL circulante a las 2 semanas de tratamiento, retornando a valores cercanos a los de ratas intactas pero aún significativamente por arriba de los presentados por el grupo testigo, a partir de las 4 semanas de tratamiento.

En las ratas Sprague-Dawley los niveles de PRL en sangre observados a las 2 semanas de tratamiento en respuesta a estrógenos se incrementaron 40 veces sobre los hallados en las ratas del grupo testigo y 3 veces sobre los de ratas intactas.

Por otra parte, al igual que en las ratas de la cepa Wistar, la suspensión abrupta del estímulo estrogénico por la desimplantación al cabo de 4 semanas de tratamiento, produjo la disminución inmediata y total, en media semana, de los niveles de PRL en sangre a valores presentados por el grupo testigo de ratas ovariectomizadas (figura 12).

c) Efecto Sobre el Peso Corporal de los Animales.

De la misma forma que en las ratas de la cepa Wistar, en la figura 13 se observa que este parámetro aumentó tanto en el grupo de ratas SD estrogénizadas como en el testigo, de las ratas ovariectomizadas, durante las 9 semanas de tratamiento, sin embargo, es en este último grupo en donde se observaron los mayores incrementos.

Por otro lado, en la figura 14 se muestran las curvas de crecimiento corporal de los grupos de ratas desimplantados por distintos periodos de tiempo después de haber sido implantadas por 4 semanas. Se observa que incluso es más claro en las ratas de esta cepa como el peso corporal, que se

mantuvo prácticamente constante en los animales estrogenizados por 4 semanas, reinició su crecimiento en el momento de la desimplantación.

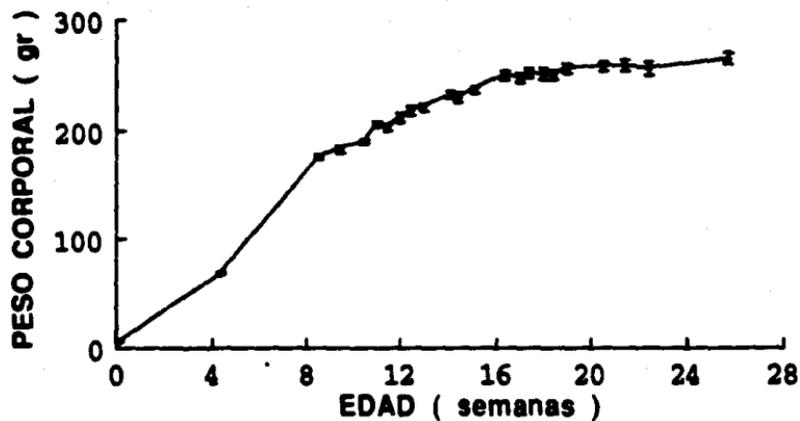


Figura 1. Curva de crecimiento del peso corporal (gr.) de ratas hembra Wistar intactas durante las primeras 26 semanas de edad. Cada punto representa el promedio \pm EE de 10 a 50 animales.

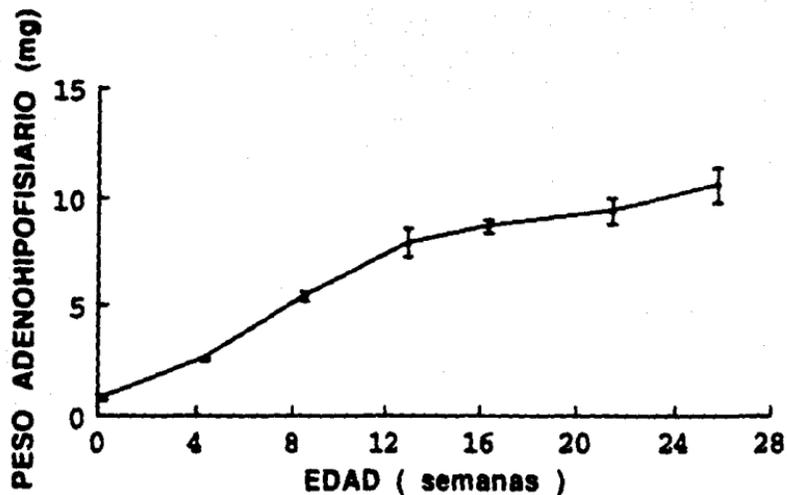


Figura 2. Curva de crecimiento del peso adenohipofisario (mg) de ratas hembra Wistar intactas durante las primeras 26 semanas de edad. Cada punto representa el promedio \pm EE de 5 animales.

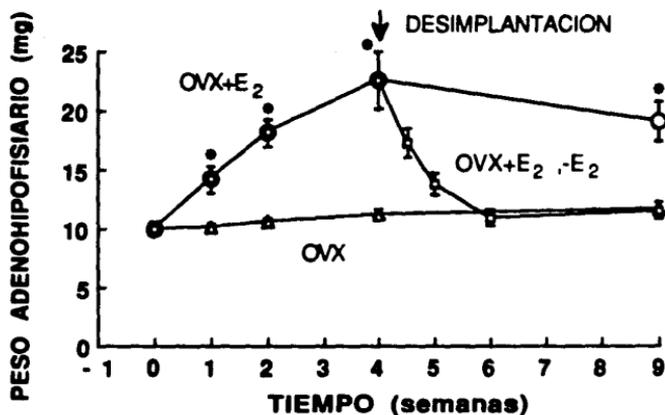


Figura 3. Efecto del tratamiento con 17 β -estradiol (implantes de silastic con 14 mg) y de la suspensión del mismo sobre el peso adenohipofisario de ratas hembra Wistar. Grupos de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas (OVX + E₂)(O), y los grupos control, de ratas ovariectomizadas (OVX)(Δ), fueron sacrificados al cabo de 1, 2, 4 ó 9 semanas de tratamiento. El grupo de ratas intactas se representa en el punto 0 del eje de las abscisas. Un cuarto grupo fue desimplantado por 1/2, 1, 2 ó 4 semanas, después de 4 semanas de estrogenización, (OVX + E₂ - E₂)(\square). Cada punto representa el promedio \pm EE de 5 animales. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas contra su respectivo control ($p < 0.05$).

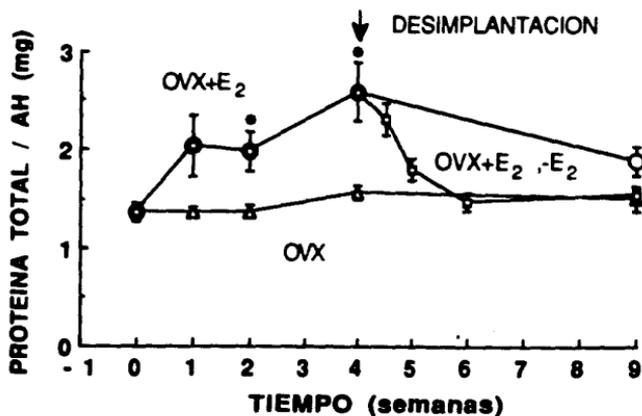


Figura 4. Efecto del tratamiento con 17 β -estradiol (implantes de silastic con 14 mg) y de la suspensión del mismo sobre el contenido total de proteína (mg) en la adenohipófisis (AH) de ratas hembra Wistar. Grupos de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas (OVX + E₂)(O), y los grupos control, de ratas ovariectomizadas (OVX)(Δ), fueron sacrificados al cabo de 1, 2, 4 ó 9 semanas de tratamiento. El grupo de ratas intactas se representa en el punto 0 del eje de las abscisas. Un cuarto grupo fue desimplantado por 1/2, 1, 2 ó 4 semanas, después de 4 semanas de estrogenización, (OVX + E₂ - E₂)(\square). Cada punto representa el promedio \pm EE de 5 animales. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas contra su respectivo control (p<0.05).

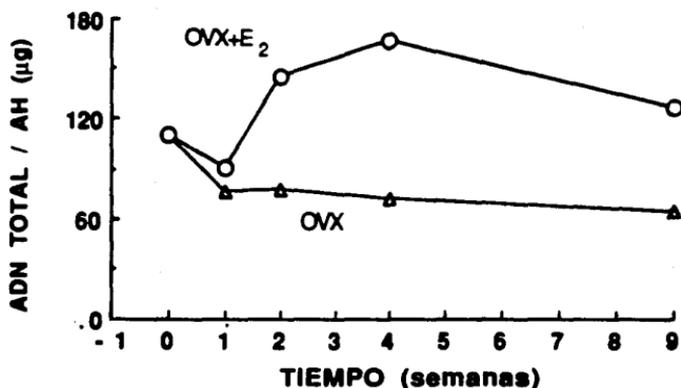


Figura 5. Efecto del tratamiento con 17 β -estradiol en el contenido total de ADN (μ g) en la adenohipófisis (AH) de ratas hembra Wistar ovariectomizadas y estrogenizadas (OVX + E₂) (O) hasta por 9 semanas, y en los grupos control de ratas ovariectomizadas (OVX), línea de triángulos (Δ). El grupo de ratas intactas está representado en el punto 0 del eje de las abscisas. Cada punto expresa determinaciones únicas del material acumulado proveniente de las 5 ratas que constituyen los grupos experimentales.

Tabla I. Efecto del tratamiento con 17 β -estradiol (implantes de silastic con 14 mg) por 4 semanas sobre el peso en fresco de la adenohipófisis, AH (mg) y sobre el contenido total de proteína (mg) y de ADN (μ g) por AH de ratas hembra Wistar.

Condición	Peso AH (mg)	Proteína/AH (mg)	ADN/AH (μ g)	ADN (μ g)/mg AH	ADN (μ g)/mg Prot.
Intactas	10.05 \pm 0.5	1.35 \pm 0.09	109.93	10.22	80.89
Estrogenizadas.	22.56 \pm 2.4*	2.58 \pm 0.30*	166.74	6.0	64.55
	(124 \pm 24%)	(91 \pm 21%)	(51.67%)		

Los valores del peso de la AH y del contenido total de proteína en la AH se expresan como el promedio \pm EE de 5 animales. Los valores del contenido de ADN representan la determinación única del material acumulado proveniente de los 5 animales de cada grupo.

Entre paréntesis se expresan los porcentajes de incremento respecto a los valores de ratas intactas.

Prot. = proteína.

Estadísticamente significativo contra su respectivo control *p<0.05

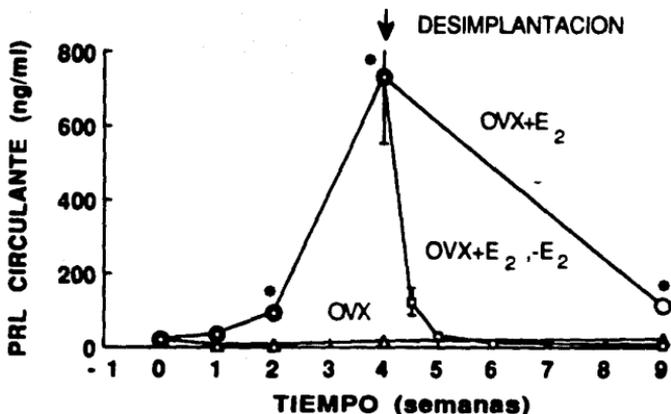


Figura 6. Efecto del tratamiento con 17 β -estradiol (implantes de silastic con 14 mg) y de la suspensión del mismo sobre los niveles de prolactina (PRL) circulante (ng/ml) de ratas hembra Wistar. Grupos de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas (OVX + E₂)(O), y los grupos control, de ratas ovariectomizadas (OVX)(Δ), fueron sacrificados al cabo de 1, 2, 4 ó 9 semanas de tratamiento. El grupo de ratas intactas se representa en el punto 0 del eje de las abscisas. Un cuarto grupo fue desimplantado por 1/2, 1, 2 ó 4 semanas, después de 4 semanas de estrogenización, (OVX + E₂ - E₂)(\square). Cada punto representa el promedio \pm EE de 5 animales. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas contra su respectivo control ($p < 0.05$).

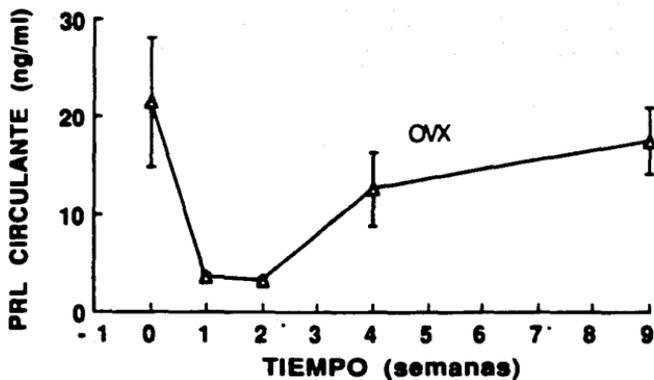


Figura 7. Efecto de la ovariectomía en los niveles de prolactina (PRL) circulante (ng/ml) en ratas hembra Wistar hasta por 9 semanas. Cada punto representa el promedio \pm EE de 5 animales. Mismos datos ampliificados de la figura 6.

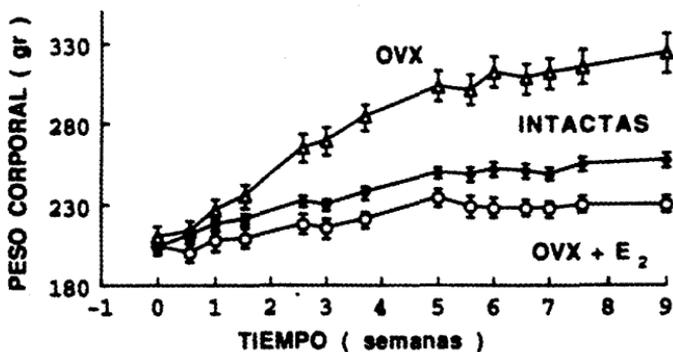


Figura 8. Curvas del peso corporal (gr) de ratas hembra Wistar ovariectomizadas y estrogenizadas (OVX + E₂)(O), del grupo control de ratas ovariectomizadas (OVX)(Δ), y del grupo de ratas intactas(o) a lo largo de 9 semanas. Cada punto representa el promedio ± EE de 5 animales. Las curvas son estadísticamente distintas a partir de la primera semana de tratamiento.

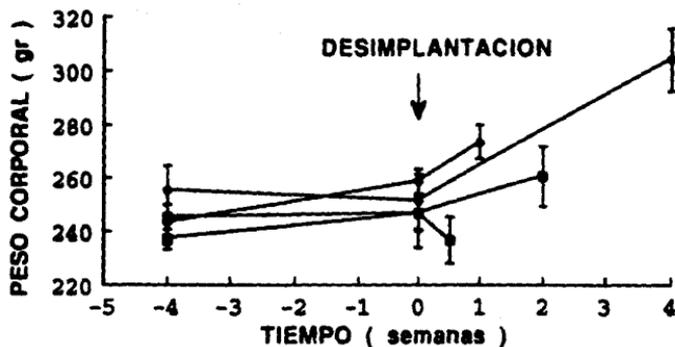


Figura 9. Efecto de la desimplantación sobre el peso corporal de ratas hembra Wistar estrogenizadas. Grupos de 5 animales fueron desimplantados por 1/2, 1, 2 y 4 semanas después de 4 semanas de tratamiento con 17 β -estradiol (implantes de silastic con 14 mg). Cada punto representa el promedio \pm EE.

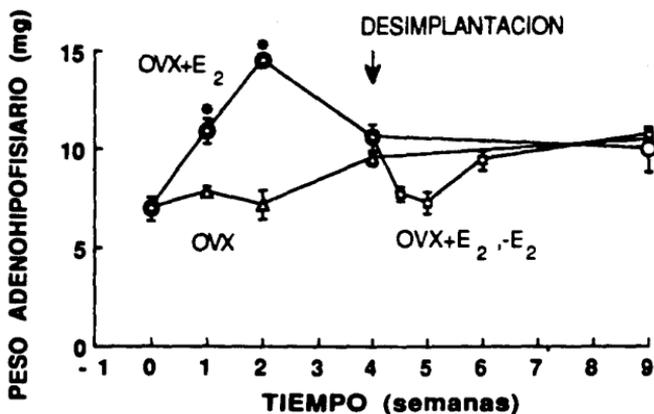


Figura 10. Efecto del tratamiento con 17 β -estradiol (implantes de silastic con 14 mg) y de la suspensión del mismo sobre el peso adenohipofisario de ratas hembra Sprague-Dawley. Grupos de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas (OVX + E₂)(●), y los grupos control, de ratas ovariectomizadas (OVX)(Δ), fueron sacrificados al cabo de 1, 2, 4 ó 9 semanas de tratamiento. El grupo de ratas intactas se representa en el punto 0 del eje de las abscisas. Un cuarto grupo fue desimplantado por 1/2, 1, 2 ó 4 semanas, después de 4 semanas de estrogenización, (OVX + E₂ - E₂)(□). Cada punto representa el promedio \pm EE de 5 animales. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas contra su respectivo control (p<0.05).

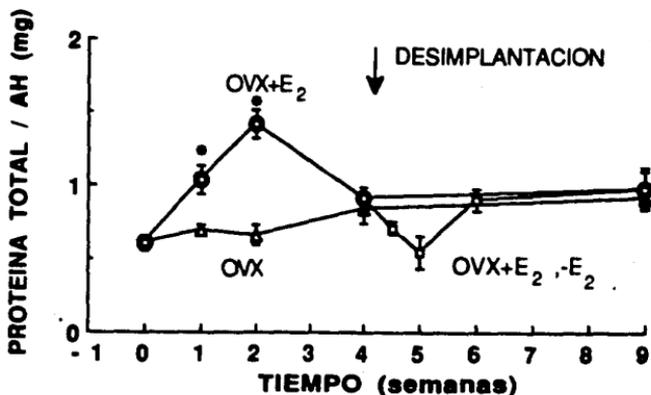


Figura 11. Efecto del tratamiento con 17β -estradiol (implantes de silastic con 14 mg) y de la suspensión del mismo sobre el contenido total de proteína (mg) en la adenohipófisis (AH) de ratas hembra Sprague-Dawley. Grupos de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas (OVX + E₂)(○), y los grupos control, de ratas ovariectomizadas (OVX)(Δ), fueron sacrificados al cabo de 1, 2, 4 ó 9 semanas de tratamiento. El grupo de ratas intactas se representa en el punto 0 del eje de las abscisas. Un cuarto grupo fue desimplantado por 1/2, 1, 2 ó 4 semanas, después de 4 semanas de estrogenización, (OVX + E₂ - E₂)(□). Cada punto representa el promedio ± EE de 5 animales. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas contra su respectivo control (p<0.05).

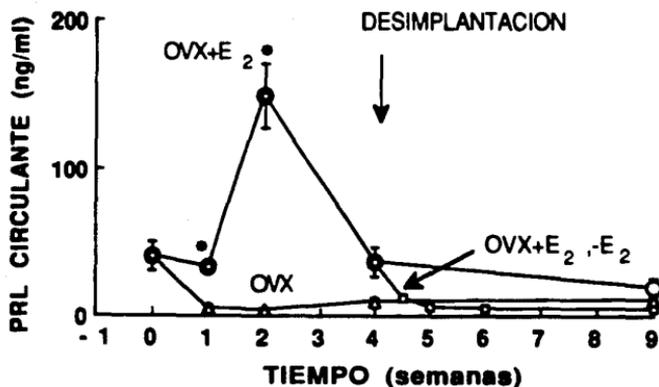


Figura 12. Efecto del tratamiento con 17 β -estradiol (implantes de silastic con 14 mg) y de la suspensión del mismo sobre los niveles de prolactina (PRL) circulante (ng/ml) de ratas hembra Sprague-Dawley. Grupos de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas (OVX + E₂)(O), y los grupos control, de ratas ovariectomizadas (OVX)(Δ), fueron sacrificados al cabo de 1, 2, 4 ó 9 semanas de tratamiento. El grupo de ratas intactas se representa en el punto 0 del eje de las abscisas. Un cuarto grupo fue desimplantado por 1/2, 1, 2 ó 4 semanas, después de 4 semanas de estrogenización, (OVX + E₂ - E₂)(\square). Cada punto representa el promedio \pm EE de 5 animales. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas contra su respectivo control (p < 0.05).

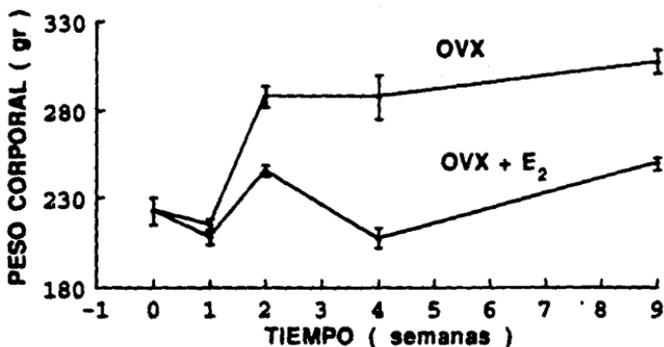


Figura 13. Curvas del peso corporal (gr) de ratas hembra Sprague-Dawley ovariectomizadas y estrogenizadas (OVX + E₂)(O) y del grupo control de ratas exclusivamente ovariectomizadas (OVX)(Δ) a lo largo de 9 semanas. El punto 0, en el eje de las abscisas, representa el peso inicial de las ratas de los distintos grupos previo a cualquier tratamiento (40 animales) y cada uno de los demás puntos representan el promedio ± EE de 5 animales.

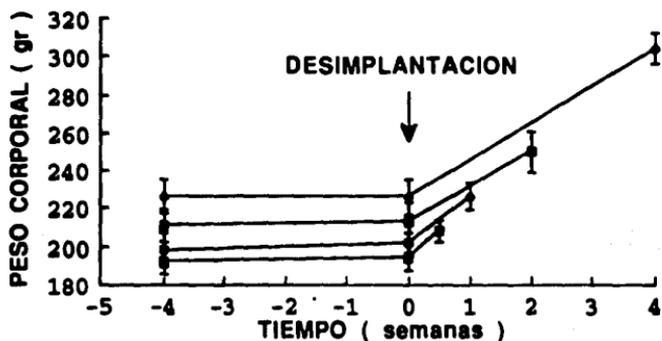


Figura 14. Efecto de la desimplantación sobre el peso corporal de ratas hembra Sprague-Dawley estrogenizadas. Grupos de 5 animales fueron desimplantados por 1/2, 1, 2 y 4 semanas después de 4 semanas de tratamiento con 17 β -estradiol (implantes de silastic con 14 mg). Cada punto representa el promedio \pm EE.

DISCUSION

Las curvas de crecimiento corporal y adenohipofisiario de las 26 primeras semanas de vida de ratas hembra Wistar intactas resultaron de suma utilidad para el diseño de todos los demás experimentos. Las observaciones sobre el crecimiento en estos dos parámetros, obtenidas por dicho registro, reforzaron lo atinada que fué la propuesta inicial de utilizar ratas hembra que estuvieran por completar su madurez sexual (estimada alrededor de las 12 semanas de edad, (84)), no sólo porque el problema de nuestro interés, el prolactinoma, se presenta como una patología de la edad reproductiva, si no también porque el período en que culmina la madurez sexual del animal se correlaciona con el tiempo, posterior a las 12 semanas de edad, en que el crecimiento corporal y adenohipofisiario presenta menores variaciones. Mientras que el peso corporal antes de las 12 semanas de edad aumentó en una relación de 19 g por semana, a partir de este período y hasta las 26 semanas de edad lo hizo tan sólo en 2.2 g por semana. De la misma forma, el peso adenohipofisiario antes de las 12 semanas de edad aumentó en una proporción de 0.6 mg por semana, y posteriormente lo hizo sólo a razón de 0.22 mg por semana. Debido a lo importante que resulta trabajar bajo condiciones experimentales en las que exista la menor variación posible para así poder garantizar que los resultados obtenidos se deban exclusivamente a la manipulación experimental, y ya que para un instante dado es prácticamente imposible contar y procesar un número tan grande de ratas de la misma edad, requerido para la realización de este trabajo (más de 150 ratas), es que para todos los experimentos se convino emplear ratas hembra con un rango de edad entre 12 y 16 semanas.

En lo que respecta a los efectos que los estrógenos tienen en la AH de las ratas hembra de la cepa Wistar encontramos datos interesantes.

Nosotros observamos que en comparación con el grupo testigo de ratas exclusivamente ovariectomizadas, el tratamiento estrogénico mediante la implantación con cápsulas de silastic conteniendo 17 β -estradiol hasta por un período de 9 semanas, produjo un incremento en el tamaño y funcionamiento de la AH de las ratas hembra Wistar del IIB, UNAM. Este crecimiento fué estimado mediante la determinación de varios parámetros como fueron el peso en fresco de la AH y el contenido total de

proteína y ADN en la glándula. Las curvas de crecimiento de cada uno de estos parámetros fueron muy similares entre sí durante el período experimental y muestran que el tratamiento estrogénico provocó el incremento inmediato y progresivo en el tamaño de la AH hasta alcanzar un valor de crecimiento máximo a las 4 semanas de tratamiento, con un incremento del doble respecto al grupo testigo y al de ratas intactas, observándose posteriormente, a las 9 semanas de estrogenización, que el valor en el peso adenohipofisiario no cambió significativamente pero en el contenido de proteína sí (figuras 3 y 4).

Este comportamiento fué muy similar al reportado por Lloyd y cols, (34), en ratas hembra Wistar/Furth (Harlan Co., Indianapolis, IN) con el mismo tratamiento. Observaron que la implantación con cápsulas de silastic conteniendo ya sea 17 β -estradiol o DES fue capaz de inducir un crecimiento de la AH de más del doble al cabo de 3 semanas de tratamiento. Los valores observados en el peso de la glándula adenohipofisiaria también fueron muy similares a los encontrados en el presente estudio : ellos reportan que en promedio la AH de las ratas intactas pesa 9.3 ± 0.8 mg y nosotros 11.21 ± 0.48 mg; en cambio, encuentran que en promedio la AH de ratas implantadas con 17 β -estradiol pesa 24.8 ± 2.6 mg, y nosotros encontramos que 22.56 ± 2.4 mg; según estos autores, el peso de la AH de ratas implantadas con DES por 3 semanas fué de 21.4 ± 0.6 mg. Estos datos refuerzan la observación previa de que tanto implantes de estradiol como de DES son igualmente eficientes en la inducción de este tipo de crecimiento (22). Desafortunadamente, el estudio citado sobre las ratas Wistar/Furth no sigue un curso temporal más allá de las 3 semanas por lo que no tenemos un punto de comparación con nuestros resultados posterior a este período.

Existe otro estudio, también por el grupo de R.V. Lloyd, en el que se reporta que en ratas hembra Wistar/Furth provenientes de otra fuente (Harlan Sprague-Dawley, Madison, WI) la implantación con cápsulas de silastic conteniendo DES produjo, a las 9 semanas de tratamiento, un incremento del tamaño de la AH de 5 - 6 veces (77). En comparación a lo observado en nuestro caso, en el que desde la cuarta semana de tratamiento estrogénico el crecimiento de la AH parece haber alcanzado un plateau, ésto probablemente sugiere que la exposición prolongada a este tipo de agente, el DES, es capaz de originar aumentos progresivos en el tamaño de la AH de estas ratas. Aunque existen datos en la literatura que

hacen pensar que las diferencias no se deben al tipo de estrógeno empleado, puesto que se ha reportado que en ratas hembra Wistar implantes de silastic con 17 β -estradiol o con DES por 3 semanas son igualmente eficientes en inducir un crecimiento adenohipofisario (34). Lo mismo se ha reportado en ratas hembra Fischer 344 por un tratamiento igual pero de 8 semanas de duración (22). Así, cabría pensar en que las diferencias observadas en la respuesta estrogénica se deben principalmente a variaciones entre los grupos de ratas de la misma cepa.

En otro estudio, Yamamoto y cols, (58), observaron que el implante de silastic conteniendo 40 mg de 17 β -estradiol hasta por 10 semanas indujo en ratas macho Wistar un incremento en el tamaño de la AH de más de 4 veces respecto a los controles. Como se observa en estas ratas macho existe un aumento mayor en el peso de la AH que lo observado en las ratas hembra Wistar estudiadas por nosotros estando sometidas a un tratamiento muy semejante. O bien estas diferencias podrían explicarse por los caracteres sexuales de los animales estudiados o por variaciones en la respuesta estrogénica entre distintos grupos de ratas originados de la misma cepa. No pensamos que se deban a la cantidad de estradiol contenida en los implantes (40 mg vs. 14 mg empleada por nosotros) ya que Wiklund y cols, (22), han mostrado que cápsulas de silastic conteniendo desde 2.5 hasta 50 mg de 17 β -estradiol o de DES provocan el mismo incremento en el tamaño de la AH de ratas hembra Fischer 344 implantadas por 8 semanas.

Por otro lado, Osamura y Watanabe, (79), estudiaron el efecto de inyecciones intramusculares de 5 mg de dipropionato de estradiol a intervalos de 4 semanas sobre ratas hembra Wistar y encontraron que, mientras a las 4 semanas el peso de la AH incrementó 0.7 veces, a las 24 semanas lo hizo 4 veces. En este sentido, el tratamiento estrogénico mediante el empleo de implantes como los de silastic, que aseguran una liberación prolongada y sostenida de la hormona por el tiempo en el que el implante permanece en el animal, parecería ser más eficaz en mostrar un efecto inmediato sobre el tejido adenohipofisario, ya que tanto Lloyd y cols, (34), como nosotros, observamos un crecimiento considerable en este parámetro al cabo de 3 y 4 semanas de estrogenización. En apoyo a esta conclusión, Niwa y cols, (78), reportan que, siguiendo el mismo tratamiento de Osamura pero con una frecuencia del doble, se obtiene un efecto más

intenso y rápido, ya que a las 16 semanas de tratamiento el peso de la AH se incrementó 6 veces.

Existe un reporte cuyos resultados son más discrepantes que los discutidos anteriormente, y en el que el esquema experimental también fue distinto. En éste, Nakagawa y cols, (54), empleando ratas hembra Wistar, sin reportar su proveniencia, y sometiénolas a un tratamiento de inyecciones sc. de 2 mg de valerato de estradiol a intervalos de 3 y 1/2 semanas durante 21 semanas y no haciendo determinaciones sino hasta 7, 18 y 28 semanas de suspendido el tratamiento, reportan que aún a esos tiempos el peso de la AH se encontraba 21, 6 y 8 veces más elevado que en los grupos testigo. También contrasta con lo observado por nosotros el que la AH tenga un peso tan elevado después de un período tan largo de concluído el tratamiento estrogénico, ya que en nuestro caso, la suspensión del estímulo estrogénico por la desimplantación al cabo de 4 semanas de tratamiento, provocó la disminución rápida y total tanto del peso de la AH como del contenido total de proteína a valores testigo después de 2 semanas de desimplantación (figura 3).

Wiklund y cols, (22), observaron en ratas hembra Fischer 344 el efecto de la suspensión de estrógenos. Así, encontraron que al retirar por 2 y 1/2 semanas el implante de silastic con DES después de 8 semanas de tratamiento, el peso adenohipofisario cayó 5 veces, siendo aún 3 veces mayor que el de ratas testigo.

Los dos parámetros discutidos hasta ahora, el peso en fresco de la AH y el contenido total de proteína en la glándula, constituyen un buen índice de la masa de la AH. Pero la estimación de esta masa no permite conocer si el efecto estrogénico observado en la AH de la rata es debido a una hipertrofia, es decir, a un incremento en el tamaño de las células que constituyen la glándula, o a una hiperplasia, es decir, a la replicación estimulada de algunas células de la AH. Por ello se estimó conveniente la determinación de ADN, porque es un índice aproximado del número de células. Para ésto se eligió el método de cuantificación colorimétrico propuesto por Burton (57) que resulta muy accesible pero de baja sensibilidad. Dado el tamaño de la muestra requerido para su determinación, el material adenohipofisario disponible resultó insuficiente para llevar a cabo determinaciones individuales y sus respectivas repeticiones. Por ésto, fué necesario juntar muestras individuales de tejido

adenohipofisario de las ratas de un grupo experimental (5 ratas) y realizar una determinación única del contenido total de ADN por grupo. Esto se llevó a cabo satisfactoriamente en los grupos de ratas estrogenizadas y en los testigo, de ratas exclusivamente ovariectomizadas, de la cepa Wistar.

En las ratas hembra Wistar estudiadas por nosotros se observó que, a diferencia del grupo testigo, en el que el contenido de ADN por AH se mantuvo constante a lo largo del tratamiento experimental, en el grupo de ratas estrogenizadas este parámetro se incrementó considerablemente alcanzando, nuevamente, su valor de crecimiento máximo a las 4 semanas de tratamiento y siendo su magnitud aproximadamente 50 % mayor que la observada en la correspondiente determinación del grupo testigo (figura 5).

El dato de que el aumento progresivo en el peso adenohipofisario se acompaña de incrementos paralelos en el contenido de ADN en la AH en respuesta a estrógenos ya ha sido reportado para las ratas de la cepa Fischer 344 (22, 75). Utilizando el mismo método de determinación de ADN que se empleó en el presente trabajo, Gottschall y cols, (75), observaron que tanto el peso adenohipofisario como el contenido de ADN se incrementaron 5 veces respecto a los controles ovariectomizados en ratas hembra Fischer 344 implantadas con cápsulas de silastic conteniendo 17 β -estradiol por 4 semanas. Como se observa, en estas ratas se presenta una mayor respuesta al estímulo estrogénico, como era de esperarse, y dado que el incremento en el peso adenohipofisario es proporcional al incremento en el contenido de ADN en la glándula, es sugerente de que en estas ratas el aumento en el tamaño de la AH se debe principalmente a una hiperplasia celular. Un dato que resulta de nuestro interés en dicho reporte se basa en que la relación de concentración de ADN por mg de tejido adenohipofisario reportada es muy semejante a la encontrada por nosotros en el presente trabajo (tabla I). Para las ratas del grupo testigo, es decir, ovariectomizadas, se reporta una concentración de ADN en la AH de $11.3 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ y nosotros la hallamos de $10.22 \mu\text{g}/\text{mg}$; mientras que para el grupo de ratas estrogenizadas la reportan de $8.1 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ y nosotros la encontramos de $6.0 \mu\text{g}/\text{mg}$.

Por otra parte, la estimación de diversos parámetros como fueron el peso en fresco de la AH, el contenido total de proteína y de ADN por AH, coincidió en que el estímulo estrogénico indujo una respuesta de crecimiento máxima de la glándula de ratas hembra Wistar a las 4 semanas de tratamiento. En la tabla I se ilustra la comparación de dichos parámetros

en este punto. Se observa que mientras el peso adenohipofisario aumentó al doble en respuesta a estrógenos, el contenido de ADN por AH se incrementó sólo en un 50 % respecto al grupo de ratas intactas. Esto es sugerente de que el incremento en el tamaño de la AH en estas ratas Wistar (estimado directamente mediante el peso en fresco de la glándula) en respuesta al estímulo estrogénico a las 4 semanas, se puede explicar, en parte, por el aumento en el número de células, ya que existe un aumento en el contenido de ADN en la AH, y en parte, por un aumento en el tamaño de las células puesto que el contenido de ADN por AH sólo aumenta cerca de la mitad de lo que lo hace el peso de la glándula. En resumidas cuentas, estos datos sugieren que el estímulo estrogénico produce tanto una hiperplasia como una hipertrofia celular en la AH de las ratas Wistar, lo cual coincide con observaciones morfológicas que se han descrito en la literatura en algunos de estos tumores en otras cepas de rata (16, 19).

Igualmente, existen otros estudios en los que se observa un mayor aumento en el peso de la AH que en el correspondiente contenido de ADN en la glándula. Así, Yamamoto y cols, (58), encontraron que, mientras el peso de la AH de ratas macho Wistar aumentó más de 4 veces por el implante de 40 mg de 17 β -estradiol durante 10 semanas, el contenido de ADN por AH lo hizo 3 veces. Nakagawa y cols, (54), en su estudio previamente discutido, en el que reportan que el tratamiento de ratas hembra Wistar con inyecciones de 2 mg de valerato de estradiol a intervalos de 3 y 1/2 semanas durante 21 semanas y en el que se procede a cuantificar al cabo de 7, 18 y 28 semanas de concluido el tratamiento, encuentran que a estos tiempos el contenido de ADN en la AH aumentó 42, 100 y 88 % respecto a los grupos testigo.

Con respecto al tipo celular involucrado en este efecto hiperplásico, existe gran cantidad de información en la literatura indicando que éste resulta principalmente a expensas de los lactotropos (16, 19, 20). Esto, como en nuestro caso, también tiene apoyo en que los niveles de PRL circulante resultan marcadamente elevados por el tratamiento estrogénico, siendo los lactotropos las células especializadas en su síntesis y secreción (5).

En lo que al efecto estrogénico observado en el funcionamiento de la AH en las ratas Wistar del IIB, UNAM se refiere, se encontró que, en contraste con lo observado en el grupo testigo, la implantación con 17 β -estradiol provocó un marcado aumento en los niveles de PRL circulante (58

veces por arriba de los niveles correspondientes del grupo testigo, de ratas ovariectomizadas, y 34 veces por arriba de los niveles hallados en ratas intactas) coincidente, nuevamente, con el del tamaño de la AH a las 4 semanas de tratamiento, mostrando posteriormente, a las 9 semanas, una disminución considerable aunque significativamente por arriba (6 veces) de los niveles encontrados en el grupo testigo (figura 6).

Esto claramente muestra el potente efecto que tiene el 17 β -estradiol en estas ratas estimulando la síntesis y la secreción de la PRL y no así el tamaño de la AH, ya que éste sólo aumentó el doble por el tratamiento estrogénico. Lo anterior se apoya también con datos experimentales no incluidos en esta tesis en los que se observa que la concentración de PRL en la AH de ratas estrogenizadas hasta por 9 semanas no parece aumentar mientras que los niveles de PRL en sangre se elevan marcadamente, de lo que se infiere una masiva secreción de la hormona.

En cuanto a lo reportado en la literatura al respecto, es difícil hacer comparaciones con nuestros datos puesto que se siguen protocolos experimentales muy distintos y se utilizan diferentes agentes estrogénicos y vías de administración en los animales, obteniéndose interpretaciones un tanto confusas con algunos de los resultados reportados. A modo general, observamos que los diversos tratamientos estrogénicos empleados producen incrementos en los niveles de PRL en sangre de ratas hembra Wistar desde 4 hasta 50 veces sobre los de los grupos testigo. De cualquier modo, la respuesta funcional de la glándula AH de las ratas Wistar que hemos estudiado parece ser rápida y una de las de mayor magnitud entre las reportadas en la literatura en las ratas de esta cepa con otros tipos de tratamiento estrogénico.

Tenemos, por ejemplo, que Yamamoto y cols, (58), observaron que el implante de 40 mg de 17 β -estradiol por 10 semanas en ratas macho Wistar indujo un aumento en los niveles de PRL en sangre de 24 veces. En estas ratas, el tratamiento estrogénico tuvo un mayor efecto en el funcionamiento de la AH que en su crecimiento, ya que su peso se elevó sólo 4 veces. Sin embargo, estas diferencias fueron todavía más marcadas en las ratas hembra Wistar estudiadas por nosotros, ya que mientras los niveles de PRL en sangre aumentaron 34 veces por el tratamiento estrogénico respecto a las ratas intactas, el peso de la AH lo hizo sólo 2 veces. Aún así es atrevido

hacer comparaciones puesto que sólo se tiene un punto de comparación en el tiempo.

Por otra parte, Osamura y Watanabe, 1986, observaron que el tratamiento estrogénico (inyecciones de 5 mg de dipropionato de estradiol a intervalos de 4 semanas) indujo en ratas hembra Wistar incrementos en los niveles de PRL en sangre de sólo 5, 4 y 8 sobre los hallados en ratas intactas al cabo de 4, 12 y 24 semanas de tratamiento. En comparación con lo observado en nuestras ratas, aquí se obtiene una respuesta funcional de la glándula muy disminuída no importando el tiempo de tratamiento. Por otra parte, el mismo tratamiento, pero aplicado a intervalos menores (2 semanas) sí parece provocar una respuesta marcada en la producción y liberación de PRL, ya que se observan incrementos de PRL circulante de 50 veces sobre los controles al cabo de 16 semanas de tratamiento (78).

Finalmente, Nakagawa y cols, (54), aplicando a ratas hembra Wistar inyecciones de 2 mg de valerato de estradiol cada 3 y 1/2 semanas durante 21 semanas observaron incrementos de PRL en sangre de 30, 9 y 19 veces respecto a los niveles de ratas intactas al cabo de 7, 18 y 28 semanas de concluída la aplicación de los estrógenos. A diferencia, el mismo tratamiento por 7 semanas indujo un aumento de dichos niveles de sólo 7 veces sobre los hallados en las ratas intactas (54).

En realidad, hubiera sido deseable que en todos los casos reportados en la literatura en los que se estudian los efectos estrogénicos en el crecimiento tumoral adenohipofisario en las ratas, se hubieran planeado cursos temporales más amplios, en los que igualmente se determinaran los diversos parámetros ya expuestos, con el fin de conocer la evolución del fenómeno y permitir comparaciones.

En lo que concierne al peso corporal de los animales, existen reportes que coinciden con lo observado en nuestro caso, en el que el peso corporal de ratas estrogenizadas aumenta en menor proporción que el de ratas intactas (figura 8). Sin embargo, nada se ha reportado sobre cómo el peso corporal de ratas ovariectomizadas aumenta en forma contrastante respecto a los dos grupos de ratas antes mencionados (figura 8). Observamos que las curvas de crecimiento corporal de estos 3 grupos se estabilizaron al cabo de 5 semanas de iniciado el tratamiento experimental, lo que probablemente sugiera que en el momento en que se intervino a los animales, el peso corporal todavía se encontraba en una fase activa de

crecimiento que, posiblemente, cesó en todos los animales al cabo de las 5 semanas en que se inició el tratamiento.

Tampoco se ha reportado en la literatura el efecto que tiene la suspensión del estímulo estrogénico sobre el crecimiento del peso corporal de estos animales. Nosotros encontramos que las pocas variaciones halladas en el peso corporal de animales estrogenizados se deben a la acción del estradiol, ya que cuando se retira el estímulo estrogénico el peso corporal de los animales reinicia inmediatamente su crecimiento (figura 9).

En lo que concierne a las ratas de la cepa Sprague-Dawley, hay que mencionar que la mayoría de los trabajos en los que se estudian los efectos de los estrógenos sobre la AH de ratas de esta cepa son a corto plazo y versan principalmente sobre aspectos de la secreción de PRL. Esto en gran parte es debido al conocimiento general de que las ratas de esta cepa presentan una respuesta moderada al estímulo estrogénico, aunque, a nuestro parecer, es precisamente este punto el que hace sumamente interesante su estudio. Es así que se cuenta con pocos trabajos en la literatura cuyo interés sea la descripción de los efectos que los estrógenos tienen en el crecimiento de la AH de estas ratas. Valga la redundancia de que todo ésto contrasta con la gran cantidad de trabajos que se han realizado al respecto en una de las cepas de rata más susceptibles al estímulo estrogénico como es la Fischer 344.

Entrando en materia, el diseño experimental realizado en el presente trabajo permitió conocer la evolución del crecimiento de la AH en respuesta a estrógenos en las ratas SD a las que hemos tenido acceso en el IIB, UNAM, a lo largo de 9 semanas de tratamiento. Observamos que mediante la determinación del peso fresco de la glándula y del contenido total de proteína en ella, este crecimiento aumentó inmediatamente, alcanzando su máximo a las 2 semanas de tratamiento y, posteriormente, a las 4 semanas de tratamiento declinó a valores hallados en el grupo testigo, de ratas ovariectomizadas, a pesar de encontrarse presente el estímulo estrogénico. Nuevamente, el tamaño máximo alcanzado por la AH de ratas SD estrogenizadas fué el doble del encontrado tanto en el grupo testigo como en el grupo de ratas intactas (figuras 10 y 11).

En forma sumo interesante, Weiner y cols, (23), observaron que la implantación con cápsulas de silastic conteniendo también 17 β -estradiol indujo igualmente un aumento del doble en el tamaño de la AH de ratas

hembra Sprague-Dawley (Simonsen Laboratories) pero sólo hasta después de 9 semanas, un período de tiempo más largo que lo observado en nuestras ratas SD. Ciertamente estos datos sugieren un comportamiento semejante entre los grupos de ratas de la cepa Sprague-Dawley estudiados por Weiner y cols, (23), y por nosotros, ya que ante el mismo tratamiento estrogénico las adenohipófisis de las ratas de ambos grupos presentan el mismo grado de crecimiento aunque difieren en la evolución temporal que sigue éste, ya que mientras el grupo de R. Weiner observa un crecimiento progresivo y lento de la glándula, que alcanza su máximo a las 9 semanas de tratamiento en que finalizó el experimento, nosotros observamos en las ratas de esta cepa un crecimiento inmediato y transitorio, que alcanzó su máximo a las 2 semanas de tratamiento y que posteriormente, a las 4 semanas, declinó a valores similares al testigo.

Estos datos contrastan con lo reportado por Holtzman y cols, (17), en donde el monitoreo a las 0.2, 1.5, 4, 8, 18 y 30 semanas de tratamiento estrogénico (implantes de 5 mg a base de comprimidos de DES) no produjo ningún cambio en el crecimiento de la AH de ratas hembra Sprague-Dawley (Sprague-Dawley Inc., Madison, Wis).

En cuanto a la curva del peso de la AH de ratas SD del grupo testigo, de animales crónicamente ovariectomizados, pensamos que las pequeñas variaciones observadas en la pendiente de crecimiento de la AH en este grupo (figura 10) quizás se debieron a que, a pesar de que estos animales estuvieron por completar su madurez sexual en el momento de iniciar el tratamiento, la glándula AH aún se encontraba en una fase activa de crecimiento. Esto nos lleva a sugerir la conveniencia de llevar a cabo en las ratas de esta cepa los estudios necesarios para desarrollar las curvas de crecimiento corporal y adenohipofisiario ya realizadas para las ratas de la cepa Wistar durante las primeras 24 semanas de edad. Esto permitirá identificar las fases de menor variación en estos 2 parámetros y corroborar si estas realmente coinciden con las observadas para las ratas de la cepa Wistar.

De igual forma, la implantación con 17 β -estradiol también tuvo un efecto considerable sobre los niveles de PRL en sangre en las ratas SD estudiadas por nosotros, aunque no fué tan notable como el encontrado en las ratas Wistar, ya que dichos niveles se incrementaron sustancialmente a las 2 semanas de tratamiento, alcanzando incrementos de 40 y 3 veces

aquellos observados en los correspondientes grupos testigo y de ratas intactas, y mostrando una caída a valores cercanos a los del grupo testigo a partir de las 4 semanas de tratamiento (figura 12). Este comportamiento coincide plenamente con el presentado en el crecimiento de la AH durante el período experimental en estas ratas (figuras 10 y 11).

Estos datos difieren con respecto a lo encontrado por otros autores ya que, por ejemplo, Weiner y cols, (23), observan que mientras el incremento en el tamaño de la AH de ratas hembra de esta cepa es lento durante las 9 semanas de tratamiento estrogénico, los niveles de PRL circulante aumentan progresiva y marcadamente durante el mismo período. Así, se tiene que estos niveles se incrementaron 6, 20 y 28 veces sobre los niveles observados en ratas intactas por la implantación de cápsulas de silastic conteniendo 17 β -estradiol por 1 y 1/2, 4 y 9 semanas.

En resumen, aunque en los grupos de ratas de la cepa Sprague-Dawley estudiados por Weiner y cols, (23), y por nosotros se presenta igualmente una respuesta a nivel del crecimiento y del funcionamiento de la AH por el tratamiento con estrógenos, existen diferencias entre éstos, ya que en nuestro caso se observa una respuesta transitoria a dicho estímulo, como lo indican todos los parámetros analizados (peso fresco de la AH, contenido total de proteína por AH y niveles circulantes de PRL), mientras que en el otro caso se presenta una respuesta sostenida que afecta marcadamente el funcionamiento de la AH, lo que se evidencia por los niveles elevados de PRL circulante inducidos por el tratamiento.

Por otra parte, aunque Holtzman y cols, (17), no observaron ningún cambio en el tamaño de la AH en respuesta a estrógenos en ratas hembra SD, sí observaron incrementos de PRL en sangre en estas mismas ratas, los cuales fueron de 3, 10, 7 y 3 sobre los hallados en ratas intactas por dicho tratamiento (implantes de 5 mg a base de comprimidos de DES) al cabo de 1.5, 4, 8 y 30 semanas de tratamiento. Como se observa, los valores de PRL circulante reportados en respuesta a estrógenos a la semana y media de tratamiento son semejantes a los encontrados en nuestras ratas a las 2 semanas de tratamiento estrogénico. Sin embargo, en la AH de ratas SD estudiadas por el grupo de S. Holtzman se presenta una respuesta funcional sostenida que aunque tiene el pico más alto a la cuarta semana de tratamiento, se mantiene hasta las 30 semanas de tratamiento significativamente por encima de los valores presentados por el grupo de

ratas intactas . Esto indica que si bien en estas ratas SD el tratamiento estrogénico no parece afectar el crecimiento de la glándula adenohipofisiaria en cambio si parece tener un efecto sobre el funcionamiento de ésta, efecto que es mayor respecto al de las ratas estudiadas por nosotros.

En un estudio, Chen y Meites, 1970, observaron que el corto tratamiento estrogénico, que consistió en inyecciones diarias de 0.1 hasta 500 μg de benzoato de estradiol durante 1 semana, fueron capaces de incrementar el peso de la AH, el contenido de PRL en la AH y los niveles de PRL en sangre en ratas hembra Sprague-Dawley previamente ovariectomizadas. Encontraron que a la dosis más efectiva (5 μg) el peso de la AH se incrementó en un 50 % y los niveles de PRL circulante 10 veces sobre los controles ovariectomizados. En lo que respecta a las ratas SD estudiadas por nosotros, observamos que al cabo de 1 semana de tratamiento estrogénico el peso adenohipofisiario aumentó 40 % y los niveles de PRL se incrementaron 6 veces respecto a los controles ovariectomizados. Esto muestra, que a la dosis más efectiva las ratas SD reportadas por Chen y Meites, 1970, presentan una respuesta comparable a la de ratas SD estudiadas por nosotros.

El que se observen niveles tan elevados de PRL en sangre, de 40 veces, en comparación con el grupo testigo, de ratas ovariectomizadas, a las 2 semanas de tratamiento estrogénico en las ratas SD que estudiamos (figura 12), se debe a que la ovariectomía, al igual que lo encontrado en las ratas de la cepa Wistar (figura 7), disminuye significativamente los niveles de PRL en sangre, lo cual ya se ha reportado también en la literatura (12, 32, 49, 50).

Hay que mencionar lo confiable que resultó la determinación de los niveles de PRL en sangre en las ratas de ambas cepas utilizadas en este trabajo, al menos en lo que respecta al análisis de las diferencias entre los grupos experimentales, ya que, por ejemplo, en las ratas SD, como resultado de la caída del pico de PRL en sangre al cabo de las 2 semanas de estrogenización, los niveles circulantes de esta hormona se encontraban disminuidos en el momento en que se procedió a suspender el estímulo estrogénico, que fué después de 4 semanas de estrogenización, e incluso así fué posible observar los cambios tan pequeños y escalonados en los que consistió la inmediata y total, a la semana de desimplantación, caída de este

parámetro a valores hallados en el grupo testigo de ratas exclusivamente ovariectomizadas (figura 12).

Al igual que lo reportado en la literatura (22, 54) y lo observado en las ratas de la cepa Wistar, el peso corporal de ratas hembra SD estrogenizadas aumentó en menor proporción que el del grupo testigo a lo largo del período de tratamiento (figura 13). Aún fué más claro en las ratas de esta cepa como el peso corporal, que se mantuvo prácticamente inalterado durante el período de estrogenización, reinició rápidamente su crecimiento en el momento de la desimplantación (figura 14).

Retomando todo lo expuesto en este trabajo, es claro que entre las ratas hembra de las cepas Wistar y Sprague-Dawley reproducidas endogámicamente por largos períodos de tiempo (más de 10 años) en el bioterio del IIB, UNAM, existen considerables diferencias a nivel adenohipofisario en cuanto a la susceptibilidad al estímulo estrogénico. En realidad, estas variaciones eran de esperarse según lo previamente reportado en la literatura sobre el efecto que tienen los estrógenos en las ratas de distintas cepas (15-17, 19-23, 33, 34, 54, 55, 58, 75, 77-79).

Una posible interpretación sobre el fenómeno estudiado sugiere que, en el caso de las ratas de la cepa Wistar existe una respuesta transitoria ante el efecto estrogénico que, al parecer, tiene dos componentes : uno inicial que consiste en una fase estimulatoria del crecimiento adenohipofisario, ya que la AH aumenta de tamaño de forma inmediata y progresiva, y el otro, posterior, consistente en una fase de estabilización del tamaño de la glándula a consecuencia del cese de dicho crecimiento, como lo demuestra el plateau alcanzado en el peso de la AH de estas ratas después de 4 semanas de estrogenización (figura 3). Cabe suponer, en esta última fase, la participación de factores aún desconocidos que fueran capaces de frenar no sólo los mecanismos de síntesis celular si no también los de proliferación de las células de la AH.

Por otro lado, resalta en estas ratas Wistar el marcado efecto estrogénico que se observa sobre el funcionamiento de la AH y no así sobre el crecimiento de la glándula, ya que mientras este último se incrementó al doble por el tratamiento, los niveles de PRL en sangre se elevaron, al mismo tiempo, varias decenas de veces (figura 6). Hay que mencionar que, de igual forma, la AH de estas ratas presenta una respuesta funcional de tipo transitorio por el efecto estrogénico ya que los niveles de PRL en sangre

muestran un pico a lo largo del tratamiento, cuyo máximo coincide con el momento en que la AH presenta su tamaño máximo. Esto sugiere que después de que la AH alcanza su mayor valor de crecimiento, se activan, junto a los mecanismos y factores que frenan el crecimiento adenohipofisiario, otros que tiene un efecto inhibitorio sobresaliente sobre la síntesis y secreción de PRL.

En contraste a lo anterior, es ampliamente conocido que los estrógenos ejercen un estímulo continuo sobre la AH de ratas Fischer 344 por lo que existe un aumento progresivo en el tamaño y funcionamiento de la glándula por el período en el que el estrógeno permanece en el animal, lo que al cabo de un tiempo largo se traduce en el desarrollo de grandes prolactinomas en estos animales (16, 20, 22).

En lo que respecta a las ratas de la cepa Sprague-Dawley, el que primero se observe un aumento y posteriormente una disminución en el tamaño de la AH en presencia del 17 β -estradiol, muestra que en estas ratas existe una respuesta transitoria al estímulo estrogénico que comprende, al menos, dos fases : una inmediata en la que existe un crecimiento acelerado de la AH, y otra posterior y opuesta, que consiste en la regresión de dicho crecimiento. Esto es sugerente de que en estas ratas se presentan mecanismos compensatorios al estímulo estrogénico, mecanismos de control de la proliferación y/o tamaño de los lactotopos más activos y ágiles que en los de la rata Wistar, en los que es posible suponer la participación de factores de tipo inhibitorio, lítico, que además de frenar el crecimiento adenohipofisiario son capaces de revertirlo. Esta regulación aparentemente se expresa a partir de la segunda semana de estrogenización ya que es cuando la glándula comienza a decrecer, a pesar de la presencia de los estrógenos, y se manifiesta después de la desimplantación, lo que podría explicar la caída de este crecimiento aún por debajo de los valores presentados por el grupo testigo, de ratas exclusivamente ovariectomizadas (figura 10). En ratas SD estrogenizadas se observa una gran correlación entre el crecimiento y el estado funcional de la AH, puesto que la curva que presenta los niveles de PRL en sangre durante el tratamiento estrogénico coincide con la observada en el peso y contenido total de proteína en la glándula (figuras 10, 11 y 12).

Para la mejor comprensión del fenómeno de crecimiento adenohipofisiario observado en respuesta a estrógenos en las ratas de la

cepa SD es que resultó de suma utilidad el estudio realizado sobre la regresión tumoral de la glándula. Este consistió en la desimplantación de los animales después de un período de estrogenización más prolongado (4 semanas) del requerido para observar el incremento y la caída de dicho crecimiento (2 semanas) en presencia de estrógenos. Así se observó que en el momento de la desestrogenización probablemente todavía se mantienen activos los posibles mecanismos inhibitorios, lo que se evidenció por la caída del peso de las adenohipófisis, incluso, por debajo de los valores presentados por las ratas exclusivamente ovariectomizadas. Probablemente, de haber procedido a desimplantar a los animales al cabo de 2 semanas de estrogenización, no se hubiera observado tal efecto puesto que es en este instante en que la AH alcanza su tamaño máximo y es de suponer que, en respuesta a éste, se induzca la activación de los posibles factores y mecanismos que provocan la mencionada caída de dicho crecimiento.

De forma parecida, el comportamiento transitorio que observamos en el crecimiento de la AH de las ratas W y SD ante la presencia sostenida del estrógeno también ha sido observado en el útero de la rata Holtzman (88) y en el ratón (72, 89). Se ha encontrado que ante dicho estímulo existe un aumento inmediato tanto de la actividad mitótica epitelial como de la síntesis de ADN y de proteínas totales en el útero que, sin embargo, posteriormente declina a valores, en algunos de los casos, incluso por debajo de los presentados por los grupos testigo (72, 88, 89).

Por otra parte, se presenta un fenómeno muy interesante en el que se sabe que la acción estrogénica tiene un efecto negativo sobre la proliferación de los lactotropos. Concretamente, los estrógenos provocan la inhibición de la multiplicación celular de los tumores adenohipofisarios autónomos transplantables, como los MtTF4 y MtT/W15, inducidos inicialmente en ratas por un largo tratamiento con DES. (34). Los mecanismos de acción de los estrógenos sobre la inhibición del crecimiento de la AH aún no se conocen aunque se especula de la participación de factores de tipo inhibitorio que estarían actuando específicamente sobre el tumor ya que no se afecta de igual forma a la AH in situ (34).

La pregunta que salta a la vista en todos los casos es por qué las células adenohipofisarias de las ratas SD y W y las uterinas una vez estimuladas por los estrógenos a aumentar de tamaño y/o a dividirse ya no lo hacen después de cierto tiempo. Incluso, la pregunta iría más allá,

cuestionando cómo es que ante la presencia constante de dicho estímulo no sólo se frena el crecimiento celular, si no que éste disminuye marcadamente. Preguntas, todas, sin contestación aún.

Aunque no es posible aseverar totalmente, cabe pensar que, en gran parte, los efectos estimulatorios observados en el crecimiento y funcionamiento de la AH de las ratas W y SD son resultado de la acción directa e indirecta del 17 β -estradiol sobre la glándula. Los diversos estudios realizados con células obtenidas de la dispersión del tejido adenohipofisario de la rata han permitido observar que el tratamiento estrogénico *in vitro* tiene efectos directos de tipo estimulatorio en los lactotopos sobre la síntesis y contenido de ADN y del mensajero de PRL, de la secreción de PRL, así como sobre el número de lactotopos (20, 36, 37). Sin embargo, dichos efectos contrastan con la respuesta tan marcada que se observa sobre los mismos parámetros cuando los estrógenos se administran a los animales. Esto sugiere que estas hormonas probablemente están también afectando a la AH de forma indirecta al actuar sobre otros sistemas y/o factores en el organismo.

Gran parte de los efectos directos que los estrógenos tiene sobre la AH de la rata se pueden explicar por el mecanismo general de acción que presentan y que comparten con todas las hormonas esteroides (90, 91). A groso modo, las hormonas esteroides penetran la membrana plasmática de las células por difusión simple debido a su carácter fuertemente hidrofóbico. En el citoplasma se encuentran receptores que se unen de forma covalente y específica a las hormonas esteroideas formando complejos que posteriormente sufren procesos conocidos como de "transformación" que los hacen muy afines por el núcleo celular, en donde se acumulan y se unen a la cromatina en determinados sitios induciendo, finalmente, la expresión de genes específicos (90, 91). No es sino hasta años recientes en que se ha venido estudiando el mecanismo de acción molecular de los estrógenos sobre la trascrición del gen de PRL y se ha encontrado que dichas hormonas inducen este proceso cuando el complejo transformado receptor-estrógeno se une al "elemento de respuesta a estrógenos" localizado "río arriba" a más de 1 kpb del sitio de inicio de la trascrición del gen de PRL (92). Respecto a los mecanismos por los que los estrógenos inducen la proliferación de los lactotopos en la AH aún no se conoce nada.

Como se ha mencionado, si bien la respuesta en el crecimiento y funcionamiento de la AH de la rata puede explicarse, en parte, por un efecto directo de los estrógenos, no puede excluirse la participación de factores de diverso tipo actuando también sobre el sistema y contribuyendo al comportamiento característico que se observa en la AH de las ratas de las cepas W y SD. En realidad sobre este punto existen propuestas especulativas pues no se tienen reportes que hagan alusión sobre factores concretos. En el caso de las ratas de la cepa Fischer 344, en las que se presenta una respuesta adenohipofisiaria sostenida al estímulo estrogénico, podría pensarse en la inducción de factores de tipo estimulatorio actuando en la AH. En cambio, en el caso de las ratas W y SD estudiadas por nosotros, en las que primero se observa una estimulación en el crecimiento de la AH y posteriormente un estabilización (en ratas W) y un decrecimiento (en ratas SD) del tamaño de la glándula, en presencia de estrógenos, cabría suponer la participación de factores tanto de tipo estimulatorio como de tipo inhibitorio en el fenómeno.

En lo que a posibles factores de tipo estimulatorio se refiere, Sirbasku, 1978, encontró que el tratamiento estrogénico en ratas hembra Sprague-Dawley (Texas Inbred Mice Company, Houston, TX) indujo en ciertos órganos (útero, hígado, riñón y cerebro) la producción de factores de crecimiento que estimularon específicamente la proliferación celular, entre otras, de líneas tumorales adenohipofisiarias de rata incapaces de responder a estrógenos in vitro, en contra de lo que ocurre in vivo. Como se observa, en este caso, los estrógenos generan factores de crecimiento específicos que pueden actuar como mediadores en el crecimiento tumoral adenohipofisiario provocado por dichas hormonas.

Es posible que la estabilización en el tamaño de la AH de las ratas Wistar y la regresión del tamaño de dicha glándula en las ratas Sprague-Dawley, después de una fase activa de crecimiento de la glándula, en presencia de estrógenos, puede ser consecuencia del crecimiento mismo de la AH o consecuencia de la acción del 17 β-estradiol. Nosotros pensamos que preferencialmente ocurre lo primero, es decir, que una vez que los estrógenos han inducido la proliferación celular de la AH, se generan y/o activan factores y mecanismos capaces de controlar dicha proliferación celular estimulada. Creemos que, en este caso, se excluiría la participación de los estrógenos, ya que en la AH de las ratas de ambas cepas las fases de

crecimiento activo y de estabilización y regresión de éste, según el caso, están ampliamente separadas en el tiempo, mientras que, en el caso contrario, la resultante de una acción simultánea tanto de tipo estimulatorio como de tipo inhibitorio de los estrógenos sobre la glándula mostraría una pendiente de crecimiento sin variaciones. En este sentido, Wiklund y cols, (55), han planteado que la disminución no tan inmediata en la síntesis de ADN de la AH de ratas estrogenizadas resultantes de la cruce entre ratas de cepas con una marcada y pobre respuesta a estrógenos, como las Fischer 344 y Holtzman, podría ocurrir sólo hasta que ciertos factores con actividad de tipo inhibitoria alcanzaran niveles intracelulares elevados. Contrariamente a esto, no podríamos descartar que los estrógenos tuvieran algún efecto indirecto en los fenómenos de inhibición observados, al inducir, por ejemplo, la producción de factores cuya acción se ejerciera sobre otros tejidos, capaces, a su vez, de modificar el estado funcional de la AH.

Un posible mecanismo por el que los estrógenos podrían estar involucrados indirectamente en la inhibición del crecimiento de la AH de las ratas W y SD, una vez que ésta ha alcanzado su crecimiento máximo por el tratamiento estrogénico, se explica mediante la generación de una forma molecular de la PRL que se ha encontrado tiene efectos biológicos particulares. Como parte de la línea de investigación de la Dra. Clapp se encuentra la caracterización y el estudio de los efectos de una forma molecular de 16 kd, resultante del procesamiento natural de la hormona PRL 23 kd, que se puede reconocer como una nueva hormona porque además de compartir algunos de los efectos de la PRL 23 kd presenta efectos biológicos propios. Entre éstos, el que resulta de nuestro interés es el efecto inhibitorio que se encuentra en la proliferación de vasos capilares (46). Por otra parte, Weiner y cols, (23), han observado que la formación de prolactinomas, tanto espontáneos como inducidos por estrógenos en ratas, se asocia a una vascularización adicional de la AH. En base a todo esto, podríamos proponer que el 17 β -estradiol, al actuar en la AH de las ratas, estaría provocando la síntesis y secreción de PRL 23 kd, la cual, una vez procesada, sería capaz de originar a la forma de 16 kd que podría actuar de manera inhibitoria sobre los capilares que irrigan al prolactinoma originando una disminución considerable en el aporte nutritivo de las células, lo que desencadenaría la necrosis celular y la consecuente estabilización o regresión tumoral de la glándula.

Sobre cómo podrían estar involucrados otros mecanismos y factores en el fenómeno transitorio que se observa en el crecimiento y funcionamiento de la AH en las ratas W y SD en respuesta a estrógenos, no se tiene conocimiento alguno. En la literatura se encuentran datos sobre algunos factores endógenos en los animales capaces de inhibir la proliferación celular, como es el caso de la alfa feto-proteína, del factor de necrosis tumoral y de productos proteicos de genes conocidos como "genes supresores".

Así pues, de forma interesante, en un estudio se ha hecho alusión sobre un posible factor de tipo inhibitorio que tiene alguna participación importante en un fenómeno parecido al de nuestro interés. Se ha observado que la presencia de un factor de origen fetal, la alfa fetoproteína, es capaz no sólo de retardar si no también de inhibir el crecimiento de líneas celulares tumorales adenohipofisarias secretoras de PRL dependientes de estrógenos, tanto en condiciones de cultivo como en condiciones *in vivo* en las que se hacen crecer estas líneas celulares (93, 94).

El sistema inmunológico, siendo el responsable de la defensa y protección del organismo, tiene una participación importante en el control de la proliferación celular en el cuerpo. Posiblemente, el mediador en este tipo de fenómeno del que más conocimiento se tiene es del factor de necrosis tumoral que, como su nombre lo indica, es capaz de causar la necrosis hemorrágica en ciertos órganos y tumores mediante una coagulación localizada (95). Si bien dicho factor es producido en grandes cantidades en organismos que sufren infecciones, en particular aquellas producidas por agentes que causan hiperplasia reticuloendotelial, también se ha observado su presencia en los organismos en respuesta a ciertas enfermedades neoplásicas (95). Otra posibilidad es que la inducción tumoral de la AH por estrógenos provocara la aparición de antígenos tumorales en las células afectadas, los que estimularían al sistema inmune ocasionando la regresión tumoral (96).

Recientemente, se ha descubierto la existencia de genes cuyos productos son capaces, en alguna forma, de frenar la proliferación de células normales en el organismo. A estos genes de les ha llamado " genes supresores " (97). Al parecer, los productos de dichos genes son necesarios para la detección y respuesta de factores que son producidos en las células y que regulan negativamente la replicación celular. Al inactivarse o

eliminarse dichos componentes, por ejemplo a causa de alguna delección cromosómica, las células pueden continuar respondiendo a señales mitogénicas, proliferando sostenidamente, y eventualmente iniciarse en el proceso de la carcinogénesis (97). En lo que al crecimiento de tipo transitorio que se observa en la AH de las ratas W y SD tratadas con 17 β -estradiol, cabría la posibilidad de que en respuesta al crecimiento inicial de la glándula, inducido por estrógenos, se activaran genes de tipo supresor cuyos productos, aún en presencia del estímulo estrogénico, fueran capaces de frenar el crecimiento de la AH en las ratas W, y de provocar su regresión en las ratas SD.

En forma un tanto contrastante con lo hasta ahora expuesto, Wiklund y cols.(22), han planteado que las diferencias en la susceptibilidad al desarrollo tumoral de la AH por estrógenos entre las ratas de diversas cepas parecen residir directamente a nivel de la glándula misma, desechando la idea de la participación de factores periféricos en el fenómeno. El trasplante simultáneo, fuera del control hipotalámico, de las adenohipófisis de ratas de cepas con una alta y baja respuesta a estrógenos, como son las Fischer 344 y las Holtzman, a la cápsula renal (zona muy vascularizada) de hospederos híbridos tratados previamente con estrógenos, revela un crecimiento del tejido adenohipofisiario característico de cada cepa, ésto es, las adenohipófisis de ratas muy susceptibles crecen notablemente, mientras que las de ratas con una baja respuesta crecen poco. Aún así, ésto no excluye definitivamente la posible participación de algunos factores actuando en forma parácrina y/o autócrina en la AH de los animales de cada cepa.

Los resultados obtenidos en este trabajo no sólo muestran que entre las ratas hembra W y SD a las que hemos tenido acceso existen diferencias a nivel adenohipofisiario en la susceptibilidad al estímulo estrogénico, si no que, incluso, se observan diferencias en esta respuesta ante dicho estímulo entre los grupos de ratas de un mismo tipo de cepa según lo encontrado en el presente estudio y lo reportado en la literatura por otros laboratorios (17, 20, 21, 23, 54, 58, 78, 79).

Así, aunque tradicionalmente se ha considerado a las ratas de la cepa Wistar como muy susceptibles al estímulo estrogénico (20), la literatura recabada en el presente trabajo evidencia, en realidad, variaciones extremas en la respuesta de crecimiento y funcionamiento de la AH en

respuesta a dicho estímulo en estas ratas (20, 54, 78, 79). Dentro de estas variaciones podemos ubicar a la respuesta de crecimiento adenohipofisiario presentada por las ratas W aquí estudiadas, como transitoria y de magnitud moderada (ya que sólo expresa un incremento del doble) en contraposición a la respuesta funcional (referida a los niveles de PRL circulantes) también transitoria y marcadamente elevada (con incrementos de decenas de veces sobre los grupos testigo) aunque sólo durante la fase en que la glándula alcanza su crecimiento máximo (a las 4 semanas de estrogenización).

Por otra parte, los datos presentados en este trabajo coinciden con lo reportado en la literatura respecto a que las ratas de la cepa Sprague-Dawley presentan una respuesta adenohipofisiaria moderada ante el estímulo estrogénico (23, 35, 40). Sin embargo, es la primera vez que se advierte el comportamiento transitorio de dicha respuesta, en la que, después de una fase de estimulación del crecimiento de la AH, se presenta una fase activa de decrecimiento, que provoca la regresión tumoral de la AH de estas ratas hasta valores por debajo de los del grupo testigo. Todo ésto se evidenció con la determinación de diversos parámetros como fueron el peso en fresco de la AH, el contenido total de proteína en la glándula y los niveles de PRL en sangre.

Las diferencias observadas en distintos estudios sobre la respuesta estrogénica entre los distintos grupos de ratas pertenecientes a un mismo tipo de cepa pueden deberse, entre otras cosas, al tipo, forma de administración y dosis del agente estrogénico empleado; al curso temporal seguido; a los métodos de determinación utilizados; y, sobre todo, a que el largo aislamiento reproductivo respecto al pie de cría original bien pudiera haber favorecido la expresión de características diversas en los distintos grupos de animales en los que no existe intercambio a nivel genético. Ya previamente se han reportado dichas diferencias entre ratas hembra Wistar tratadas experimentalmente de la misma forma pero provenientes de laboratorios distintos (50). Es esta última explicación la que parece corresponder en nuestro caso, ya que un largo aislamiento de más de 10 años en las ratas W y SD del IIB, UNAM, respecto al pie de cría original, bien podría haber bastado para inducir diferencias en estos grupos de animales, lo cual incluso se observa al comparar nuestros resultados con otros en la literatura en los que se han seguido protocolos experimentales

semejantes (23, 34) y en los que se encuentran diferencias contrastantes en la respuesta a estrógenos entre las ratas.

Nuestros resultados también permitieron conocer que el efecto que tiene el estradiol en la AH de las ratas de las cepas W y SD es específico y opuesto al efecto metabólico general, ya que mientras la AH de las ratas de cada cepa muestra un comportamiento característico del grupo ante dicho estímulo, el peso corporal se comporta de la misma forma en las ratas de ambas cepas. De la misma forma, mientras que la glándula adenohipofisiaria muestra un aumento en su crecimiento en respuesta a estrógenos, el peso corporal se mantiene prácticamente constante, y cuando la glándula decrece, por efecto de la desestrogenización, el peso corporal reinicia su crecimiento.

A manera de resumen podemos concluir que :

- 1) El tratamiento con 17 β -estradiol induce el crecimiento de la glándula adenohipofisiaria en las ratas hembra Wistar y Sprague-Dawley del IIB, UNAM.
- 2) El efecto estrogénico sobre el funcionamiento de la adenohipófisis en las ratas de ambas cepas es mucho más marcado que el observado en el tamaño de la glándula.
- 3) Existe una sensibilidad variable al estímulo estrogénico entre estas dos cepas de rata, presentándose en las ratas Sprague-Dawley, además de mecanismos compensatorios al estímulo estrogénico más ágiles que en los de las ratas Wistar, la activación de mecanismos capaces de inducir la regresión tumoral completa de la adenohipófisis.
- 4) Este efecto es específico sobre la glándula adenohipofisiaria y opuesto al efecto metabólico general.

BIBLIOGRAFIA

1. Kannan CR. 1987. The pituitary gland. Clinical surveys in endocrinology. Plenum Publishing Corporation, 1. New York. 594 pp.
2. Kovacs K, y Horvath E. 1985. Morphology of adenohypophyseal cells and pituitary adenomas. In: Imura H (eds) The pituitary gland. Raven Press, New York, pp 25-55.
3. Sherman BM, Harris CE, Schlechte J, Duello TM, Halmi NS, van Gilder J, Chapler FK, Gvanner DK. 1978. Pathogenesis of prolactin-secreting pituitary adenomas. *Lancet* ii: 1019-1021.
4. Thorner MO. 1982. Hipersecreción de prolactina. In: Valverde C, Fanghanel G, Mena F (eds) Nuevos conceptos sobre fisiología y patología hipotálamo-hipofisaria. CONACyT, México, D. F., pp 179-204.
5. Lamberts SWJ, y MacLeod RM. 1990. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* 70: 279-318.
6. Franks S, y Nabarro JD. 1977. Prevalence and presentation of hyperprolactinemia in patients with "functionless" pituitary tumours. *Lancet* i: 778-780.
7. Aono T. 1988. Prolactinoma and female reproductive function. In: Hoshino K (eds) Prolactin gene family and its receptors. Elsevier Science Publishers B. V., pp 407-414.
8. Sherman RP, y Fraser IS. 1977. Impact of new diagnostic methods on the differential diagnosis and treatment of secondary amenorrhoea. *Lancet* i: 1195-1197.
9. Ito A, Moy P, Kaunitz H, Kortwright K, Clarke S, Furth J, Meites J. 1972. Incidence and character of the spontaneous pituitary tumors in strain CR and W/Fu male rats. *Journal of the National Institute* 49: 701-711.

10. Lee AK, DeLellis RA, Blount M, Nunnemacher G, Wolfe HJ. 1982. Pituitary proliferative lesions in aging male Long-Evans rats. *Lab Invest* 47: 595-602.
11. Trouillas J, Girod C, Claustrat B, Curé M, Dubois MP. 1982. Spontaneous pituitary tumors in the Wistar/Furth/Ico rat strain. *Am J Pathol* 109: 57-70.
12. Huang H, Marshall S, Meites J. 1976. Capacity of old versus young female rats to secrete LH, FSH and prolactin. *Biol Reprod* 14: 538-543.
13. Wilson JD, y Foster DW. 1985. *Textbook of endocrinology*. W. B. Saunders Company, 7. Philadelphia. 1413 pp.
14. Meites J. 1988. Biological functions of prolactin in mammals. In: Hoshino K (eds) *Prolactin gene family and its receptors*. Elsevier Science Publishers B. V., pp 123-130.
15. Furth J, Ueda G, Clifton KH. 1973. The pathophysiology of pituitaries and their tumors : Methodological advances. In: Bush H (eds) *Methods in cancer research*. Academic Press, New York, pp 201-277.
16. De Nicola AF, Lawzewitsch I, Kaplan SE, Libertun C. 1978. Biochemical and ultrastructural studies on estrogen-induced pituitary tumors in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 61: 753-763.
17. Holtzman S, Stone JP, Shellabarger CJ. 1979. Influence of diethylstilbestrol treatment on prolactin cells of female ACI and Sprague-Dawley rats. *Cancer Res* 39: 779-784.
18. Ito A. 1976. Animal model of human disease. *Am J Pathol* 83: 423-424.
19. Kaplan SE, y De Nicola AF. 1976. Protein and RNA synthesis in pituitary tumors from F344 rats given implants of estrogen. *J Natl Cancer Inst* 56: 37-42.

20. Lloyd RV. 1983. Estrogen-induced hyperplasia and neoplasia in the rat anterior pituitary gland. *Am J Pathol* 113: 196-206.
21. Stone JP, Holtzman S, Shellabarger J. 1979. Neoplastic responses and correlated plasma prolactin levels in diethylstilbestrol-treated ACI and Sprague-Dawley rats. *Cancer Res* 39: 773-778.
22. Wiklund J, Wertz N, Gorski J. 1981. A comparison of estrogen effects on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F344 and Holtzman rats. *Endocrinology* 109: 1700-1707.
23. Weiner RI, Elias KA, Monnet F. 1985. The role of vascular changes in the etiology of prolactin secreting anterior pituitary tumors. In: MacLeod RM, Thorner MO, Scapagnini U (eds) *Prolactin. Basic and clinical correlates*. Liviana Press, Padova, pp 641-653.
24. Vertosick FT. 1985. Role of defective dopaminergic inhibition of prolactin secretion in the pathogenesis of prolactinoma. *Neurosurgery* 16: 261-266.
25. Guyton AC. 1988. *Tratado de fisiología médica*. Interamericana. McGraw-Hill, 7. Barcelona. 1051 pp.
26. Martin CR. 1985. *Endocrine physiology*. Oxford University Press, USA., 1019 pp.
27. Ben-Jonathan N. 1985. Dopamine : A prolactin-inhibiting hormone. *Endocrine Reviews* 6: 564-589.
28. Davies C, Jacobi J, Lloyd HM, Meares JD. 1974. DNA synthesis and the secretion of prolactin and growth hormone by the pituitary gland of the male rat : Effects of diethylstilboestrol and 2-bromo- δ -ergocryptine methanesulphonate. *J Endocr* 61: 411-417.
29. Leong DA, Frawley LS, Neill JD. 1983. Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Ann Rev Physiol* 45: 109-127.

30. Selmanoff M. 1985. Rapid effects of hyperprolactinemia on basal prolactin secretion and dopamine turnover in the medial and lateral median eminence. *Endocrinology* 116: 1943-1952.
31. Simpkins JW, y Gabriel SM. 1984. Chronic hyperprolactinemia causes progressive changes in hypothalamic dopaminergic and noradrenergic neurons. *Brain Research Elsevier* 309: 277-282.
32. Franks S. 1983. Regulation of prolactin secretion by oestrogens: physiological and pathological significance. *Clin Sci* 65: 457-462.
33. Gersten BE, y Baker BL. 1970. Local action of intrahypophyseal implants of estrogen as revealed by staining with peroxidase-labeled antibody. *American Journal of Anatomy* 128: 1-20.
34. Lloyd RV, Cano M, Landefeld TD. 1988. The effects of estrogens on tumor growth and on prolactin and growth hormone mRNA expression in rat pituitary tissues. *Am J Pathol* 133: 397-406.
35. Lloyd HM, Meares JD, Jacobi J. 1975. Effects of oestrogen and bromocryptine on in vivo secretion and mitosis in prolactin cells. *Nature* 255: 497-498.
36. Lieberman ME, Maurer RA, Claude P, Gorski J. 1982. Prolactin synthesis in primary cultures of pituitary cells: Regulation by estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 25: 277-294.
37. West B, y Dannies PS. 1980. Effects of estradiol on prolactin production and dihydroergocryptine-induced inhibition of prolactin production in primary cultures of rat pituitary cells. *Endocrinology* 106: 1108-1113.
38. Sortino MA, y Wise PM. 1989. Effects of age and long term ovariectomy on prolactin secretion, as assessed by the reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 124: 90-96.

39. Sirbasku DA. 1978. Estrogen induction of growth factors specific for hormone-responsive mammary, pituitary, and kidney tumor cells Proc Natl Acad Sci USA 75: 3786-3790.
40. Chen CL, y Meites J. 1970. Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. Endocrinology 86: 503-505.
41. Nicoll CS. 1974. Physiological actions of prolactin. In: Knobil E, Sawyer WH (eds) Handbook of physiology. American Physiological Society, Washington, D. C., pp 253-292.
42. Clapp C. 1984. Regulación de la secreción láctea durante la lactancia en la coneja. Doctor en ciencias fisiológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
43. Pellegrini I, Gunz G, Ronin C, Fenouillet E, Peyrat JP, Delori P, Jaquet P. 1988. Polymorphism of prolactin secreted by human prolactinoma cells : Immunological, receptor binding, and biological properties of the glycosylated and nonglycosylated forms. Endocrinology 122: 2667-2674.
44. Kovacs K, Ilse G, Ryan N, McComb DJ, Horvath E, Chen HJ, Walfish PG. 1980. Pituitary prolactin cell hyperplasia. Hormone Res 12: 87-95.
45. Lamberts SW, y Thorner MO. 1985. Etiology of prolactinomas : An overview. In: MacLeod RM, Thorner MO, Scapagnini U (eds) Prolactin. Basic and clinical correlates. Liviana Press, Padova, pp 703-704.
46. Weiner R, Findell P, Ferrara N, Clapp C, Schechter J. 1988. Arteriogenesis and the etiology of prolactinomas. In: Imura H (eds) Progress in endocrinology. Elsevier Science Publishers B. V., pp 559-566.
47. Cronin MJ, Cheung CY, Weiner RI, Goldsmith PC. 1982. Mammotroph and gonadotroph volume percentage in the rat anterior pituitary after lesion of the medial basal hypothalamus. Neuroendocrinology 34: 140-147.

48. MacLeod RM. 1982. Monoaminas hipotalámicas y secreción de hormonas hipofisarias en condiciones normales y patológicas. In: Valverde C, Fanghanel G, Mena F (eds) Nuevos conceptos sobre fisiología y patología hipotálamo-hipofisaria. CONACyT, México, D. F., pp 103-134.
49. Amenomori Y, Chen CL, Meites J. 1970. Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. *Endocrinology* 86: 506-510.
50. Ito A, Martin JM, Grindeland RE, Takizawa S, Furth J. 1971. Mammotropic and somatotrophic hormones in sera of normal rats and in rats bearing primary and grafted pituitary tumors. *The Institute of Journal of Cancer* 7: 416-429.
51. Lu KH, Hopper BR, Vargo TM, Yen SSC. 1979. Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod* 21: 193-203.
52. Neill JD, Freeman ME, Tillson SA. 1971. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinology* 89: 1448-1453.
53. Clifton KH, y Meyer RK. 1956. Mechanism of anterior pituitary tumor induction by estrogen. *Anat Rec* 125: 65-81.
54. Nakagawa K, Obara T, Tashiro K. 1980. Pituitary hormones and prolactin-releasing activity in rats with primary estrogen-induced pituitary tumors. *Endocrinology* 106: 1033-1039.
55. Wiklund J, y Gorski J. 1982. Genetic differences in estrogen-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the rat pituitary: correlations with pituitary tumor susceptibility. *Endocrinology* 111: 1140-1149.
56. Cramer OM, Parker CR, Porter JC. 1979. Estrogen inhibition of dopamine release into hypophysial portal blood. *Endocrinology* 104: 419-422.

57. Shimokawa N, Hattori M, Imai K, Kato Y, Wakabayashi K. 1988. Prolactin synthesis and secretion during rat estrous cycle and in separated mammothrophs. In: Hoshino K (eds) Prolactin gene family and its receptors. Elsevier Science Publishers B. V., pp 251-254.

58. Yamamoto N, Seo H, Suganuma N, Matsui N, Nakane T, Kuwayama A, Kageyama N. 1986. Effect of estrogen on prolactin mRNA in the rat pituitary. *Neuroendocrinology* 42: 494-497.

59. Döhler KD, y Wuttke W. 1975. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 97: 898-907.

60. Jordan VC, Koerner S, Robison C. 1975. Inhibition of oestrogen-stimulated prolactin release by anti-oestrogens. *J Endocr* 65: 151-152.

61. de Greef WJ, Klootwijk W, Karels BV T. J. 1985. Levels of dopamine and thyrotrophin-releasing hormone in hypophysial stalk blood during an oestrogen-stimulated surge of prolactin in the ovariectomized rat. *J Endocr* 105: 107-112.

62. Polak JM, Steel JH, Hamid Q, Van Noorden S, Jones P, Denny P, Legon S, Bloom SR. 1988. Dynamic endocrinology of the pituitary gland : A study of prolactin gene expression in immature, pregnant, lactating, ovariectomised and thyroidectomised rats using in situ hybridisation and immunocytochemistry. In: Hoshino K (eds) Prolactin gene family and its receptors. Elsevier Science Publishers B. V., pp 327-334.

63. Davis JRE, Selby C, jeffcoate WJ. 1984. Oral contraceptive agents do not affect serum prolactin in normal women. *Clin Endocrinol* 20: 427-434.

64. Friesen HG, y Vrontakis M. 1988. The influence of estrogen on pituitary prolactin cell proliferation and gene expression. In: Hoshino K (eds) Prolactin gene family and its receptors. Elsevier Science Publishers B. V., pp 389-405.

65. Shy KK, McTiernan AM, Daling JR, Weiss NS. 1983. Oral contraceptive use and the occurrence of pituitary prolactinoma. *Journal of American Medicine Association* 249: 2204-2207.
66. Gooren LJG, Assies J, Asscheman H, de Slegte R, van Kesteren H. 1988. Estrogen-induced prolactinoma in a man. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 444-446.
67. Tucker HA. 1988. Lactation and its hormonal control. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp 2235-2264.
68. Martínez de la Escalera G. 1984. Estudio del proceso de secreción de prolactina y su regulación en la rata lactante. Doctor en ciencias fisiológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
69. Martínez de la Escalera G, Guthrie J, Weiner RI. 1988. Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH but not VIP: Stimulation via Ca^{++} /protein kinase C pathway. *Neuroendocrinology* 47: 38-45.
70. Grosvenor CE, Maiweg H, Mena F. 1970. Effect of non-suckling interval on the ability of prolactin to stimulate milk secretion in rats. *Am J Physiol* 219: 403-408.
71. Martínez de la Escalera G, y Weiner RI. 1988. Mechanism (s) by which the transient removal of dopamine regulation potentiates the prolactin-releasing action of thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 47: 186-193.
72. Lee AE. 1972. Cell division and DNA synthesis in the mouse uterus during continuous oestrogen treatment. *J Endocr* 55: 507-513.
73. Stanley HF, Curtis A, Sheward WJ, Roberts JL, Fink G. 1986. Prolactin messenger ribonucleic acid levels in the normal and hypogonadal mouse pituitary gland. *Endocrinology* 119: 2422-2426.
74. Clifton KH, y Furth J. 1961. Changes in hormone sensitivity of pituitary mammotropes during progression from normal to autonomous. *Cancer Res* 21: 913-920.

75. Gottschall PE, Sarkar DK, Meites J 1986. Persistence of low hypothalamic dopaminergic activity after removal of chronic estrogen treatment. *Proc Soc Exp Biol Med* 181: 78-86.
76. Willis RA. 1948. Pathology of tumours. London Butterworth Publishers LTD, London. 992 pp.
77. Lloyd RV, Coleman K, Fields K, Nath V. 1987. Analysis of prolactin and growth hormone production in hyperplastic and neoplastic rat pituitary tissues by hemolytic plaque assay. *Cancer Res* 47: 1087-1092.
78. Niwa J, Minase T, Hashi K, Mori M. 1987. Immunohistochemical, electron microscopic and morphometric studies of estrogen-induced rat prolactinomas after bromocriptine treatment. *Virchows Arch B* 53: 89-96.
79. Osamura RY, y Watanabe K. 1986. Ultrastructural localization of prolactin in estrogen-induced prolactinoma of the rat pituitary. *Acta Pathol Jpn* 36: 1131-1137.
80. Jacobi J, Lloyd HM, Meares JD. 1977. Onset of oestrogen-induced prolactin secretion and DNA synthesis by the rat pituitary gland. *J Endocr* 72: 35-39.
81. Maurer RA, y Gorski J. 1977. Effects of estradiol-17 β and pimozide on prolactin synthesis in male and female rats. *Endocrinology* 101: 76-84.
82. Shull JD, y Gorski J. 1986. The hormonal regulation of prolactin gene expression: An examination of mechanisms controlling prolactin synthesis and the possible relationship of estrogen to these mechanisms. *Vitamins and Hormones* 43: 197-249.
83. Maurer RA. 1982. Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. *J Biol Chem* 257: 2133-2136.
84. Harkness JE, y Wagner JE. 1977. The biology and medicine of rabbits and rodents. Lea & Febiger, Philadelphia.

85. Hafez ES. 1970. Reproduction and breeding. Techniques for laboratory animals. Lea & Febiger, Philadelphia. 375 pp.
86. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
87. Burton K. 1968. Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods in Enzymology* XII: 163-166.
88. Stormshak F, Leake R, Wertz N, Gorski J. 1976. Stimulatory and inhibitory effects of estrogen on uterine DNA synthesis. *Endocrinology* 99: 1501-1511.
89. Martin L, Finn CA, Trinder G. 1973. Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: An autoradiographic study. *J Endocr* 56: 133-144.
90. Murayama A. 1986. Molecular constitution of the estrogen receptor system and the hormonal response. In: *Molecular mechanism of signal transduction*. VNU Science Press B. V., Utrecht, pp
91. Katzenellenbogen BS. 1980. Dynamics of steroid hormone receptor action. *Ann Rev Physiol* 42: 17-35.
92. Seyfred A, y Gorski J. 1990. An interaction between the 5'flanking distal and proximal regulatory domains of the rat prolactin gene is required for transcriptional activation by estrogens. *Mol Endocrinol* 4: 1226-1234.
93. Soto AM, y Sonnenschein C. 1980. Control of growth of estrogen-sensitive cells: Role for δ -fetoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2064-2067.
94. Sonnenschein C, y Soto AM. 1979. Growth inhibition of estrogen-sensitive tumor cells in newborn rats. Probable role of alpha-fetoprotein. *J Natl Cancer Inst* 63: 835-841.

95. Beutler B. 1988. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation : A common mediator. *Ann Rev Biochem* 57: 505-518.

96. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. 1987. *Molecular biology of the gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 4. 2. Menlo Park, Ca. 1012 pp.

97. Friend SH, Dryja TP, Weinberg RA. 1988. Oncogenes and tumor-suppressing genes. *N Engl J Med* 318: 618-622.