

11281
13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

REGULACION HORMONAL DE LA EXPRESION DE
NEUROFILAMENTOS EN LA ADENOHIPOFISIS DE RATA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A :
BIOL. TATIANA FIORDELISIO COLL

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO HERNANDEZ CRUZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Poco es lo que podría escribir aquí de lo mucho que les
agradezco y quiero:

A mi mamá y a César (mi papá)
A mi hermana y a Pavel
A mis abuelas Irina y Carmelita

A Javier mi compañero en todo y al Vic
(por todo el amor y apoyo que me dan y
por todas las horas que de estar juntos les robé)

A mi papá

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Quiero agradecer en especial a Arturo, por todo lo que me enseñó y me apoyó, por su paciencia (suelo tener la cabeza dura) y su cariño.

Gracias a todos los sinodales de este trabajo y a mis asesores por el tiempo, los comentarios y las cosas que me enseñaron. A Flavio Mena por el apoyo y cariño que siempre me da. A Marcia Hiriart por sus oportunas y acertadas observaciones. A Tere Morales, Mauricio Díaz, Luis Vaca, Agustín Guerrero, Olga Echeverría y Carlos Gutiérrez por ayudarme a que este trabajo saliera bien. Gracias a Alejandro Zentella y a todos los de su laboratorio (Adriana, José Luis, Griselda, Lucía...) por ayudarme y enseñarme a entrar al mundo de la corredera de geles. Gracias también a Carmen por enseñarme y ayudarme con los eritrocitos y su hemólisis.

Quiero agradecer a todas las personas que forman parte de mis días, mis trabajos, mis sueños y mi vida. A cada uno tengo algo que agradecerle y quizás no lo hago frecuentemente y ceo que no me alcanzarían las hojas para hacerlo como se debe. Sin embargo, como pienso que llegar aquí y a lo que soy (bueno o malo) nunca pudo ser de manera individual, voy a gastar un par de hojas y muchas palabras para intentar decirles de alguna manera lo mucho que agradezco formen parte de mi vida y espero que de por si sepan que les agradezco en principio la paciencia que tienen con mi carácter y mi voz altísima y golpeada, les agradezco el convivir, vivir, aprender y estar conmigo (aunque estar no es algo necesariamente físico ni cotidiano).

A Nicolás por las cerca de 18,000 horas (todas buenas) que hemos convivido juntos, además claro de toda la ayuda que siempre estuvo dispuesto a darme, todas las cosas que de el aprendí y que con el compartí. A la Sra. Ninfa, Ma. Elisa, Claudia, Yazmín, Ivonne, Fredy, Silvia, Daniel y Héctor, con quienes he compartido muchas mañanas y tardes, buenos momentos y claro algunos malos, pero pocos y siempre fáciles de pasar.

A Paquito, Gabi, Mariana, Vale, Alejandro, Federico, Bruno, Juan Carlos, Mariano, Andrés y Ricardo. Por que siempre están.

A mi familia, Margarita, Mariana, Pablo (bienvenido), Pierre, Tatjana, Laurette, Deya, Marco, Flor, (Jostin, Florecita, Paloma, Paco, Oona y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ewan) los primos. A Mercedes y Vicente por el apoyo y la comprensión que siempre nos dan, a Merche, Alfonso, Santi, Iñaki, Manolo, Chente, Leti, Ximena, Chentito y Jose Miguel por ser parte de mi familia. A mis tíos y primos en Brasil, a quienes extraño todos los días; Ziga y Renato esto que ahora soy también es su culpa.

A Mariana E, Mariana F, Tere, Vale, David L, Javier, David M, Tania, Miriam, Agustín, Iker, Alvaro, Abril, Gabriel, Yaz y Lev, mi colectivo con quienes he aprendido muchísimo. A Javier E, al Nef, Noe, Marco, Ávila, Moresqui, Carolina, Bety, Beto, Cata, Ma. Elena, Ishi, Sergio, Priscila, Núñez, Benilde, Tenorio, Tatiana, Cesar, etc., mis compañeros del Frente Zapatista con quienes intento construir un mundo diferente. El camino es lento, inseguro y difícil, pero siempre se hace más leve cuando se comparte con gente como ustedes y siempre, siempre que haya un niño que muere de hambre o de enfermedad, es necesario seguir.

A Yuri, Ramón, Silvia y Andrés por su amistad, apoyo y por todas las cosas que he aprendido de ellos y con ellos.

En especial, muy especial, quiero agradecer al EZLN, a los niños, niñas, hombres, mujeres y ancianos de las comunidades zapatistas, por tantas cosas, pero particularmente por darme todas las mañanas la esperanza de que otro mundo es posible, por no dejarnos olvidar que la dignidad existe y por que con su lucha nos vuelven más humanos. Se que poco o nada hago con mi granito de arena y que algunas de esas veces hago las cosas mal, también se que más me han dado a mí como persona que lo que yo puedo darles.....gracias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	3
Glosarios	4 - 7
Introducción	8 - 16
Materiales y Métodos	17 - 28
Resultados	29 - 59
Discusión	60 - 70
Conclusión	70
Referencias	71 - 79
Anexo 1	
Dimorfismo sexual en el sistema nervioso	80 - 111
Anexo 2	
Neurofilamentos	112 - 116
Anexo 3	
Sub-poblaciones celulares de lactotropos y gonadotropos	117 - 141
Artículo J. Neuroendocrinology	142 - 155

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Generalmente es aceptado que la neurohipófisis se deriva de la cresta neural, mientras que la adenohipófisis es de origen ectodermal. Sin embargo, algunos autores han sugerido que al menos una subpoblación de células adenohipofisiarias pudieran tener un origen neuroectodérmico. Es de esperar que estas células expresen marcadores neuronales específicos. En años pasados, diferentes autores han analizado esta posibilidad y han obtenido resultados contradictorios. Este estudio intenta clarificar si las células adenohipofisiarias expresan o no marcadores neuronales. Utilizando inmunofluorescencia cuantitativa, se identificó una subpoblación de células adenohipofisiarias positivas a marcadores neuronales como los neurofilamentos de 68 kDa (NF68), de 200 kDa (NF200) y MAP-2, observándose células que no expresan, células con bajo nivel de expresión y células con alto nivel de expresión. La expresión de NF68 que observamos es sexualmente dimórfica, las células positivas a neurofilamentos son más abundantes en las ratas hembras sexualmente maduras. La expresión de NF68 en ratas hembras aumenta durante el desarrollo y alcanza un nivel de meseta al pasar la pubertad. La expresión de neurofilamentos cambia a lo largo del ciclo estral, el embarazo y el posparto, presentándose un máximo en el estro y el posparto y el mínimo en el proestro y embarazo. La inmunoreactividad de NF68 se examinó también en células adenohipofisiarias de ratas hembras ovariectomizadas, tratadas con estradiol, y con un antagonista del receptor de estrógenos. La ovariectomía y el tratamiento con tamoxifen indujeron una reducción del número de células positivas, efecto que fue revertido por el tratamiento con estradiol. Los experimentos de doble inmunomarcaje proporcionaron evidencia de que las células adenohipofisiarias que expresan rasgos neuronales corresponden a subpoblaciones de lactotopos, somatotopos, tirotopos y gonadotropos y que el porcentaje de células positivas para cada grupo varía dependiendo del estado fisiológico de la rata.

ABSTARCT

It is generally accepted that the neurohypophysis derives from neural crest while the adenohypophysis is of ectodermal origin. However, it has been recently suggested that at list a subpopulation of cells in the anterior pituitary could have in part neuro-ectodermal origin, and thus, should express specific neuronal markers. This issue was examined in the past with conflicting results. The present study attempts to clarify whether or not neuronal markers are expressed in the adenohypophysis. Using quantitative immunofluorescence, we have positively identified a subset of anterior pituitary cells, which express immunoreactivity for neuronal markers, including neurofilament 68 kDa (NF68), 200 kDa (NF200) y MAP-2. We noticed that the expression of NF68 is sexually dimorphic, neurofilament-positive cells are more abundant in sexually mature female rats. In addition, NF68 expression in female rats increases during development and reaches a plateau level after puberty. It displays plastic changes along the estrous cycle, with the maximum of expression at estrus and pospatum and the minimum at proestrus and pregnancy. NF68 immunoreactivity was examined after ovariectomy, estradiol replacement, and treatment with a specific estrogen receptor antagonist. Ovariectomy and anti-estrogen tamoxifen induced a significant reduction in the number of NF68-positive cells. This effect was completely reverted by treatment estradiol. Double immunolabeling experiments provided evidence that pituitary cells expressing neuronal traits correspond to subsets of lactotrophs, somatotrophs, thyrotrophs and gonadotrophs. According to the phisiological status of the rat the porcentaje of the positive-cells changes.

GLOSARIO

ACTH	adenocorticotropina
ADH	hormona antidiurética
AE	alta expresión
AH	adenohipófisis
BE	baja expresión
BSA	albúmina serica bovina
CHO	células de ovario de Hámster Chino
DMEM	dulbecco's modified eagle media
E ₂	estradiol
FI	filamento intermedios
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FSH	hormona foliculo estimulante
GFAP	proteínas fibrilares gliares
GH	hormona del crecimiento
GSU	subunidad α de glucoproteína
LH	hormona luteinizante
MAP-2	proteína asociada a microtúbulos 2
MSH	melanotropina
NF200	neurofilamentos de 200 kDa
NF68	neurofilamentos de 68 kDa
NF-H	neurofilamentos de 200 kDa
NF-L	neurofilamentos de 68 kDa
NGF	factor de crecimiento neural
NH	neurohipófisis
OVX	ovariectomizada
OX	oxitocina
PBS	buffer de fosfatos
POMC	proopiomelanocorticotropina
PRL	prolactina

RE	receptor de estrógenos
SE	sin expresión
SFB	suero fetal bovino
TRH	hormona liberadora de tirotropina
TRITC	isotiocianato de tetrametil rodamina
TSH	tirotropina

GLOSARIO ANEXO “DIMORFISMO SEXUAL”

5 α -DTH	dihydrotestosterona
APO	área preóptica
BC	bulbo cavernoso
BOA	bulbo olfatorio accesorio
CCK	colecistocinina
CVA	centro vocal alto
HVM	núcleo ventromedial
MeA	amígdala media
mAPO	área preóptica media
NAVVP-APO	núcleo anteroventral periventricular del área preóptica
NBBOA	núcleo basal bulbo olfatorio accesorio
NBST	núcleo basal de la <i>stria terminalis</i>
NEBC	núcleo estriado bulbocavernoso
NSD-APO	núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica
P15	día posnatal 15
RA	núcleo robusto del <i>archistriatum</i>
RA	receptor de andrógenos
RE	receptor estrogénico
VNO	órgano vomeronasal
VNS	sistema vomeronasal

GLOSARIO ANEXO “NEUROFILAMENTOS”

NF-M	neurofilamentos de 130 - 170 kDa
NF-H	neurofilamentos de 180 - 200 kDa
NF-L	neurofilamentos de 60 -70 kDa
NGF	factor de crecimiento neural
PKC	proteína cinasa C
PKA	proteína cinasa A
PC12	pheocromocitoma cells

GLOSARIO ANEXO “ SUBPOBLACIONES CELULARES DE LACTOTROPOS Y GONADOTROPOS”

5-HT	serotonina
A-II	angiotensina II
BSA	albúmina sérica bovina
DA	dopamina
E ₂	estradiol
FSH	hormona foliculo estimulante
GC	complejo de golgi
GH	hormona de crecimiento
GnRH	hormona liberadora de gonadotropinas
GS	gránulo de secreción
GtH	gonadotropos
HLHs	hormonas liberadoras de hormonas
LH	hormona luteinizante
LP	placas de hemólisis grandes
NT	neurotensina
OVX	ovariectomizadas

OX	oxitocina
PACAP	polipéptido pituitario activado por adenilato ciclasa
PLC	fosfolipasa C
PRL	prolactina
RE	retículo endoplásmico
RER	retículo endoplásmico rugoso
RHPA	ensaño hemolítico de placa
SP	placas de hemólisis pequeñas
TP	testosterona
TRH	hormona liberadora de tirotropinas
VIP	péptido vasoactivo intestinal
VP	vasopresina

INTRODUCCIÓN

La hipófisis es una glándula que juega un papel crucial en numerosas funciones endocrinas y no endocrinas del organismo. Se encuentra ubicada en la zona ventral de la cavidad craneal (fig. 1). En la mayoría de los vertebrados está dividida en tres lóbulos: posterior, intermedio y anterior (fig. 2). El lóbulo posterior o neurohipófisis (NH), que se desarrolla a partir de una evaginación del ectodermo del piso del tercer ventrículo en el cerebro, está dividido en 1) proceso infundibular o *pars nervosa* y 2) tallo infundibular (fig. 2). El tallo infundibular es la zona de paso de las fibras neurosecretoras peptidérgicas que terminan en los capilares de la *pars nervosa*. Esta última está compuesta en un 42% de los axones provenientes de las neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo que sintetizan, entre otras, dos hormonas peptídicas, la oxitocina (OX) y la hormona antidiurética o vasopresina (ADH o VP). Estas hormonas son transportadas en forma granular por los axones hasta el lóbulo posterior de la hipófisis, donde se almacenan y liberan en las terminales axónicas (fig. 2). La porción superior de esta formación se expande para cubrir la porción inferior del hipotálamo, dando lugar a la eminencia media (fig. 2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

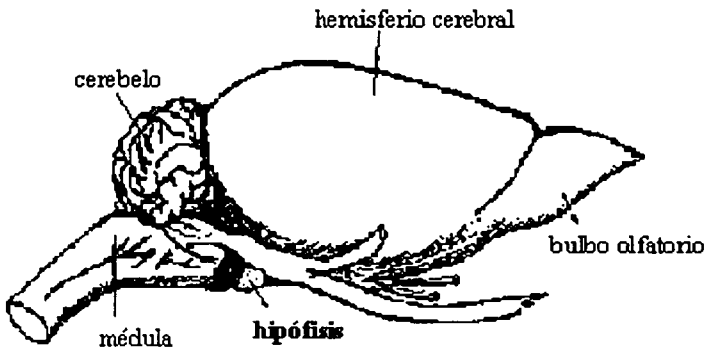


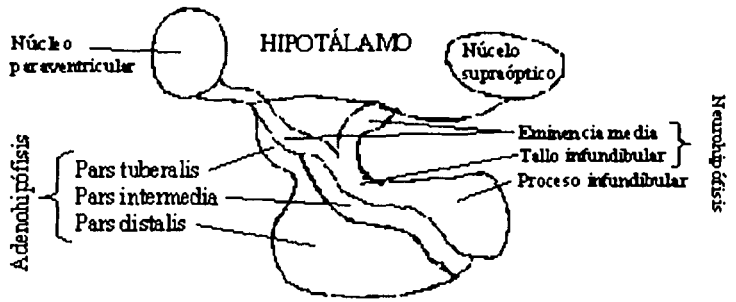
Fig. 1. Esquema que muestra la ubicación de la glándula hipofisiaria con relación al cerebro de la rata.

Entre el lóbulo posterior y el anterior, se encuentra una delgada lámina de tejido conocida como lóbulo intermedio, *pars intermedia* cuando es tomado como parte de la adenohipófisis o

lóbulo neuro-intermedio cuando se encuentra fusionado al lóbulo posterior (fig. 2). Esta parte de la hipófisis se origina a partir de la pared posterior de la bolsa de Rathke. La mayor proporción de células que se encuentran en este lóbulo son melanotropos, células que producen el precursor de proopiomelanocorticotropina (POMC) que en el caso de los melanotropos se divide posteriormente en β -endorfina y α -hormona estimulante de melanocitos. Este lóbulo se encuentra directamente inervado por las neuronas hipotalámicas, a través del lóbulo neural (1).

Finalmente, el lóbulo anterior o adenohipófisis (AH), esta dividido en *pars tuberalis* que comprende una pequeña porción del lóbulo que se extiende hacia arriba para adosarse en forma de collar al piso del diencefalo y *pars distalis*, en la cual se encuentra la mayor parte del tejido secretor hipofisario (fig. 2). Las células de la *pars distalis* se pueden dividir en general en dos grandes categorías: aquellas que secretan hormonas proteicas y aquellas cuya secreción hormonal es glucoproteica. El primer grupo corresponde a células acidófilas: somatotropos (secretan hormona de crecimiento, GH), lactotropos (secretan prolactina, PRL), lactosomatotropos (GH y PRL) y corticotropos (secretan adenocorticotropina ACTH). El segundo grupo esta compuesto de células basófilas: tirotropos (secretan tirotropina, TSH) y gonadotropos (secretan hormona luteinizante y/o foliculo estimulante, LH y/o FSH respectivamente). La proporción de cada uno de estos tipos celulares puede variar en el adulto y sobre todo en las hembras en hasta en un 10% dependiendo de la edad y la etapa del ciclo reproductivo, siendo en promedio: somatotropos 38.8%, lactotropos 26.8%, corticotropos 9.9%, gonadotropos 7%, tirotropos 3.6% y células foliculo-estrelladas 4.3% (tabla 1; 2 y 3). En algunos casos patológicos como el hipotiroidismo o la insuficiencia adrenal secundaria, el porcentaje de algunos tipos celulares como los tirotropos o los corticotropos puede variar en hasta un 20%.

Debido a su fución, el suministro de sangre de esta glándula es particularmente importante. Descrita como el sistema porta-hipofisario la complicada red de vasos porta largos y cortos forman una complicada red que irriga la glándula. La neurohipófisis posee una irrigación común (vasos-arteria-capilares-vasos), mientras que la adenohipófisis posee por el contrario una irrigación que es excepcional por el hecho de que toda la sangre que irriga a las células de este lóbulo pasa primero por el sistema nervioso a nivel de la eminencia media.



DIVISIONES PRINCIPALES

SUBDIVISIONES

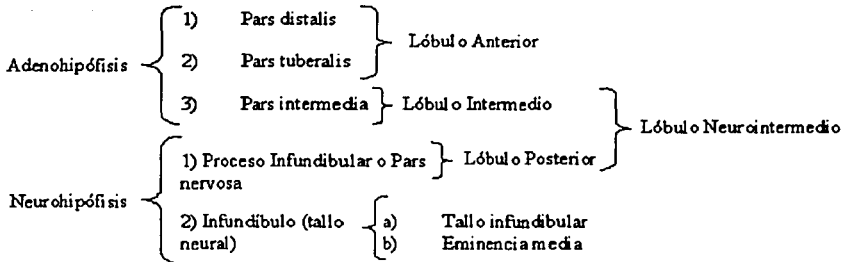


Fig. 2. Esquemas que muestran la división anatómica de la glándula hipofisiaria.

TIPO CELULAR	PROMEDIO DE POBLACIÓN EN RATA	HORMONA	FUNCIÓN
Melanotropos		Melanotropina (MSH)	Regula la síntesis de melanina en melanocitos y melanóforos.
Corticotropos	10 %	Corticotropina (ACTH)	Regula el crecimiento y la secreción en la corteza adrenal.
Somatotropos	42 %	Somatotropina (GH)	Estimula el crecimiento y el desarrollo somático posnatal. Regula el metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas.
Lactotropos	28 %	Prolactina (PRL)	Relacionada con la actividad lactogénica, metabolismo lipídico y efectos sobre el sistema inmunológico.
Tirotropos	5 %	Tirotropina (TRH)	Regula el crecimiento y metabolismo de la glándula tiroidea.
Gonadotropos	15 %	Folículo Estimulante Luteinizante (LH y FSH)	Relacionadas con los procesos reproductivos y de secreción de hormonas sexuales esteroides.

Tabla 1. Tipos celulares adenohipofisiarios, porcentaje promedio del total de la población celular (2, 3 y 36) en rata y principales funciones.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

En general desde 1938, se acepta que la porción anterior de la hipófisis tiene su origen embrionario a partir de una invaginación de las células del ectodermo que forman el techo de la cavidad oral del embrión, dando lugar a la llamada bolsa de Rathke. Esta bolsa posteriormente se cierra y se separa de la cavidad oral por interposición del hueso esfenoidal del cráneo (fig. 3).

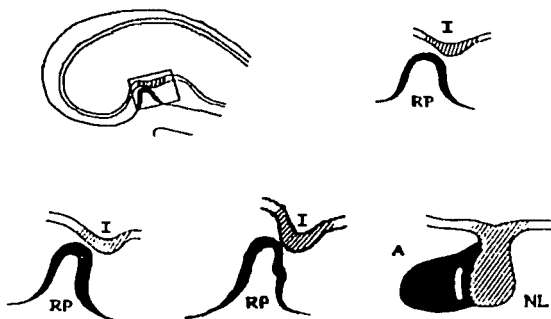


Fig. 3. Dibujo esquemático de la visión más aceptada de organogénesis de la hipófisis: A, lóbulo anterior; I, infundíbulo; NL, lóbulo neural; y RP, bolsa de Rathke.

Durante la morfogénesis de la glándula hipofisiaria, el grado de diferenciación celular no es uniforme y varía de un sitio a otro del primordio de la bolsa de Rathke. Inicialmente, la formación definitiva de la bolsa, requiere de la expresión de los genes *Lhx3* y *Lhx4* y el compromiso de estas células precursoras para formar la glándula, está establecido por el mismo gen *Lhx3*, que a su vez regula la expresión de algunos factores que determinarán posteriormente la diferenciación de algunas de las líneas celulares adenohipofisiarias, como *Pit-1* y la subunidad α de glucoproteína (GSU; 4 y 5). Las primeras células en diferenciarse son los corticotropos, posteriormente los tirotropos y los gonadotropos, quienes tienen en común la expresión de GSU. Finalmente, la expresión del factor *Pit-1*, marca la diferenciación de un tercer linaje celular compuesto de somatotropos y lactotropos y un aumento en tirotropos. Algunos estudios del linaje somatotropo-lactotropo han mostrado que los lactotropos provienen de los somatotropos e inclusive en el adulto permanece una población celular (lactosomatotropos) que sintetiza y secreta tanto hormona de crecimiento como prolactina (fig. 4; 4 y 5).

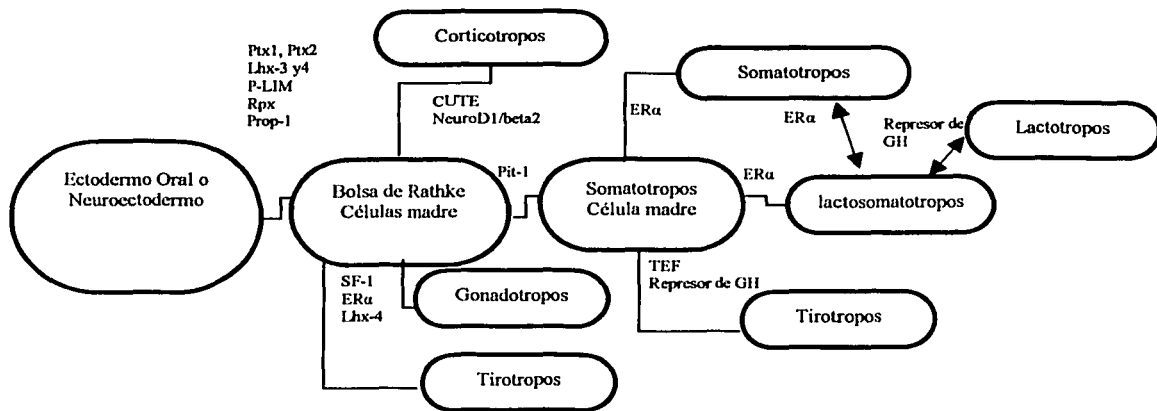


Fig. 4. Esquema que muestra los caminos de la citodiferenciación celular de la adenohipófisis y los factores de transcripción implicados en cada paso (5).

No obstante que existe un consenso sobre las distintas etapas de la diferenciación de la glándula una vez formada la bolsa de Rathke, algunos autores (6-10) han sugerido que al menos una subpoblación de las células de la adenohipófisis pudiera tener un origen neuroectodérmico. Esto implicaría que la adenohipófisis tendría un origen mixto: parcialmente neuroectodérmico y mayoritariamente ectodérmico. Con el fin de seguir la formación del quiasma óptico y de la bolsa de Rathke en el desarrollo embrionario del pollo, Takor y Pearse en 1975 (6), realizaron cortes transversales y longitudinales de embriones de pollo en estados presomíticos y de embriones de hasta 21 días de desarrollo en el huevo. Las observaciones de los cortes de 6 μm teñidos con hematoxilina-eosina, los llevaron a concluir que los dos lóbulos de la hipófisis se originan a partir de la porción caudal de la placa neural ventral, que se extiende desde el quiasma óptico hasta el estomodeo. En 1986, Eagleson y colaboradores (7), empleando microcirugía, extirparon a diferentes embriones de rana en estadios del 16 al 19 la placa neural ventral o el ectodermo. Los fragmentos de tejido extraídos se marcaron radioactivamente utilizando el agente Bolton-Hunter (N-succinimidil 3-(4-hidroxi, 5-(I^{125})-iodofenil) propionato) para teñir proteínas intracelulares y de la superficie celular, para posteriormente reimplantarse en el embrión y dejar que éstos se desarrollaran hasta diferentes estadios. Después de ser fijado y cortado, el tejido se procesó para inmunocitoquímica de corticotropina (ACTH). Con este método, los autores mostraron que en algunas zonas de la retina y del hipotálamo, se observaban células marcadas,

así como en la porción anterior de la hipófisis, específicamente en los corticotropos. Estas observaciones los llevaron a concluir que al menos en la rana los corticotropos se originan de la placa neural ventral. Recientemente, ElAmraoui y Dubois en 1993 y 1995 (9, 10) retomando las ideas de Takor y Pearse, extendieron los estudios del desarrollo de la hipófisis de pollo. Estos autores removieron microquirúrgicamente 140 μm de largo por 40 μm de profundidad de la placa neural ventral en fases tempranas del desarrollo embrionario (estadio 7-8) y siguieron el desarrollo de la bolsa de Rathke y de la adenohipófisis. Ellos encontraron que al ser removida esta porción de la placa neural, ninguna de las dos estructuras se formaba completamente (fig. 5). Estos resultados aportaron evidencias experimentales de que la parte anterior de la placa neural está predeterminada a formar parte de la adenohipófisis antes del cierre el tubo neural (fig. 5).

Si bien hay autores que plantean un origen embrionario diferente para algunos tipos celulares adenohipofisarios, todos ellos parecen coincidir en el camino que siguen las células para la formación de la adenohipófisis y la secuencia de aparición de los diferentes linajes celulares, a partir de la formación de la bolsa de Rathke.

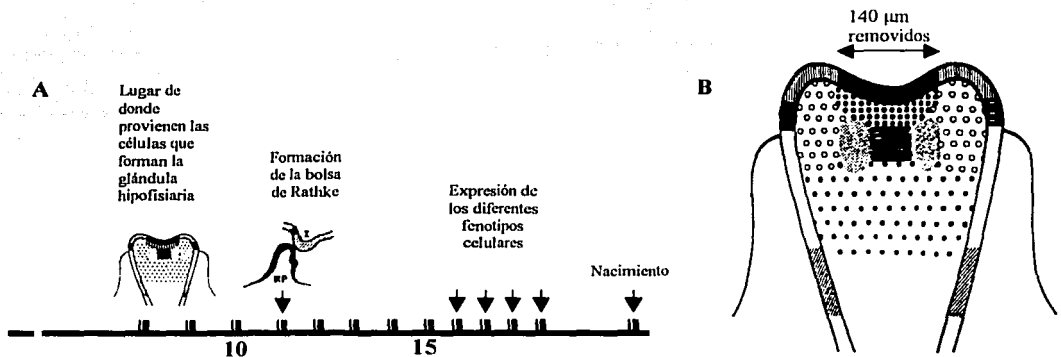


Fig. 5. Esquema que muestra: a) el tiempo y los pasos sugeridos para la formación de la glándula hipofisiaria en el embrión de rata. En este esquema se propone que el compromiso de las células a formar la glándula se produce muy temprano en el desarrollo, antes de la formación de la bolsa de Rathke; y b) Mapa del primordio neural de un embrión de pollo, (■) adenohipófisis; (□) hipotálamo; (■) neurohipófisis; (□) vesículas ópticas; (■) Telencéfalo; (■) diencefalo; (■) ectodermo de la cavidad nasal; (■) placa olfatoria; (■) crestas neurales mesencefálicas. Tomado de cita 10.

Varios autores (8, 11-14) han empleado la expresión de filamentos intermedios para apoyar el posible origen embriológico neural de algunas células incluyendo a las de la adenohipófisis. Los filamentos intermedios (FI) componen un sistema de filamentos intracelulares en las células de la mayoría de los vertebrados. Tienen un diámetro de 10 nm, intermedios entre los microfilamentos (7 nm) y los microtúbulos (25 nm), y actúan como parte del citoesqueleto para mantener la forma celular. Intervienen en el movimiento, posición del núcleo y los organelos, el contacto célula-célula y los procesos mitóticos. Además, se ha especulado que pueden estar involucrados en el transporte y exocitosis de los gránulos en las células secretoras. Según sus propiedades inmunológicas y bioquímicas es posible distinguir 5 subclases de filamentos intermedios, que provienen de la expresión de 5 familias de genes: keratinas que están presentes en las células epiteliales y forman un complejo grupo de polipéptidos relacionados y cuyo peso molecular varía de 40 a 70 kDa; vimentinas, de 57 kDa que se encuentran en el mesénquima (fibroblastos, endotelio, etc.); desmina, la cual existe en la mayoría de las células miogénicas y es una proteína ácida de 52 kDa. Las proteínas fibrilares glias (GFAP) de 51 kDa, son características de las células gliales y, finalmente los neurofilamentos que consisten en un triplete de polipéptidos de peso molecular de 60-70 (NF-L),

130-170 (NF-M) y 180-200 kDa (NF-H) y que se expresan mayoritariamente en las células neuronales.

Ogawa y colaboradores en 1990 (8), realizaron un estudio de la expresión de FI en las células hipofisiarias del humano. Para ello, los autores emplearon inmunocitoquímica con anticuerpos para queratina (marcador epitelial), vimentina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), desmina y las tres proteínas de neurofilamentos (marcador neuronal) y fijaron las glándulas con diferentes técnicas. Uno de los primeros resultados que obtuvieron fue que no con todas las técnicas de fijación es posible obtener un marcaje positivo para neurofilamentos, solamente en las glándulas fijadas con alcohol encontraron que las células endocrinas del lóbulo anterior de la hipófisis expresan tanto keratina como neurofilamentos de 68 kDa, 160 kDa y 200 kDa (NF68, NF160 y NF200). De igual forma, utilizando inmunocitoquímica, Tooze y colaboradores (11) mostraron que la línea celular AtT-20 secretora de ACTH, derivada de un tumor de murino, expresan los tres polipéptidos que conforman los neurofilamentos.

En cuanto al posible origen embrionario de la adenohipófisis las conclusiones basadas en la expresión de marcadores neuronales han sido contradictorias. Trojanowski y colaboradores (12) utilizando glándulas hipofisiarias de humano fijadas con una mezcla de cloruro de mercurio con formaldehído o una solución de Bouin (70% ácido picrico, 25% formaldehído y 5% ácido acético glacial) y realizando la inmunocitoquímica de neurofilamentos o proteína ácida fibrilar glial, encontraron que únicamente los axones del lóbulo posterior presentaban inmunoreacción de neurofilamentos, y que la GFAP solamente estaba presente en los cuerpos celulares de la neurohipófisis. Más recientemente, Halliday y colaboradores (13) también en adenohipófisis de humano fijadas con solución de Bouin emplearon la inmunotinción de vimentina, desmina, GFAP y NF200. Sus resultados indicaron que GFAP y NF200 solamente se encuentran presentes en los axones y procesos del lóbulo posterior, en tanto que la desmina se observó en las paredes de músculo liso de los vasos capilares, pero no en las células hipofisiarias y por último ninguna de las células fue positiva a vimentina. Finalmente, Bäck y colaboradores (14) describieron que en hipófisis de rata los neurofilamentos solamente están presentes en la neurohipófisis y en las fibras nerviosas que llegan hasta el lóbulo intermedio, pero no están presentes en las células de la adenohipófisis.

Estos resultados contradictorios pueden deberse a diferencias en las condiciones experimentales (fijación, bloqueo, etc.), en la sensibilidad de los ensayos empleados o en diversos factores no controlados en los estudios, como la especie (rata, humano, pollo, etc.) y la edad y el sexo de los animales. Dada la diversidad en los resultados obtenidos por diversos autores y la complejidad que envuelve la regulación de la glándula hipofisaria, este trabajo tuvo como objetivo inicial el de reexaminar la expresión de diferentes marcadores neuronales (NF68 kDa, NF200 kDa y MAP2) en células adenohipofisarias de rata.

Dado que, como mencione anteriormente algunos autores han planteado la posibilidad de que al menos algunas células de la adenohipófisis tengan un origen neuroectodérmico, la hipótesis de este trabajo es que al menos una subpoblación de células adenohipofisarias deberían expresar marcadores neuronales *in vivo* o bien en respuesta a factores tróficos presentes en la glándula.

Por lo anterior, los objetivos de este trabajo son:

- 1) Examinar la expresión de marcadores neuronales específicos (NF68 kDa, NF200 kDa y MAP2) en células adenohipofisarias provenientes de ratas neonatas, jóvenes (10, 20 y 45 días de edad) y adultas (2 meses de edad), observando si existen diferencias en la expresión.
- 2) Determinar si la expresión de marcadores neuronales esta regulada por las condiciones fisiológicas del animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo primario de células adenohipofisarias de rata

Todos los estudios con animales se realizaron bajo un protocolo institucionalmente aceptado similar a la Guía de USPHS para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Las ratas Wistar se mantuvieron en el bioterio del Instituto bajo un régimen de 12 horas luz-oscuridad y se alimentaron *ad libitum*. El día del experimento los animales fueron decapitados bajo anestesia con éter y las glándulas hipofisarias de ratas hembras y macho de diferentes edades y condiciones experimentales, se disecaron bajo condiciones asépticas. Las células obtenidas de cada animal se sembraron separadamente. Las ratas hembras adultas se utilizaron indistintamente de la fase del ciclo estral.

Después de la disección, las glándulas se transfirieron a DMEM frío (Dulbecco's Modified Eagle Media, GIBCO BRL; Rockville MD) complementado con 0.75 mg/ml de albúmina sérica bovina (DMEM-BSA; BSA fracción V, GIBCO BRL). El lóbulo anterior se separó del posterior y del intermedio (neuro-intermedio) bajo un microscopio estereoscópico y se cortó en pedazos. Los pedazos de adenohipófisis (sin *pars intermedia*) se digirieron por incubación con 2.5 mg/ml de tripsina (Worthington Biochem Co.; Lakewood NJ) y 0.1 mg/ml de colagenasa tipo I (Worthington) durante 25 min a 37 °C. Los fragmentos del tejido fueron suavemente triturados con una pipeta Pasteur siliconizada y pulida al fuego. Las células se lavaron dos veces con DMEM-BSA y se centrifugaron por 10 min a 1200 rpm. El botón resultante de la centrifugación se resuspendió en medio DMEM-cultivo (DMEM complementado con 10% de suero de caballo GIBCO BRL, 2% suero fetal bovino GIBCO BRL, 10,000U penicilina GIBCO BRL, 10,000 mg/ml estreptomina GIBCO BRL y 5 mg/ml de insulina Sigma). La concentración de estradiol en el suero de caballo y fetal bovino es de aproximadamente 6.8×10^{-11} M (Perfil Bioquímico, GIBCO BRL; México) la cual da una concentración final en el medio de cultivo de 8.0×10^{-12} M. A este respecto cabe mencionar que Amara y Daniels en 1983 (15) reportaron que la concentración efectiva para producir cambios en el crecimiento, proliferación y secreción al menos de lactotropos y somatotropos es de aproximadamente 5×10^{-11} M. Ambos sueros fueron inactivados a 60 °C por 1 hora. Este

procedimiento no disminuye la concentración de estrógenos en el suero, pero produce una disminución en el efecto de los esteroides en el cultivo, debido a que inactiva factores sensibles al calor que son necesarios para su función (15). Por último, para disminuir la cantidad de fibroblastos y otras células contaminantes que se adhieren al plástico, antes de sembrarlas en los pozos donde se mantendrían en cultivo las células se dejaron durante 45 min en cajas Petri de plástico estéril. Al término de este tiempo se recolectaron las células que permanecieron sin adherirse y que principalmente son células adenohipofisarias.

Las células adenohipofisarias disociadas se sembraron a una densidad de 5×10^4 en cubreobjetos de vidrio redondo del número 1 (Thomas Scientific; Swedesboro NJ) previamente tratados con 100 $\mu\text{g/ml}$ poly-L-lisina (Sigma) y colocados en una caja de cultivo de 12 pozos (Costar; Cambridge MA). Después de 30 min se agregó 1 ml de medio de cultivo y las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humedecida y con 95% de aire y 5% CO_2 . Rutinariamente, el medio se cambió tres veces por semana. A pesar de que las células se pueden mantener saludables por 3 semanas en cultivo, todos los resultados que presentamos aquí se llevaron a cabo con cultivos de 24-36 h.

Cultivo de células adenohipofisarias con suplemento de estrógenos

Una vez obtenido el cultivo de células adenohipofisarias de ratas hembras de 60 días de edad, al medio de cultivo se le adicionó 200 nM de 17β -estradiol durante 6 días consecutivos.

Cultivo de neuronas simpáticas de rata

El cultivo de neuronas de ganglio cervical superior se utilizó como un control positivo para la expresión de neurofilamentos y MAP2 y se llevó a cabo mediante el procedimiento reportado en Hernández-Cruz y colaboradores (1997). Brevemente, los ganglios de ratas de 10 días de edad se obtuvieron en condiciones asépticas bajo anestesia de éter y luego de una dislocación cervical. Después de retirar el tejido circundante y cortar los ganglios, los pedazos se incubaron durante 30 min a 37 °C en medio libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ con 1 mg/ml de tripsina (Worthington) y 2 mg/ml de DNAsa tipo I. La digestión de la tripsina se inactivó diluyéndola en

DMEM con 10% suero fetal bovino (SFB) y 1 mg/ml de inhibidor de tripsina (Sigma). Posteriormente el tejido se incubó con 2 mg/ml de colagenasa y 2 mg/ml de DNAsa durante 30 min a 37 °C. Después de la trituración con una pipeta Pasteur, la suspensión de células se centrifugó, se lavó dos veces y se resuspendió en medio de cultivo. Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio redondos del número 1 previamente recubiertos con poly-L-lisina (1 x 10⁵ células en cada pozo), y se mantuvieron en medio de cultivo complementado con 30 ng/ml de 7S NGF a 37 °C en una atmósfera humedecida y con 95% aire y 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió tres veces por semana. La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo con cultivos de menos de 5 días *in vitro*.

Cultivo de Células de Ovario de Hámster Chino (CHO)

Dado que las células CHO no expresan neurofilamentos estas células se emplearon como control negativo y se cultivaron en α -MEM (pH 7.4) complementado con 10% de SFB en presencia de penicilina y estreptomycin a 37 °C en una atmósfera humedecida y con 95% aire con 5% de CO₂ en platos de cultivo de 100 mm. Cuando las células estuvieron confluentes, la monocapa se incubó con tripsina-EDTA (GIBCO) por 1 min y las células re-suspendidas en α -MEM con 10% de SFB se sembraron a una dilución de 1/10 en nuevos cubreobjetos de vidrio. El medio fue cambiado cada 2 días.

Determinación de la fase del ciclo estral

El ciclo estral en la rata se divide en 4 fases: proestro, estro, metaestro (diestro1) y diestro. Los cambios asociados al ciclo permiten reconocer cada una de las etapas de una manera sencilla, por ejemplo a través de un frotis vaginal (tabla 2; fig. 21).

Fase del ciclo estral	Cambios en los ovarios	Tipos de células en los frotis vaginales	Concentración plasmática de estradiol (ng/ml) Inicio-final
Proestro	Rápido crecimiento folicular	Células epiteliales nucleadas	4.47 - 0.64
Estro	Ovulación y Copulación	Cornificadas	0.93 - menor a 0.4
Metaestro (diestro 1)	Formación de Cuerpos luteos	Cornificadas y leucocitos	0.5 - 0.8
Diestro	Cuerpos luteos formados	Leucocitos y células epiteliales nucleadas	1.49 - 3.68

Tabla 2. Cambios en los ovarios e histología vaginal durante el ciclo estral en ratas. Los datos de concentración plasmática de estradiol se tomaron de Yoshinaga y col. 1969.

Justo antes de la decapitación bajo anestesia con éter, en la mañana del experimento, la fase del ciclo estral fue determinada en ratas ciclantes mediante la examinación microscópica de un frotis vaginal (tabla 2).

Gonadectomía

Con el fin de eliminar la principal fuente de estrógenos en la circulación, en el caso de las hembras y el posible efecto inhibitorio de la testosterona en los machos, un grupo de 90 ratas hembras y machos de 60 días de edad fueron gonadectomizadas bilateralmente. El procedimiento quirúrgico se realizó bajo condiciones asépticas y anestesia general con pentobarbital (20 mg/kg intraperitoneal). La operación control se realizó exponiendo las gónadas sin su extirpación. Después de la recuperación de la anestesia en jaulas que se mantuvieron calientes con un foco de 60W, los animales se trataron durante cinco días con 0.01 mg/kg de una solución 10% de Fluorfenicol (Nuflor, Shering Plough; Kenilworth, NJ) y se examinaron periódicamente para detectar una posible infección. Las ratas fueron mantenidas bajo un régimen de 12 horas luz-oscuridad y alimentadas *ad libitum*. Después de 15 días de pasada la operación, las ratas se sacrificaron y los cultivos de células adenohipofisarias se prepararon como se explicó previamente.

Terapia de sustitución de estrógenos

El tratamiento de estrógenos se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Friend y col. (1997). El compuesto 17 β -estradiol; 1, 3, 5 (10)-estratriene 3,17 b-diol (Sigma), se diluyó en aceite de ajonjolí (0.2 mg/ml) y fue administrado subcutáneamente, diariamente por la mañana durante cuatro días consecutivos a un grupo de 8 ratas con 15 días posteriores a la gonadectomía (20 mg/100 g de peso; aproximadamente 0.2 ml de aceite de ajonjolí inyectado por rata). Para el experimento control, se inyectaron 6 ratas gonadectomizadas con la misma cantidad de aceite.

Al término del tratamiento, las ratas se sacrificaron y los cultivos de células adenohipofisarias se prepararon como se explicó previamente.

Tratamiento anti-estrogénico

La administración de tamoxifen bloquea competitivamente la unión del estradiol a sus receptores por lo que se empleó este antiestrogénico como lo reportan Donath y Nishino (1998); 1 mg de tamoxifen se disolvió en 25 ml de agua y se administró diariamente durante 15 días a 4 ratas hembras de 60 días de edad. Para el experimento control, a 3 ratas hembras se les dio a beber la misma cantidad de agua. No se permitió que las ratas bebieran más agua durante el periodo de tratamiento con tamoxifén. Después de los 15 días, las ratas fueron sacrificadas y los cultivos de las células adenohipofisarias se prepararon como se explicó previamente.

Inmunofluorescencia

a) Inmunocitoquímica de marcadores neuronales específicos y cuantificación de inmunoreactividad

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-neurofilamento de 68 kDa de rata (IgG monoclonal anti-NF68; clon NR4, DAKO; Carpintería CA), anti-neurofilamento de 200 kDa de rata (IgG monoclonal anti-NF200; RMO-24, Zymed Laboratories Inc.; San Francisco CA) anti-proteína asociada a microtúbulos de rata (anti-MAP-2; clon HM-4, Sigma Immuno Chemicals).

El anticuerpo secundario utilizado para observar la expresión de los marcadores neuronales fue anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC; Zymed).

Los cubreobjetos de vidrio conteniendo el cultivo de células adenohipofisarias a procesar se lavaron dos veces con buffer de fosfatos 0.01M (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 30 min a temperatura ambiente. Después de ser lavados con PBS se incubaron con una solución de bloqueo y permeabilización (0.2% BSA (w/v) y 0.1% (v/v) Triton X 100 en PBS) por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los cultivos se lavaron y se incubaron con uno de los anticuerpos monoclonales primarios (anti-NF68, anti-NF200 o anti-MAP-2; dilución 1:100) durante toda la noche a 4 °C en una cámara húmeda, después de lo cual, los cultivos se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con TRITC (1:80) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, después de lavados con PBS, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de vidrio con medio de montar para fluorescencia DAKO que contiene 15 mM de NaN₃. Los controles negativos fueron preparados reaccionando los cultivos con: 1) únicamente el anticuerpo primario, 2) exclusivamente el anticuerpo secundario. Como se esperaba, estos cultivos no mostraron fluorescencia por arriba de la fluorescencia basal (auto fluorescencia) determinada al observar un cubreobjetos con células adenohipofisarias sin haber sido expuestas al tratamiento para inmunofluorescencia.

Los cultivos se revisaron con microscopía de epifluorescencia (filtro de excitación: 510-560 nm, espejo dicróico 580 nm y filtro barrera: 590 nm). La iluminación se consiguió mediante una lámpara de mercurio de 100W montada en un microscopio invertido Nikon Diaphot, TMD (Nikon Corp.; Tokyo Japan), utilizando un objetivo 60X de inmersión en aceite (Plan Apo, NA 1.4; Nikon). Las imágenes se adquirieron con un cámara digital CCD enfriada de alta sensibilidad y linealidad (resolución de 16 bits; MCD1000; SpectraSource Instruments; Westlake Village CA). La iluminación se limitó al tiempo de exposición por medio de un obturador electrónico uniblite controlado por la computadora (Lambda 10, Sutter Instruments, Axon Ins.; Union City CA). Para establecer el rango apropiado de exposición, y determinar las intensidades de fluorescencia mínima y máxima, se midieron las intensidades de fluorescencia de células CHO, que no expresan los marcadores neuronales y de neuronas simpáticas que presentan una

abundante expresión de los mismos (controles negativos y positivos, respectivamente). La mejor exposición que se encontró para el rango de intensidades de fluorescencia de las muestras fue de 0.25 s. Las imágenes FITS sin comprimir se convirtieron a imágenes de formato TIFF (8 bits) y se guardaron para analizarlas posteriormente con el programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Version 2.0; Silver Spring MD). Se determinó un área de interés, utilizando en todos los casos un círculo pequeño (5 micras de diámetro) del cual se obtuvo la fluorescencia promedio. Las medidas de intensidad de fluorescencia fueron obtenidas poniendo este círculo en una región del citoplasma (zona no nuclear) de cada una de las células adenohipofisarias del campo, las cuales se distinguieron fácilmente de los fibroblastos y otras células contaminantes, así como en 3 áreas libres de células del cubreobjetos (fluorescencia de fondo). La fluorescencia de fondo de cada campo se substrajo de las intensidades de fluorescencia de todas las células medidas del mismo campo, dando una fluorescencia corregida para cada célula (fluorescencia específica). De todas las células de hasta 100 campos en al menos tres cultivos independientes de cada grupo experimental, se tomaron y procesaron las imágenes con un programa estadístico (ver más adelante), y los resultados se graficaron con el programa Origin 3.8 (Microcal; Northampton MA). La composición de imágenes se realizó con Microsoft PowerPoint (Microsoft Co.; Redmond WA).

Cada condición experimental se repitió por lo menos tres veces, y para el análisis se agruparon los datos resultado de la misma condición experimental en cultivos diferentes, para los cuales se reportan la media, el error estándar (ES) y la cantidad de células analizadas (n). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Stat view 4.57 (Abacus Concepts; Berkeley CA), con el cual se efectuó el análisis de varianza factorial (ANOVA-factorial) con un intervalo de confianza de 95% según la prueba de PLSD de Fisher. Esta estadística no se reporta en esta tesis, dado que la distribución de fluorescencia específica en los cultivos de células adenohipofisarias resultó tener una distribución de Poisson más que una distribución normal. Por esta razón, se realizó un análisis estadístico no paramétrico (Kolmogorov-Smirnov), más apropiado para las poblaciones con distribución de Poisson. El resultado de este análisis con un intervalo de 99% de confianza es el que se reporta en este trabajo.

b) Inmunotinción de rebanadas de hipófisis.

Las hipófisis de ratas hembras sexualmente maduras fueron fijadas por 72 h en 10% de solución de formol (10% formol neutro), después de lavarse toda la noche, el tejido se deshidrató en etanol graduado, y se embebió en parafina como lo descrito por Salinas y Quintanar (2000). Se cortaron secciones de 5 μ m y se montaron en porta objetos de vidrio; la parafina se retiró y las rodajas se rehidrataron. Para la inmunotinción, se utilizó el mismo protocolo que el empleado para las células en cultivo, con pequeñas modificaciones: la concentración de Tritón X 100 en la solución de bloqueo y permealización se aumentó de 0.1 a 1% (v/v), y se hicieron todas las incubaciones de los anticuerpos en esta solución de BSA-Tritón.

c) Identificación de células adenohipofisarias que expresan marcadores neuronales mediante doble inmunotinción.

Para determinar la identidad de las células hipofisarias que expresan marcadores neuronales se empleó la doble inmunotinción, utilizando anticuerpos contra las hormonas que secreta cada tipo celular. Los anticuerpos primarios utilizados para reconocer las hormonas adenohipofisarias fueron: anti- β FSH, anti-PRL y anti- β TSH todos de conejo (amablemente proporcionados por el Dr. A.F. Parlow del Programa Nacional de Hormonas Pituitarias del NIH-NHIDDK), así como anticuerpos policlonales de conejo anti- β LH y anti-GH (Biogenesis Lab; Poole, UK). Como anticuerpo secundario para detectar las hormonas se empleó anti IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La detección de los neurofilamentos se llevó a cabo con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con cianina 5 (Cy5; Zymed) en lugar del conjugado con TRITC. Esto se hizo con el fin de obtener una separación suficiente de los dos espectros de excitación y de emisión y con ello minimizar el cruce de fluorescencia entre los dos fotomultiplicadores del microscopio confocal (ver más adelante).

Una vez fijadas y permeabilizadas, las células se incubaron toda la noche a 4 °C con uno de los anticuerpos primarios anti-hormona y, después de varios lavados con PBS, se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con FITC (1:100). Después de tres lavados, las células se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con el

fragmento $F(ab')_2$ de anti IgG de conejo (1:20; $F(ab')_2$ anti-conejo IgG (H+L) purificado de cobayo, Cedarlane Lab; Ontario, Canada). Este procedimiento bloquea sitios de unión libres en el complejo del anticuerpo primario-hormona adenohipofisiaria. Así, se previno la unión no específica tanto del anticuerpo primario anti-NF68 como del anticuerpo secundario (fig. 6; ver cita 21). Después de tres lavados, las células se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas con el anticuerpo monoclonal anti-NF68, y entonces, por dos horas adicionales con el segundo anticuerpo secundario (1:100, anti-ratón conjugado con Cy5). Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio con medio de montar DAKO.

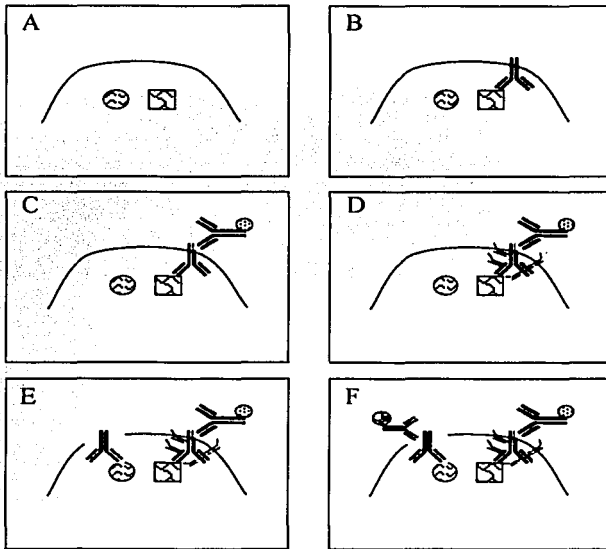


Fig. 6. Representación esquemática del protocolo de doble inmunotinción. A) los dos sitios antigénicos de interés. B) El anticuerpo primario que se une al antígeno X. C) anticuerpo secundario conjugado a FITC, que se une al anticuerpo primario del antígeno x. D) Paso de bloqueo: el fragmento $F(ab')_2$ bloquea cualquier sitio del anticuerpo primario en el cual se pueda unir un secundario. E y F) el proceso de doble inmunotinción se completa al incubar las muestras con el anticuerpo primario para el antígeno Y y su correspondiente secundario marcado con Cy5 (Tomado de cita 21).

- ☒ Antígeno X (neurofilamentos)
- ⊙ Antígeno Y (hormona adenohipofisiaria)
- Y Anticuerpo primario anti-hormona (hecho en conejo)
- Y Anticuerpo primario anti-neurofilamentos (hecho en ratón)
- Y fragmento de anti-conejo $F(ab')_2$
- Y Anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC
- Y Anticuerpo primario anti-ratón conjugado con Cy5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fue necesario realizar varios controles negativos para lograr dobles inmunotinciones confiables. El control negativo de los anticuerpos primarios se realizó de 2 formas: la primera, incubando por 2 h un anticuerpo primario anti-hormona en presencia de un exceso de su hormona específica (100 µg/ml; proporcionadas por el Dr. A. F. Parlow del Programa Nacional de Hormonas Pituitarias del NIH-NHIDDK), y posteriormente reaccionando el anticuerpo pre-incubado y el secundario correspondiente con los cultivos. La segunda, adicionando únicamente el anticuerpo primario al cultivo. En ninguno de los casos descritos se detectó inmunoreactividad. El control negativo para los anticuerpos secundarios se realizó de diferentes formas: 1) adicionando únicamente cada uno de los anticuerpos secundarios a las muestras, 2) incubando los cultivos con el anticuerpo primario para una hormona dada (anti-hormona hecho en conejo) en la presencia del fragmento anti-conejo F(ab')₂ y entonces reaccionando con el anticuerpo secundario no correspondiente es decir contra el anti- marcadores neuronales (anti-ratón conjugado con Cy5). Este procedimiento no dio ninguna señal de Cy5. En este mismo sentido se incubaron las muestras con el anticuerpo primario (IgG de conejo), específico para una hormona dada, el anticuerpo secundario correspondiente (anti-conejo conjugado a FITC) y el fragmento de anti-conejo F(ab')₂. Finalmente, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario específico para el marcador neuronal sólo (anti-ratón conjugado con Cy5), este control resultó negativo para la fluorescencia de Cy5.

Un día después de la tinción, todas las imágenes correspondientes a las muestras de un mismo experimento fueron adquiridas con un microscopio confocal de barrido láser (Bio-Rad MRC 1024; Hercules CA), equipado con un láser de kriptón/argón (Kr/Ar). El microscopio confocal utilizado se encontraba montado en un microscopio invertido Nikon (Diaphot 300; Nikon), para las observaciones se empleó un objetivo de inmersión en aceite (60X, 1.4 NA, Plan Apo; Nikon). Los parámetros de excitación y emisión se emplearon de la siguiente manera: excitación 488 nm, emisión 522 nm / DF32, para las imágenes de la tinción con FITC y excitación 647 nm, emisión 680 nm / DF32, para las imágenes de la tinción de Cy5. La apertura del iris, ganancia y potencia del láser permanecieron fijos para el mismo cultivo, siendo de 2.5 a 2.7, 98 a 1500 y 1 a 3%, respectivamente. Las imágenes con luz de excitación a 488 y 647 nm se tomaron separadamente o concurrentemente con la ayuda del programa Lasersharp 1.02 (Bio-

Rad). El análisis y procesamiento se llevó a cabo con el programa Confocal Assistant 4.02 escrito por Todd Clark Breile.

Para cada experimento se tomaron y analizaron aproximadamente 9000 células en 4-5 cubreobjetos, enumerando en cada uno de ellos las células no marcadas, las positivas a NF68, las positivas a la hormona adenohipofisiaria y las dobles positivas (hormona y NF68). Los resultados que se reportan se expresaron como el porcentaje de células doble positivas para NF68 y hormona del total de células identificadas como positivas para una hormona adenohipofisiaria dada. Este porcentaje se determinó dividiendo las células inmunopositivas para NF68 y una hormona adenohipofisiaria entre el número total de células que expresaron la misma hormona hipofisiaria.

Western blot

Los experimentos de Western Blot se realizaron en el laboratorio del Dr. Alejandro Zentella en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, para corroborar los resultados obtenidos con otras técnicas y observar si existía alguna diferencia entre los neurofilamentos de las células adenohipofisiarias y las células de ganglio simpático, esta técnica se empleo dado que permite medir la proteína total de neurofilamentos en la glándula y el ganglio. Las adenohipófisis (sin *pars intermedia*) de ratas hembras de 60 días de edad en diferentes fase del ciclo estral (proestro, estro y diestro), de ratas macho de 60 días y de ratas con 7 días posparto, fueron disectadas y lavadas en PBS frío, los pedazos de tejido fueron homogeneizados en una solución de Tris HCL 50 mM y 0.5% de tritón X100 con inhibidores de enzimas (leuopectina 10 µg/ml, aprotina 1.5 µg/ml y fenil-metil-sulfonil-floride, PMSF 1 mM). La cantidad de proteína en las muestras se cuantificó utilizando el método Bradford.

Una vez obtenida la cantidad de proteína por muestra y con el fin de separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular se utilizaron geles de 0.7 o 1.5 mm de grosor, con una concentración de acrilamida/bisacrilamida al 4% en el concentrador y al 8% en la parte resolvidora (concentración óptima para la separación de los pesos moleculares de neurofilamentos, definida experimentalmente una vez que se probaron geles de 6, 7 y 7.5%).

Después de realizar varias pruebas de expresión y detección para los western blots se determinó utilizar la cantidad de 300 μg de proteína total para las muestras de adenohipófisis y 40 μg de proteína total para las de ganglio simpático (control positivo).

Para realizar la electroforesis, la cantidad de homogenado correspondiente a 300 y 40 μg de proteína total y el marcador de peso molecular se mezclaron con una solución de β -mercapto etanol y azul de bromofenol, posteriormente estas muestras se calentaron por 10 minutos y se colocaron en cada uno de los pozos del gel. Los geles se corrieron durante 2 horas a 20 V y por 6 horas a 40 V, una vez terminado este proceso, los geles fueron electro transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Osmonics; Westborough MA) durante toda la noche a 25 V con corriente constante, esta membrana posteriormente fue inmunoteñida.

Para la inmunotinción de las membranas de nitrocelulosa, primero se bloqueo durante 1 h con una solución de bloqueo (leche al 5% en Buffer TBS-Tween; Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 7.5, 1% tween), posteriormente se enjuagaron y se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo primario anti-NF68 o anti-NF200 (1:100) diluido en TBS-tween-albúmina 1%, después de la incubación se realizaron 5 lavados con la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:10000) diluido en TBS-tween-albúmina 1%. Después de lavar con la solución de bloqueo y una vez enjuagada la membrana con TBS, se incubó durante 10 minutos con una solución de revelado quimioluminiscente (Bio-Rad) y finalmente la membrana se expuso por diferentes tiempos a una placa fotográfica (Kodax X-omat) que se reveló.

Con el fin de observar el total de proteína de los geles SDS-page que no se electro transfirieron y de corroborar la completa transferencia a las membranas de nitrocelulosa, los geles fueron fijados por 5 min con una solución de 40% metanol y 10% ácido acético y después teñidos con Coomassi azul durante toda la noche, para posteriormente ser lavados con una solución de 5% metanol 7% ácido acético.

RESULTADOS

Empezamos nuestro estudio examinando la inmunofluorescencia específica de los neurofilamentos de 68 kDa (NF68) en cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata hembra adulta (60 días de edad). La microscopía de fluorescencia mostró que la fluorescencia de estas células tenía un continuo de intensidades, mismos que decidimos dividir en tres grupos de la siguiente manera: el primer grupo está compuesto de células con una fluorescencia muy baja (menos de 25 unidades arbitrarias; u.a.). Dado que este nivel de fluorescencia es similar al observado en los controles negativos (células CHO que fueron procesadas al mismo tiempo, ver figura 7 y el histograma de distribución en la figura 8), estas células fueron clasificadas como sin expresión (SE). Un segundo grupo de células, que mostró baja inmunoreactividad para NF68 (25-100 u.a.) fue clasificado como células con bajo nivel de expresión (BE). Finalmente, el tercer grupo, mostró una fuerte expresión de NF68 (100-250 u.a.). Dado que este nivel es similar al observado en los controles positivos (neuronas de ganglio simpático, ver figura 7 y el histograma de distribución de la figura 8) les denominamos células de alta expresión (AE). En la figura 7 se muestra un ejemplo representativo de los diferentes niveles de expresión de NF68 encontrado en células pertenecientes a los tres grupos.

Las células positivas a NF68 mantienen su forma redonda o poligonal y la morfología típica de células endocrinas es decir, no pudieron ser distinguidas morfológicamente de las células que no expresan neurofilamentos. En la figura 8 se muestra el histograma de distribución de la fluorescencia específica medida en 2637 células adenohipofisarias de tres cultivos independientes. El 51.3% de las células perteneció al grupo SE, el 36.8% al BE y el 10.1% al AE. Cuando se efectuó la inmunotinción de cultivos adenohipofisarios para otros marcadores neuronales como NF200 y MAP-2, el patrón de inmunofluorescencia obtenido fue similar al de NF68 (fig. 9) y de igual manera se encontraron células con los tres niveles de expresión (SE, BE y AE). Estos resultados sugieren que la subpoblación de células adenohipofisarias que expresa NF68 podría estar expresando otros marcadores neuronales específicos (20, 22). Sin embargo, para poder afirmar que la misma subpoblación expresa los tres marcadores, se requerirían estudios de inmunomarcaje múltiple. Para evitar redundancia, los resultados que se muestran aquí se refieren exclusivamente a lo obtenido para los neurofilamentos de 68 kDa.

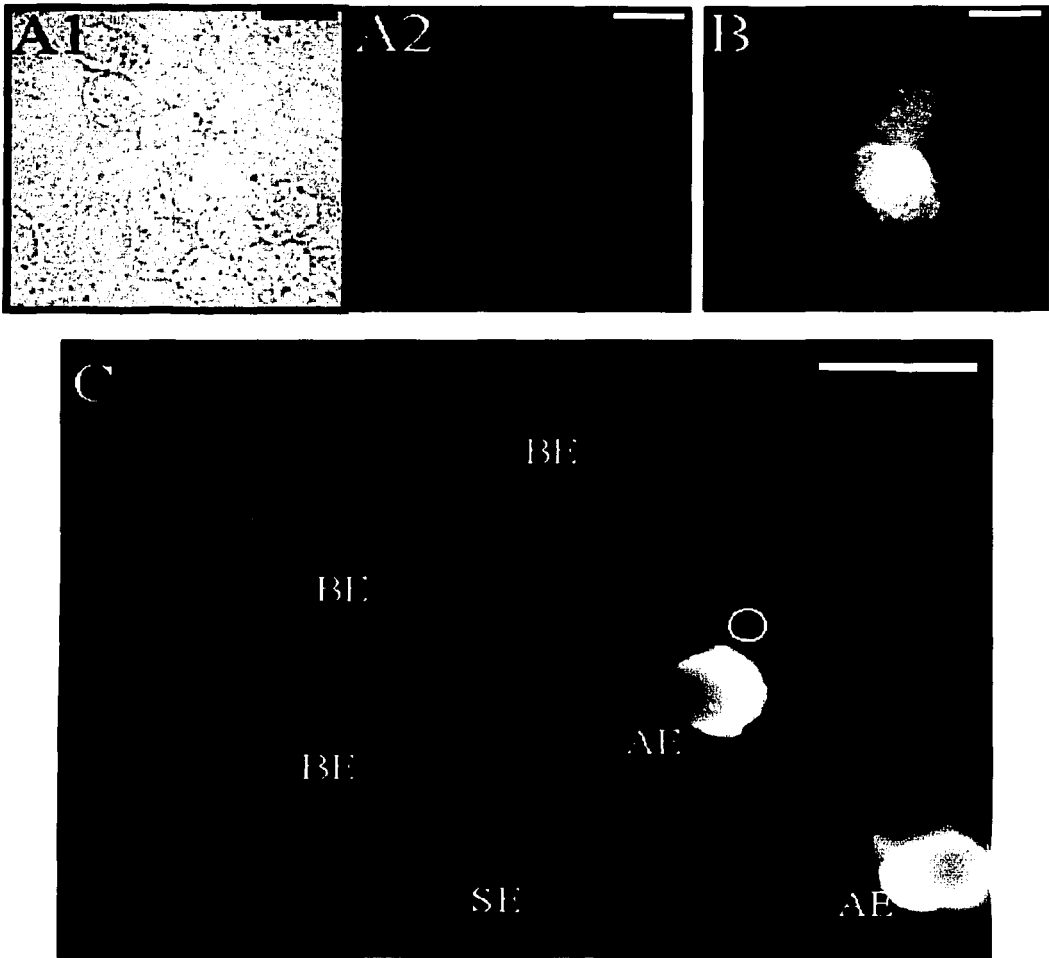


Fig. 7. Determinación de la expresión de neurofilamentos de 68 kDa (NF68) empleando microscopía de fluorescencia digital. **A:** Inmunofluorescencia de NF68 en células CHO, utilizadas como control negativo. **A1:** micrografía de contraste de fase **A2:** imagen de epifluorescencia del mismo campo, mostrando la nula inmunoreactividad de las células CHO. **B:** imagen de epifluorescencia de un cultivo de neuronas de ganglio simpático de rata, utilizadas como controles positivos. **C:** inmunotinción de NF68 en células adenohipofisarias en cultivo. Las células se obtuvieron de ratas hembras de 60 días de edad. La figura ilustra ejemplos de células sin expresión de NF (SE), con baja expresión (BE) y de alta expresión (AE; para las definiciones, ver el texto). El círculo blanco (5.0 μm de diámetro) ilustra el área de interés de la cual se tomó la fluorescencia promedio. El tiempo de exposición es el mismo para todas las imágenes (250 ms). Las barras horizontales en cada panel representan 20 μm .

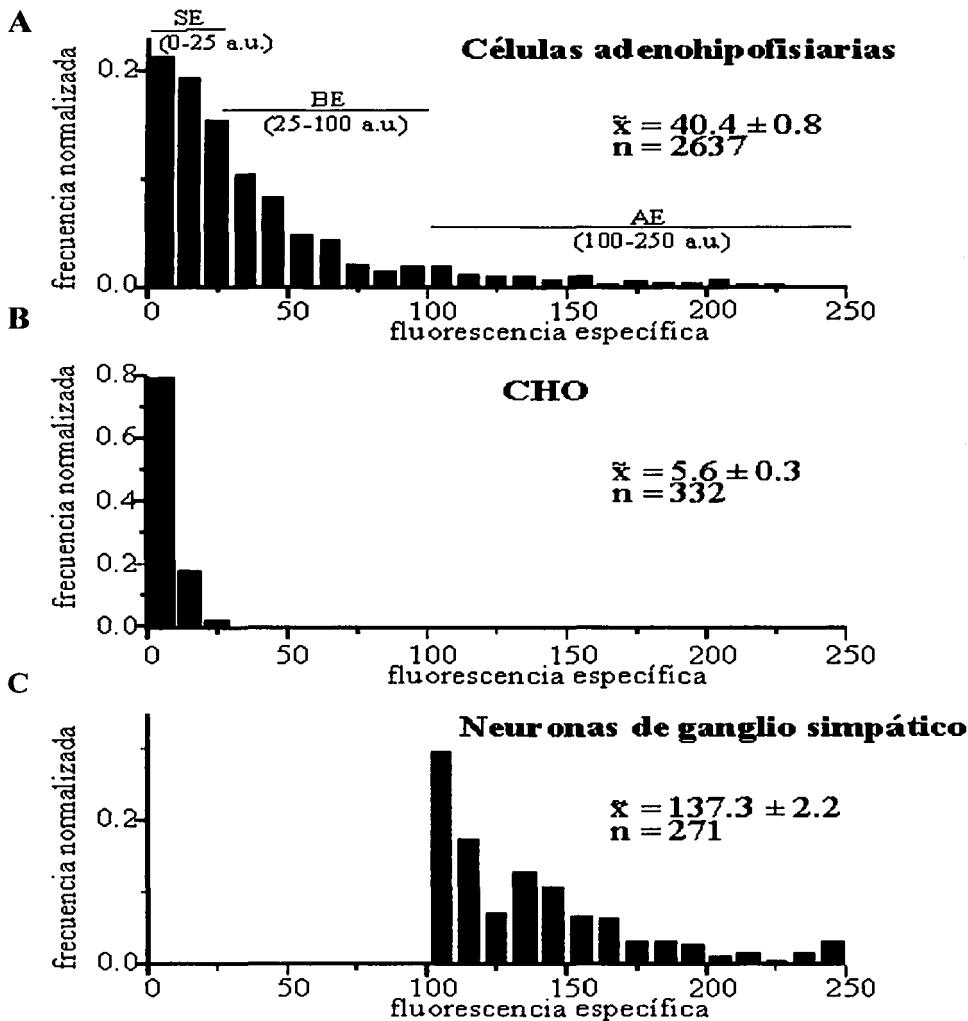


Fig. 8. Histograma de frecuencia que muestra la distribución de las intensidades de inmunofluorescencia específica de NF68. Los datos resultaron de la agrupación de tres cultivos independientes para cada condición. **A:** Distribución normalizada de la intensidad de fluorescencia de células adenohipofisiarias de rata hembra de 60 días de edad. **B:** Distribución normalizada de la fluorescencia de células CHO. **C:** Distribución normalizada de la fluorescencia de neuronas de ganglio simpático en cultivo. En cada panel se indica la fluorescencia específica media, error estándar y el número de células examinadas. Se indican también en la figura 3A los rangos que comprende cada categoría de fluorescencia: células sin expresión (SE), de baja expresión (BE) y de alta expresión (AE).

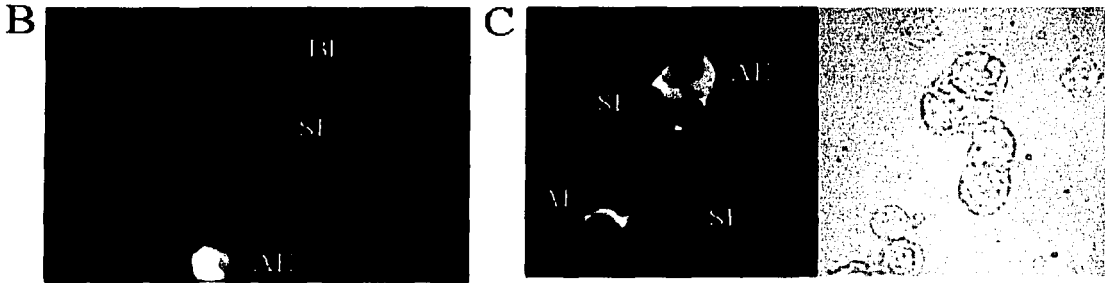
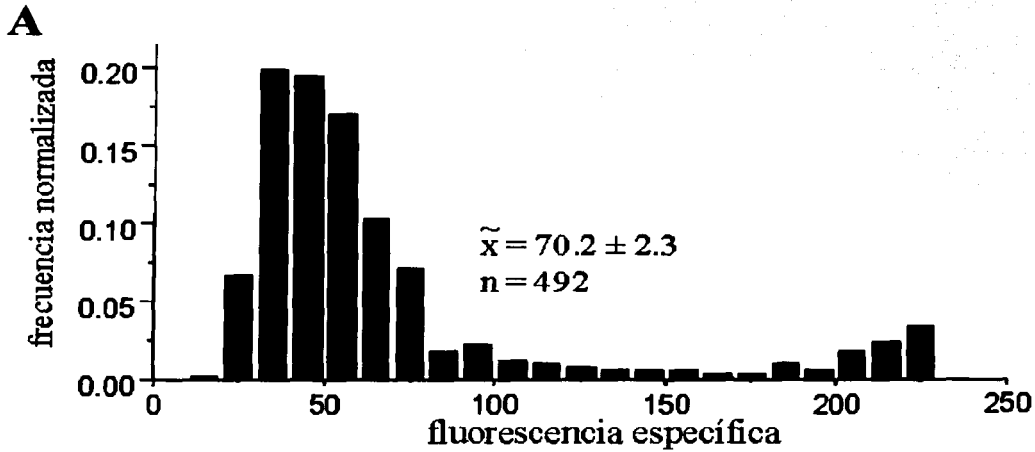


Fig. 9. Determinación de la expresión de neurofilamentos de 200 kDa (NF200) y MAP-2 empleando microscopía de fluorescencia digital. **A:** Distribución normalizada de la intensidad de fluorescencia de NF200 en células adenohipofisarias de rata hembra de 60 días de edad, se muestra la fluorescencia específica media, error estándar y el número de células examinadas. **B:** inmunotinción de NF200 en células adenohipofisarias en cultivo. **C:** inmunotinción de MAP-2 en células adenohipofisarias en cultivo. Para A, B y C, las células se obtuvieron de ratas hembras de 60 días de edad. Las figuras B y C ilustran ejemplos de células sin expresión (SE), con baja expresión (BE) y con alta expresión (AE; para las definiciones, ver el texto).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aunque estudios previos han demostrado que las células adenohipofisarias en cultivo mantienen su diferenciación funcional por semanas y aun hasta meses (23), se podría pensar que la síntesis de marcadores neuronales en las células adenohipofisarias es el reflejo de una condición anómala producida por la disociación del tejido o las condiciones de cultivo. A este respecto, cabe mencionar que se ha reportado que células como las cromafines, que no expresan neurofilamentos *in situ* lo hacen bajo condiciones de cultivo (23-25). Para eliminar esta posibilidad se efectuó la inmunotinción de NF68 en cortes hipofisarios de 5 μm de grosor (ver los métodos). Como se muestra en la figura 10, la microscopía de fluorescencia mostró la presencia de células positivas y negativas a NF68 en el lóbulo anterior de la glándula. En los cortes de tejido la intensidad de la inmunofluorescencia de NF68 es más difícil de cuantificar que en células en cultivo, debido al seccionamiento parcial de las células y de la variación en la fluorescencia por las diferencias en el plano focal. Sin embargo, como se muestra en la figura 10 se pudo comprobar que en el lóbulo anterior de la hipófisis se distingue claramente una población de células que expresa NF68 y otra que no lo hace. Además, se puede observar que la distribución de las células que expresan NF68 en la glándula es heterogénea (comparar la figura 10C, 10D y 10E). En tres de siete glándulas procesadas y cortadas para inmunofluorescencia, las células positivas a NF68 se encontraron concentradas en zonas bien definidas de la adenohipófisis. El diagrama de la figura 10 muestra la posición de una de estas zonas y la micrografía de la figura 10 muestra detalles de esta área.



Fig. 10. Inmunofluorescencia de NF68 en rebanadas de 5 μm de grosor de adenohipófisis de rata hembra de 60 días de edad. **A:** Imagen compuesta de las imágenes de contraste de fase obtenidas a baja amplificación (10x). **B:** Imágenes de fluorescencia de los mismos campos que en A. Nótese la distribución heterogénea de las células positivas y negativas a NF68 en la glándula. **C:** Detalle de una región de la glándula con pocas células positivas a NF68. **D:** Detalle de una región de la glándula con moderada abundancia de células positivas a NF68. **E:** Detalle de una región de la glándula con numerosas células positivas a NF68. El diagrama en la parte superior izquierda ilustra el contorno de la posición en la glándula del área que se muestra en A y B. **a:** adenohipófisis; **n:** neurohipófisis. La exposición de la cámara fue de 250 ms para **B, C, D** y **E**, y de 100 ms para **A**. En **A** y **B** la barra representa 200 μm . En **C, D**, y **E** la barra representa 50 μm .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La conclusión de estas observaciones es que, tanto *in situ* como *in vitro*, existe una subpoblación de células adenohipofisarias que expresan marcadores neuronales y que su expresión no es producto del tratamiento de disociación celular o de las condiciones de cultivo.

Las células adenohipofisarias que son positivas a NF68, podrían representar una población de células inmaduras que conservan rasgos de un posible origen neuroectodérmico. Si este fuera el caso, esta característica debería expresarse con mayor frecuencia en estadios más tempranos del desarrollo ontogénico. Para explorar esta posibilidad, se llevó a cabo la inmunotinción de los marcadores neuronales en cultivos primarios de células adenohipofisarias tanto de ratas hembras recién nacidas, como de ratas con 10, 20 y 45 días de edad. Los resultados de estos experimentos se resumen en la tabla 3 y en la figura 11.

En ratas recién nacidas la expresión de NF68 fue nula o muy baja (fluorescencia específica media 8.9 ± 0.3 u.a., $n = 355$), siendo la fluorescencia ligeramente mayor que la de las células CHO (fluorescencia específica media 5.6 ± 0.3 u.a., $n = 332$; $p < 0.0001$). Cabe mencionar que en los cultivos obtenidos de las ratas de esta edad, no se encontraron células de los grupos de AE o BE (tabla 3). En los cultivos de ratas con 10, 20 y 45 días la fluorescencia fue baja (fluorescencia específica media 12.6 ± 0.4 u.a., $n = 346$; 17.2 ± 1 u.a., $n = 139$; y 15.1 ± 2.2 u.a., $n = 137$ respectivamente, ver figura 11). En los cultivos de células de ratas hembras de 10 y 20 días, se puede observar (tabla 3) que el porcentaje de células con baja expresión aumenta ligeramente, en tanto que en las células adenohipofisarias de ratas de 45 días de edad se nota un incremento todavía mayor en el porcentaje de células positivas (3.1%). Sin embargo, las células de alto nivel de expresión fueron todavía infrecuentes (1.5%, ver figura 11). En contraste, en las células de ratas hembras de 60 días, la fluorescencia específica media (figura 8) fue más elevada (40.4 ± 0.8 u.a., $n = 2637$), mostrando una distribución en las tres subpoblaciones ya antes mencionadas (tabla 3). El porcentaje total de células positivas a NF68 (BE y AE sumados) fue de 48.7%. Finalmente, la expresión de NF68 en células de ratas hembras de 90 días fue similar a la reportada para las células de las ratas de 60 días (fluorescencia específica media 33.7 ± 2.2 u.a., $n = 751$). Estos resultados claramente indican que la expresión de marcadores neuronales en las células adenohipofisarias se incrementa gradualmente durante el desarrollo ontogénico y llega a un nivel estable una vez que la rata adquiere la madurez sexual.

Nivel de expresión de NF68	Días de edad				
	recién nacidas (n=355)	10 (n=346)	20 (n=139)	45 (n=137)	60 (n=2637)
AE	0%	0%	0.7%	1.5%	10.1%
BE	0%	5.2%	5%	7.3%	38.6%
SE	100%	94.8%	94.3%	91.2%	51.3%
*	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001	-

Tabla 3. Porcentaje de células adenohipofisarias obtenidas de ratas hembras de diferentes edades (datos de tres cultivos independientes para cada condición) divididos según el nivel de expresión de NF68. Células con AE: alta expresión, BE: baja expresión y SE: sin expresión (ver figura 6 para los rangos). Las células adenohipofisarias fueron procesadas para inmunofluorescencia después de un día en cultivo en condiciones control; los valores de p se obtuvieron con la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov y están reportados con 99% de intervalo de confianza. Nótese que la expresión de NF68 se incrementa significativamente entre los 45 y 60 días de edad. * p se refiere a la comparación entre los grupos y las células de rata hembra de 60 días de edad.

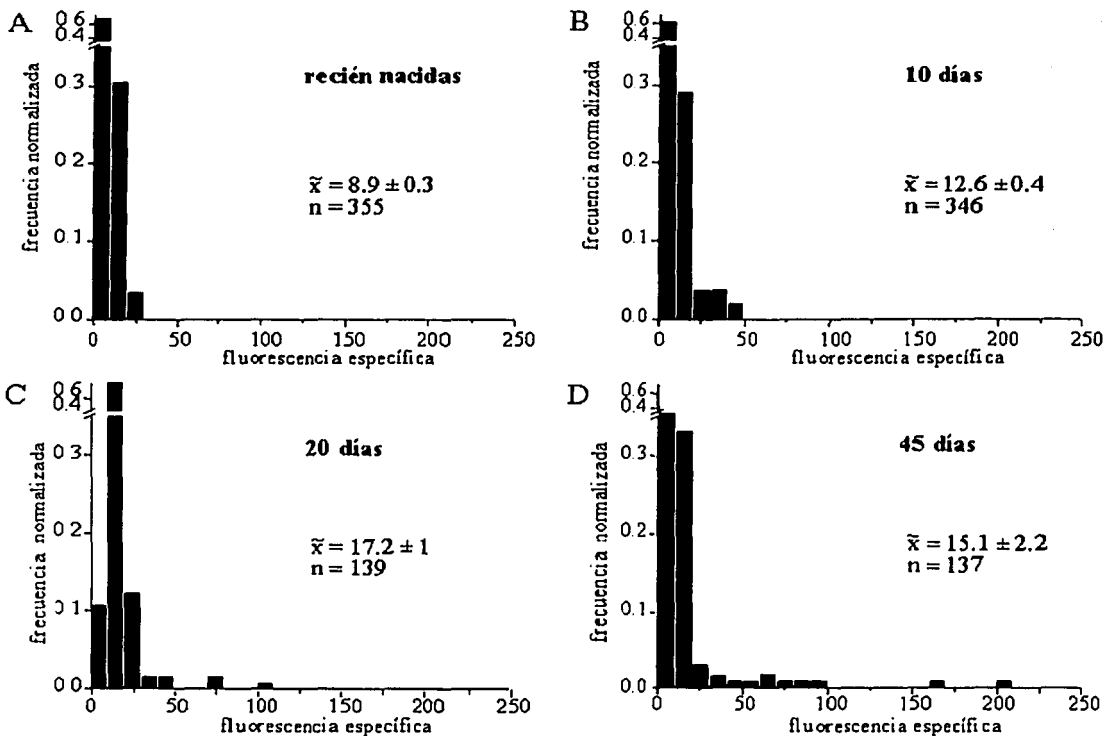


Fig. 11. Histograma de frecuencia que muestra la distribución de la fluorescencia específica de NF68 en células adenohipofisiarias de ratas hembras en diferentes estadios postnatales. A: recién nacidas, B, C y D 10, 20 y 45 días de edad, respectivamente. La inmunofluorescencia específica media, el error estándar y el número de células examinadas se muestran en cada gráfica. Los histogramas están hechos con datos agrupados de tres cultivos independientes para cada condición. Nótese que la expresión de neurofilamentos en las células adenohipofisiarias comienza a aparecer a partir del día 20 de edad.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Dimorfismo sexual en la expresión de NF68 en células adenohipofisarias.

La aparente relación entre la expresión de marcadores neuronales y el inicio de la madurez sexual en las ratas hembras nos planteó la necesidad de examinar si el cambio de expresión dependiente de la edad también ocurría en células de ratas macho. Contrariamente a lo observado en las células de rata hembra ($p < 0.0001$), en las células de ratas macho de 60 días de edad el patrón de expresión de NF68 es homogéneo y bajo (fluorescencia específica media 22.6 ± 1.2 u.a., $n = 383$) pero significativamente mayor del observado en las células de ratas hembras de 45 días de edad ($p < 0.0001$), siendo el porcentaje de células positivas a neurofilamentos (BE y AE) de 23.8% (tabla 6). En la figura 12 se muestra la comparación de los histogramas de distribución de la inmunotinción de NF68 en células adenohipofisarias de ratas macho y ratas hembras de la misma edad. Se pueden observar claramente las diferencias encontradas en el patrón de distribución de la expresión de neurofilamentos.

Estos resultados sugieren que 1) la expresión de los marcadores neuronales en las células adenohipofisarias es *sexualmente dimórfica* (véase dimorfismo sexual, anexo 1), y 2) que probablemente las hormonas gonadales femeninas están involucradas en la regulación de esta expresión, siendo los candidatos obvios los estrógenos y/o factores liberados por los ovarios, el hipotálamo o la hipófisis en respuesta a éstos.

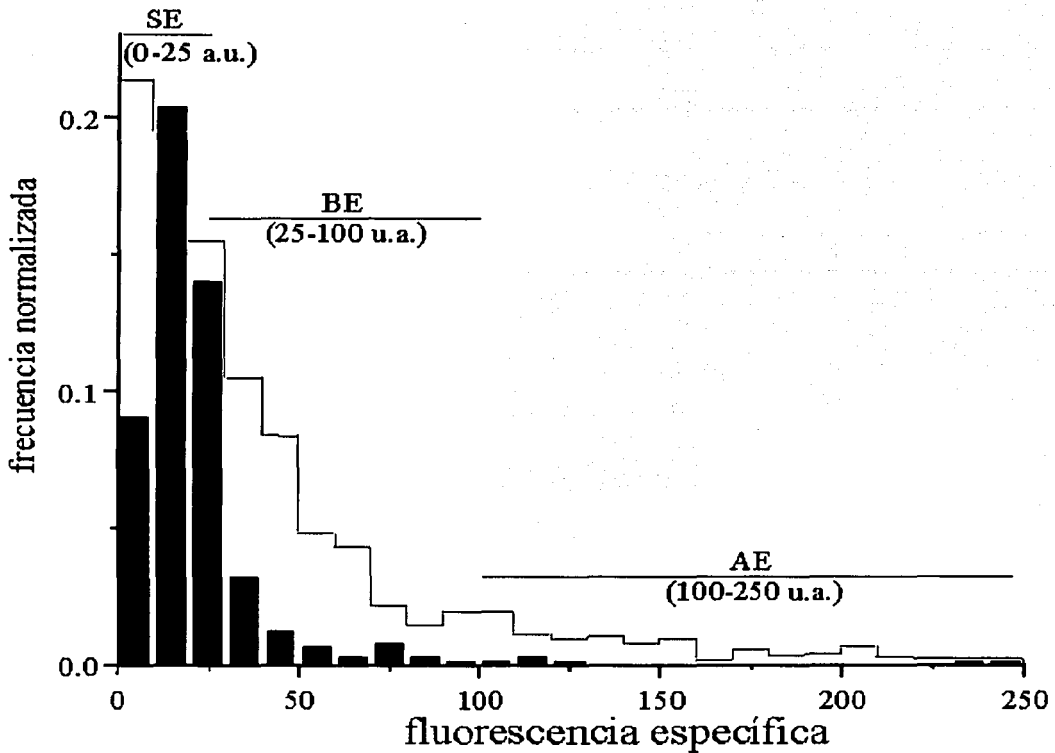


Fig. 12. Comparación de los histogramas de frecuencia de la fluorescencia específica de NF68 en células adenohipofisarias de ratas hembras y macho de la misma edad (60 días). Datos agrupados de tres cultivos independientes. El histograma de columnas negras corresponde a la distribución de fluorescencia de NF68 en células adenohipofisarias de ratas macho. La línea continua representa el histograma de distribución de fluorescencia de NF68 en células adenohipofisarias de ratas hembras. Se indica: la fluorescencia específica media, error estándar y el número de células examinadas. Se indican también los rangos que comprende cada categoría de fluorescencia: células sin expresión (SE), de baja expresión (BE) y de alta expresión (AE).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Influencia del ciclo estral en la expresión de NF68.

Es bien conocido que las concentraciones plasmáticas de estrógenos presentan variaciones durante el ciclo estral (57 y 58), por lo que nos preguntamos si los diferentes niveles estrogénicos en estas condiciones fisiológicas podrían afectar la expresión de neurofilamentos. Para ello, analizamos tres estados del ciclo estral: proestro, estro y diestro, en donde el pico máximo de estradiol se produce en la noche del proestro, antes del inicio del estro y disminuye paulatinamente durante el estro, el diestro 1 y 2 hasta volver a subir lentamente durante el proestro (para más detalles ver en la discusión la gráfica 21). Los resultados mostraron diferencias significativas entre las tres fases ($p < 0.0001$ en todos los casos). La expresión máxima de neurofilamentos se observó en el estro (fluorescencia específica media 63.4 ± 1.1 u.a., $n = 3704$) y el mínimo en el proestro (fluorescencia específica media 31.1 ± 0.7 u.a., $n = 4772$), siendo de un nivel intermedio en el caso del diestro (fluorescencia específica media 45.6 ± 0.9 u.a., $n = 3943$). Como se muestra en la tabla 4, el porcentaje de células AE disminuye de 19.6% en el estro a 12.3% en el diestro a 8% en el proestro. De igual forma, la proporción de células con BE disminuye gradualmente de 52.6% en estro a 45.8% en diestro y a 18.5% en el proestro.

Nivel de expresión de NF68	Fase del ciclo estral		
	Diestro (n=3493)	Proestro (n=4772)	Estro (n=3704)
AE	12.3%	8%	19.6%
BE	45.8%	18.5%	52.6%
SE	41.9%	73.5%	27.8%

Tabla 4. Porcentaje de células adenohipofisarias obtenidas de ratas hembras de 60 días de edad, en diferentes fases del ciclo estral (datos de tres cultivos independientes para cada condición) divididos según el nivel de expresión de NF68. Células con AE: alta expresión, BE: baja expresión y SE: sin expresión (ver figura 6 para los rangos). Las células adenohipofisarias fueron procesadas para inmunofluorescencia después de un día en cultivo en condiciones control. Se observaron diferencias significativas entre las tres fases ($p < 0.0001$ en todos los casos).

Efecto de la gonadectomía y el tratamiento antiestrogénico en la expresión de NF68.

La adenohipófisis es uno de los órganos blanco de los estrógenos. Sus receptores se han identificado en 60-70% de células del lóbulo anterior, y la proporción de sus receptores varía según la fase del ciclo estral en la rata (26). Dentro de las acciones de estas hormonas en la adenohipófisis, se encuentra el efecto positivo y negativo sobre la secreción de gonadotropinas y en la sensibilidad de los tirotropos a TRH (27 y 28). Los estrógenos estimulan la síntesis, almacenamiento y liberación de prolactina así como la división celular de los lactotropos (29). Con el propósito de explorar la participación de los estrógenos en la expresión de los neurofilamentos, se ovariectomizaron ratas hembras de 60 días de edad y 14 días después de la operación se analizó la expresión de NF68 en las células adenohipofisiarias. El grupo que se tomó como control fueron células adenohipofisiarias de ratas hembras de 60 días a las cuales se les realizó el mismo procedimiento quirúrgico, pero sin remover los ovarios.

La ovariectomía (OVX) produjo una disminución significativa del nivel de expresión de los neurofilamentos (fluorescencia específica media 20.9 ± 0.5 u.a., $n = 1977$) en comparación con las células de ratas intactas o que fueron operadas pero sin la remoción de los ovarios (fluorescencia específica media 40.4 ± 0.8 u.a., $n = 2637$ y 45 ± 1.8 a.u., $n = 554$, respectivamente; $p < 0.0001$ en ambos casos). Sin embargo, las células de alta expresión que son muy raras en el macho (1.6%) y en las hembras de 45 días (1.5%) aún permanecieron en el caso de las ratas hembras con 14 días de ovariectomía (2.2%). Los resultados de estos experimentos se resumen en la tabla 5.

Un procedimiento más radical que la ovariectomía y que generalmente se utiliza para eliminar la función estrogénica sin afectar las secreciones ováricas, es la administración de drogas anti estrogénicas como el tamoxifén. Esta es una droga que se une competitivamente al receptor de estrógeno (19 y 30) y tiene una potente función anti-estrogénica en el tejido mamario y una débil acción estrogénica en el endometrio uterino (30 y 31). El tamoxifén fue administrado por vía oral (ver métodos) a un grupo de ratas hembras de 60 días de edad durante 15 días consecutivos. Para los controles se utilizaron ratas hembras de 60 días a las cuales se les administró la misma cantidad de agua que a las ratas tratadas.

La inmunotinción de neurofilamentos de las células adenohipofisarias de ratas tratadas con tamoxifén fue significativamente menor que la observada en las células de ratas ovariectomizadas, de los controles del tratamiento y de las ratas hembras de 60 días (fluorescencia específica media para el grupo tratado con tamoxifén 6.1 ± 0.4 u.a., $n = 710$; $p < 0.0001$ para todo los casos). Como se abordará con más amplitud en la discusión, una posible explicación de la menor inmunofluorescencia detectada en las células de ratas ovariectomizadas en comparación con las células de ratas tratadas con tamoxifén, es que en el primer caso los estrógenos circulantes no desaparecen completamente de la circulación (32), probablemente debido a la liberación de estrógenos de fuentes extra ováricas (33 y 34).

La expresión de NF68 después del tratamiento con tamoxifén fue menor que el observado en las células de ratas macho adultas ($p < 0.0001$), e incluso por debajo de la observada en las ratas recién nacidas ($p < 0.0001$). Los resultados obtenidos para el tratamiento de tamoxifén apoyan la hipótesis de que la disminución de la expresión de NF68 en las ratas ovariectomizadas es resultado de la producción insuficiente de estrógenos más que de otros factores ováricos (proteínas y péptidos; 35). Los resultados de estos experimentos se resumen en la tabla 5.

Nivel de expresión de NF68	Hembra 60 días (n=2637)	Macho 60 días (n=383)	Operación control (n=554)	OVX (n=1977)	Tamoxifén (n=710)	OVX+vehículo (n=917)	OVX+17β estradiol (n=511)
AE	10.1%	1.6%	11.9%	2.2%	0%	2.3%	7.8%
BE	38.6%	22.2%	42.8%	18.2%	4.7%	24.1%	62.4%
SE	51.3%	76.2%	45.3%	79.6%	95.3%	73.6%	29.8%
*	-	$p < 0.0001$	$p = 0.0031$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$
**	$p < 0.0001$	-	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p = 0.0003$	$p < 0.0001$

Tabla 5. Porcentaje de células adenohipofisarias en las tres categorías de expresión de NF, obtenidas de ratas hembras de 60 días de edad, ratas macho y hembra de 60 días de edad: operadas control, 14 días después de ovariectomizadas (OVX), tratadas con tamoxifén por 4 días, OVX inyectadas con vehículo por 4 días y OVX con inyección de 20 µg/100 gr de 17 β-estradiol. Los datos son de tres cultivos independientes para cada condición. Las células adenohipofisarias fueron procesadas para inmunofluorescencia después de un día en cultivo en condiciones control. Los valores de p se obtuvieron con la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov y están reportados con 99% de intervalo de confianza. * p se refiere a la comparación entre los grupos y las células de rata hembra de 60 días de edad y ** p se refiere a la comparación entre los grupos y las células de rata macho de 60 días de edad.

Influencia de la restitución de estradiol en ratas ovariectomizadas sobre la expresión de NF68.

Para corroborar la hipótesis anteriormente mencionada, durante 4 días se inyectó subcutáneamente 20 µg por cada 100 gr de peso de 17 β-estradiol a un grupo de ratas hembras de 60 días de edad luego de 15 días de OVX. Al cuantificar la expresión de NF68 en las células adenohipofisarias de estas ratas, se observó un aumento considerable (fluorescencia específica media 47.8 ± 1.6 u.a., $n = 511$), en comparación con la expresión encontrada en células de ratas OVX inyectadas sólo con el vehículo o OVX sin inyecciones (fluorescencia específica media 23.7 ± 0.7 u.a., $n = 917$ y 20.9 ± 0.5 u.a., $n = 1977$, respectivamente; $p < 0.0001$ para todos los casos) y, a pesar de que el porcentaje de células con AE sigue siendo más bajo que el observado en las células de ratas hembras de 60 días (probablemente debido a la concentración final de estradiol alcanzada), las células con expresión (AE + BE) se encuentran en mayor proporción que la registrada en las células de ratas hembras de 60 días (70.2% y 48.7% respectivamente). El efecto de este tratamiento sobre la proporción de células SE, BE y AE se encuentra resumido en la tabla 5.

En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que el nivel de expresión de NF68 en las células hipofisarias está afectado por la concentración plasmática de estradiol y que estos efectos están mediados por los receptores estrogénicos.

Efectos de la castración y el tratamiento estrogénico en la expresión de NF68.

Como se mostró anteriormente, la expresión de neurofilamentos es baja en los machos (fluorescencia específica media 22.6 ± 1.2 u.a.). Después de la orquidectomía o de la operación control, la expresión de NF68 aumentó significativamente. La inmunoreactividad de NF68 fue elevada en ambos grupos (fluorescencia específica media para castradas 42.6 ± 0.8 u.a., $n = 636$ y para las operadas control 40.2 ± 0.8 u.a., $n = 438$). La razón del aumento en la expresión de NF68 en las células de ratas macho operadas control se desconoce (ver discusiones). No obstante, cuando un grupo de ratas macho castradas fue inyectado con 17 β-estradiol, utilizando el mismo protocolo que para las OVX (ver métodos), se detectó un incremento aún mayor en la expresión de neurofilamentos (fluorescencia específica media 45.9 ± 0.9 u.a., $n = 680$). Esta

diferencia es significativa cuando se compara con las células de ratas operadas control y las castradas inyectadas con el vehículo ($p = 0.0004$ y $p < 0.0001$, respectivamente). En este caso, la expresión de NF68 incluso excedió a la observada en ratas hembras de 60 días de edad ($p < 0.0001$).

Estos resultados (resumidos en la tabla 6) permiten concluir que: 1) la deficiencia de andrógenos por sí misma no influye significativamente la expresión de NF68 en las células adenohipofisarias y 2) las células adenohipofisarias de macho tienen la capacidad para aumentar la expresión de neurofilamentos en respuesta a los niveles elevados de estrógenos circulantes.

Nivel de expresión de NF68	Macho 60 días (n=382)	Operación control (n=438)	Orquidectomía (n=636)	Orquidectomía + vehículo (n=834)	Orquidectomía + 17 β estradiol (n=680)
AE	1.6%	0.9%	1.3%	1.6%	2.4%
BE	22.2%	74.9%	85.3%	77.5%	84.6%
SE	76.2%	24.2%	13.4%	20.9%	13%
*	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$
**	$p < 0.0001$	-	$p = 0.0025$	$p < 0.0001$	$p = 0.0004$

Tabla 6. Porcentaje de células adenohipofisarias en las tres categorías de expresión de NF, obtenidas de ratas macho de 60 días de edad y machos de 60 días de edad: operadas control, 14 días después de orquidectomizadas, orquidectomizadas inyectadas con vehículo por 4 días y orquidectomizadas con inyección de 20 $\mu\text{g}/100$ gr de 17 β -estradiol. Los datos son de tres cultivos independientes para cada condición. Las células adenohipofisarias fueron procesadas para inmunofluorescencia después de un día en cultivo en condiciones control. Los valores de p se obtuvieron con la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov y están reportados con 99% de intervalo de confianza. * p se refiere a la comparación entre los grupos y las células de rata hembra de 60 días de edad y ** p se refiere a la comparación entre los grupos y las células de rata macho de 60 días de edad.

Efecto del 17 β -estradiol en la expresión de NF68 en células adenohipofisarias en cultivo.

Con el fin de comprobar si el efecto del estradiol demostrado *in vivo* se produce de manera directa en las células de la adenohipófisis *in vitro*, se evaluó la expresión de neurofilamentos de células adenohipofisarias tratadas en cultivo con 17 β -estradiol durante 6 días consecutivos. En la figura 13 se observa la distribución de fluorescencia de la expresión de neurofilamentos de 68 kDa en un cultivo representativo de células adenohipofisarias de rata hembra de 60 días de edad, la expresión de neurofilamentos decae paulatinamente a partir de los primeros días de cultivo (fluorescencia específica media 58.6 ± 4 u.a., $n = 162$, 13A), siendo significativamente menor ($p < 0.0001$) a los 6 días en cultivo (fluorescencia específica media 17.8 ± 0.6 u.a., $n = 205$, 13B). La expresión continúa decayendo hasta ser muy baja o nula a los 12 días de cultivo (fluorescencia específica media 14.8 ± 0.8 u.a., $n = 86$, 13C). La adición en el cultivo de 200 nM de 17 β -estradiol no modificó ni previno esta pérdida en la expresión (fluorescencia específica media 10.2 ± 0.8 u.a., $n = 132$, 13D). Estos resultados sugieren (aunque no de manera determinante) que la forma en que el estradiol regula la expresión de neurofilamentos (demostrada *in vivo*) es indirecta, de forma que esta podría actuar ya sea a través del hipotálamo o regulando otros factores adenohipofisarios.

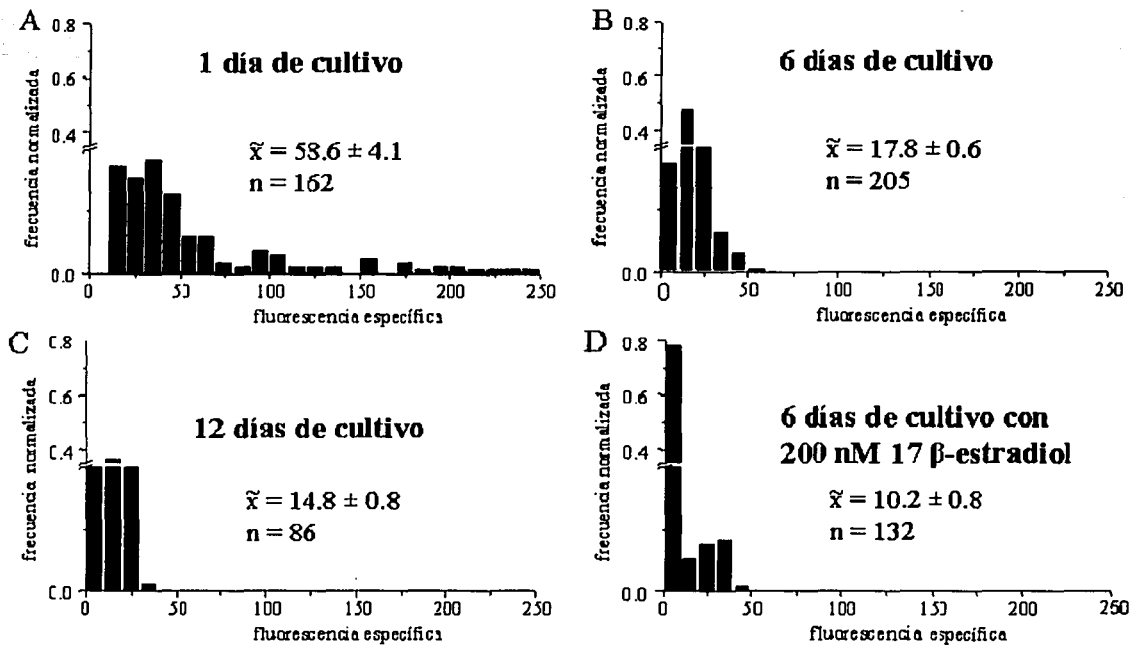


Fig. 13. Histograma de frecuencia que muestra la distribución de la fluorescencia específica de NF68 en células adenohipofisarias de ratas hembras con diferentes días en cultivo. **A:** 1 día en cultivo, **B:** 6 días en cultivo, **C:** 12 días en cultivo y **D:** 6 días en cultivo con 200 nM de 17 β -estradiol. La inmunofluorescencia específica media, el error estándar y el número de células examinadas se muestran en cada panel. Los histogramas están hechos con datos agrupados de dos cultivos independientes para cada condición. Nótese que la expresión de neurofilamentos en las células adenohipofisarias comienza a decaer a partir de sexto día en cultivo.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Influencia del embarazo y la lactancia sobre la expresión de neurofilamentos.

El período de embarazo en la rata es de 21 a 22 días. Durante este tiempo, tres hormonas cambian drásticamente sus niveles, las hormonas ováricas esteroideas (progesterona y estrógenos) y la prolactina. La mayor parte del tiempo, la progesterona se mantiene alta, pero los niveles bajan bruscamente en el día 19. Los estrógenos y la PRL presentan, por el contrario niveles bajos durante la mayor parte del embarazo y aumentan justo antes del final del mismo, a partir del día 16 con un máximo en el día del parto (fig. 14; 36 y 37). Después del parto, el período de lactancia dura de 22 a 23 días. Durante este tiempo las ratas mantienen hasta 2 días después del parto las concentraciones de estradiol alcanzadas en la última fase del embarazo. A los 7 días posparto, la concentración media de estradiol es un poco alta, pero no es significativamente diferente de la que se encuentra en ratas hembras vírgenes (fig. 14; 36 y 37).

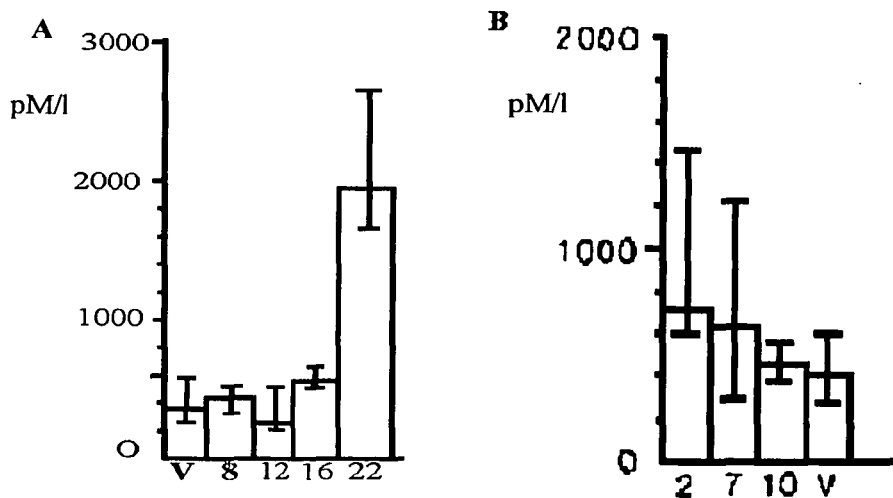


Fig. 14. Concentración plasmática media, de 17 β -estradiol en A: ratas vírgenes (V) y a los 8, 12, 16 y 22 días de embarazo; B: ratas vírgenes (V) y a los 2, 7 y 10 días posparto. Tomado de cita 37

Como se observa en la figura 14, al final del embarazo y principio del posparto las concentraciones séricas de estradiol son altas como en el proestro. Sin embargo, el período de tiempo durante el cual estas concentraciones se mantienen es mayor en comparación al proestro. Con el fin de analizar el efecto que un período largo (de 2 a 4 días) de estradiol elevado podría tener en la expresión de neurofilamentos, decidimos examinar la expresión de NF en células adenohipofisarias de ratas hembras con 15 y 21 días de embarazo y con diferente número de días posparto. En las células de ratas con 15 y 21 días de embarazo la expresión de neurofilamentos fue baja (fluorescencia específica media 32.8 ± 1 u.a., $n = 722$ y 22.7 ± 0.7 u.a., $n = 2223$ respectivamente), en ambos casos significativamente ($p < 0.0001$) menor a la de las células de ratas hembras de 60 días en estro o diestro. En contraste, en las células de ratas con 7 días posparto la expresión (fluorescencia específica media 61.5 ± 0.8 u.a., $n = 3052$) fue significativamente ($p < 0.0001$) mayor en comparación con las ratas embarazadas. Este aumento en la expresión de neurofilamentos disminuye gradualmente conforme pasan los días posparto (a los 10 días posparto la fluorescencia específica media es de 54.7 ± 1 u.a., $n = 1598$ y a los 14 días la fluorescencia específica media 55.7 ± 1.3 u.a., $n = 1452$), hasta los 21 días posparto (fluorescencia específica media 45.7 ± 0.8 u.a.; $n = 1247$), en donde la expresión de NF68 es ligeramente mayor que la observada en las células adenohipofisarias de rata hembra de 60 días en diestro pero menor a la observada en células de rata hembra en estro. Los resultados de la expresión de NF68 en células adenohipofisarias de ratas embarazadas y en posparto se muestran en la tabla 7.

Nivel de expresión de NF68	Días posparto					
	Embarazo 15 (n=722)	Embarazo 21 (n=2223)	7 (n=3052)	10 (n=1598)	14 (n=1452)	21 (n=1247)
AE	3.3%	3.9%	17.8%	12.4%	13%	5.6%
BE	41.4%	14.2%	67.3%	72.2%	67%	72.2%
SE	55.3%	81.9%	14.9%	15.4%	20%	22.2%
*	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001

Tabla 7. Porcentaje de expresión de NF68 en células adenohipofisarias obtenidas de ratas hembras: con 15, y 21 días de embarazo y con 7, 10, 14 y 21 días posparto. Los datos son de tres cultivos independientes para cada condición. Las células adenohipofisarias fueron procesadas para inmunofluorescencia después de un día en cultivo en condiciones control; los valores de p se obtuvieron con la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov y están reportados con 99% de intervalo de confianza. * p se refiere a la comparación entre los grupos y las células de rata hembra de 60 días de edad.

Estos resultados, junto con los de la expresión de neurofilamentos determinada durante el ciclo estral sugieren que el aumento en la expresión de neurofilamentos se produce con un cierto retraso después de que ocurre el pico máximo de estradiol plasmático (proestro y final del embarazo), además de que no se ve modificada con la duración de la elevada concentración de estradiol y comienza a disminuir paulatinamente.

Identificación de las poblaciones de células adenohipofisarias que expresan neurofilamentos.

Un aspecto crucial de este trabajo fue identificar que tipo o tipos celulares adenohipofisarios expresan neurofilamentos. Para identificar la población de células con expresión de NF68, se realizaron inmunotinciones dobles para neurofilamentos y para cuatro de las cinco diferentes hormonas secretadas por los diferentes tipos celulares adenohipofisarios. Estos cuatro tipos celulares representan cerca el 90% del total de la población endocrina hipofisaria (36). La proporción de cada tipo celular encontrado en este estudio en adenohipófisis de ratas hembras sexualmente maduras, fue de la siguiente manera: somatotropos 30.6%, lactotropos 45.7%, gonadotropos 7.6% y tirotropos 8.1%. En general estos porcentajes corresponden a los reportados por otros autores tomando en cuenta las diferencias entre los

estudios (2, 35 y 36) y las variaciones relacionadas con las fases del ciclo estral (2). Como se ilustra en la figura 15, las células doblemente positivas se identificaron en cada uno de los cuatro fenotipos celulares. Cada población celular tiene patrones específicos de inmunotinción. En la figura 15B y 15C, que corresponden a imágenes confocales de un tirotripo y un gonadotropo respectivamente, se observa que la distribución de NF68 y LH o TSH está distribuida diferencialmente en el citoplasma de las células y en algunos casos parece no co-localizarse en la misma región. Como se resume en la tabla 8, en los cultivos adenohipofisarios de ratas sexualmente maduras, las células NF68 positivas correspondieron al $11.7\% \pm 2$ de los somatotropos ($n = 279$), $20.2\% \pm 3$ de los lactotropos ($n = 537$), $12.6\% \pm 8$ de los gonadotropos ($n = 47$) y $33.1\% \pm 8$ de los tirotropos ($n = 229$). En cambio, en las ratas hembras con 7 días posparto la proporción de cada tipo celular fue del 30.9% de somatotropos, 41.6% de los lactotropos, 6.6% de los gonadotropos y 9.8% de los tirotropos. Las células NF68 positivas correspondieron a $8.6\% \pm 4$ de los somatotropos ($n = 267$), $18.7\% \pm 3$ de los lactotropos ($n = 760$), $4.9\% \pm 1$ de los gonadotropos ($n = 32$) y $56.9\% \pm 8$ de los tirotropos ($n = 459$) (tabla 8).

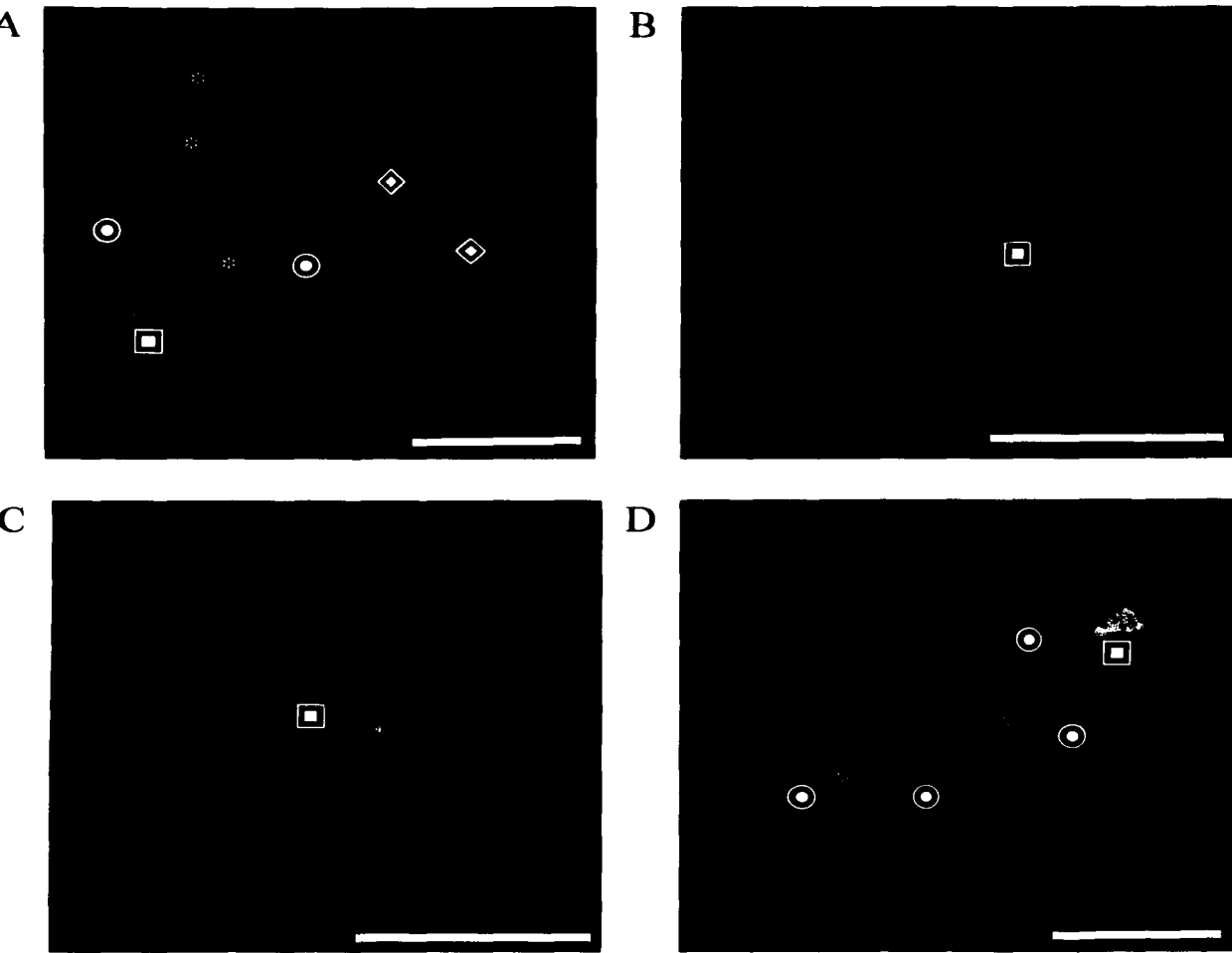


Fig. 15. Identificación de los subtipos de células adenohipofisarias que expresan NF68. La doble inmunotinción de NF68 y GH, LH, TSH o PRL se realizó en células adenohipofisarias de ratas hembras de 60 días de edad, mantenidas un día en cultivo en condiciones control. Las imágenes de confocal para las muestras inmunotecnidas para hormona se adquirieron con una longitud de excitación de 488 nm y de 647 nm para NF68. La emisión se colecto con un fotomultiplicador en dos canales separados. En cada cuadro se muestra en rojo la inmunotinción correspondiente a NF68 y en verde la correspondiente a la hormona adenohipofisaria. A: Inmunotinción de NF68 y GH; B: NF68 y LH; C: NF68 y TSH; D: NF68 y PRL. Cada población de células adenohipofisarias muestra una tinción característica de la hormona y en general difieren del patrón de tinción de NF68. En las figuras 15A y 15D se identifican cuatro tipos celulares: Los doblemente negativos (*), Los positivos sólo a la hormona (○), los positivos sólo a NF68 (◇) y los doblemente positivos (◻). La barra en cada panel representa 20 μ m.

		Somatotropos	Lactotropos	Gonadotropos	Tirotropos
hembra de 60 días de edad	% población	30.6	45.7	7.6	8.1
	% positivo a NF68	11.7 ± 2	20.2 ± 3	12.6 ± 8	33.1 ± 8
hembra con 7 días posparto	% población	30.9	41.6	6.6	9.8
	% positivo a NF68	8.6 ± 4	18.7 ± 3	4.9 ± 1	56.9 ± 8

Tabla 8. Proporción (% población) de cada tipo celular con respecto al total de la población celular adenohipofisiaria, encontrado en este estudio en adenohipófisis de ratas hembras sexualmente maduras y ratas hembras con 7 días posparto. Proporción (% positivo a NF) de células positivas a neurofilamentos para cada tipo celular en células de adenohipófisis de ratas hembras sexualmente maduras y ratas hembras con 7 días posparto.

Estos resultados indican que la expresión de marcadores neuronales específicos no es exclusiva de un tipo celular adenohipofisiario, sino que más bien se manifiesta en un subgrupo de cada población celular y que puede variar el porcentaje para cada tipo dependiendo de la condición fisiológica del organismo. El posible significado funcional (si hay alguno) de este subgrupo de células que expresan NF68 y cuya abundancia está regulada por el nivel hormonal, queda por ser investigado.

Expresión de neurofilamentos por Western blot.

Con el fin de corroborar la diferencia en la expresión de neurofilamentos observada en las células adenohipofisiarias de ratas hembras y machos se decidió utilizar la técnica de Western blot, como un método que permite observar diferencias en la cantidad de proteína en un homogenado de tejido completo.

Como se muestra en la figura 16 en el control positivo (homogenado de ganglio simpático) se pudo observar una banda de aproximadamente 69 kDa, mientras que en el homogenado de adenohipófisis de rata se pueden observar 2 bandas de entre 43 y 69 kDa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 16. Western blot de homogenados de ganglio simpático de rata y adenohipófisis de ratas hembras de 60 días de edad.

Dado que en el homogenado de adenohipófisis las bandas no tienen el peso molecular generalmente esperado para los neurofilamentos de bajo peso molecular (60-70 kDa), decidimos descartar dos posibilidades que podrían producir artefactualmente un corrimiento en las bandas: la primera de ellas es que una alta concentración de albúmina (aproximadamente 94 kDa), presente en el medio en donde se colocan las glándulas extraídas antes de homogeneizar el tejido, estuviese enmascarando o corriendo hacia abajo las bandas correspondientes a 68 kDa y la segunda es que la alta cantidad de proteína total (300 µg) cargada en cada pozo estuviese influyendo en la forma de correr de las muestras de adenohipófisis. Para descartar o confirmar la primera posibilidad, se utilizaron diferentes concentraciones de homogenado de ganglio (5, 20, 30 y 40 µg) mezcladas cada una con 22 mg de albúmina diluida y, para la segunda posibilidad se aplicó en un pozo la misma cantidad de proteína total (300 µg) del control positivo y en otro pozo una mezcla de 20 µm de homogenado de ganglio más 300 µg de homogenado de adenohipófisis.

Como se muestra en la figura 17 B las muestras mezcladas con albúmina no son reconocidas por el anticuerpo de NF68. Inicialmente podría pensarse que la electro transferencia no se llevó a cabo adecuadamente. Sin embargo, al ser revisado el gel de electro transferencia con azul de Comassi no se encontró ninguna tinción, por lo que probablemente el exceso de albúmina enmascara los sitios de unión del anticuerpo saturando el gel en esos puntos. Este resultado nos llevó a cambiar el procedimiento de extracción de las glándulas, y en vez de colocarlas en medio de cultivo se colocaron en PBS y posteriormente en la solución de homogenado, cuando se volvieron a hacer los geles utilizando esta modificación las bandas de neurofilamentos fueron reconocidas en la membrana de nitrocelulosa.

En la figura 18 se observa que en ninguna de las dos aproximaciones para ver la posibilidad de que la cantidad de proteína cargada corriera hacia abajo las bandas de NF, la banda correspondiente a los NF68 de ganglio simpático se vio afectada o varió su posición de acuerdo a su peso molecular.

Estos controles indican que en la adenohipófisis de rata los neurofilamentos de bajo peso molecular tienen un peso molecular más bajo de 68 kDa, pero retienen su sitio de unión específico al anticuerpo en el carboxilo terminal.

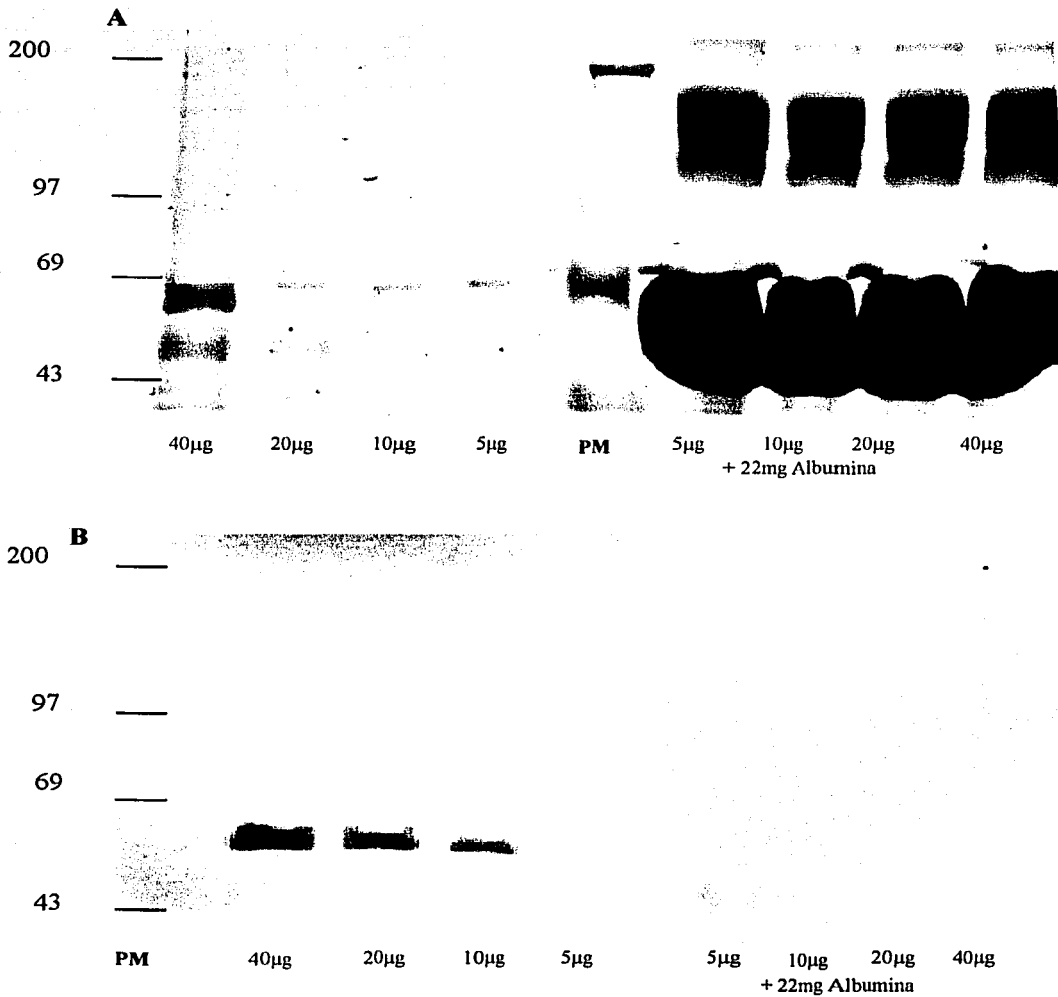


Fig. 17. Western blot de homogenados de ganglio de rata y adenohipófisis de ratas hembras de 60 días. Se muestra en **A**: la tinción de azul de Coomassi de un gel de agarosa 8%, en el cual los cuatro primeros carriles (de izquierda a derecha) corresponden a diferentes concentraciones de homogenado de ganglio y los últimos cuatro a las mismas concentraciones mezcladas con 22 mg de albúmina. **B**: inmunotinción de NF68 de una membrana a la cual fue electro transferido un gel como el que se ilustra en la figura A. Como se puede observar las muestras que fueron mezcladas con albúmina no se observan inmunoteñidas en la membrana de nitrocelulosa. Geles de 8% con .7 mm de grosor.

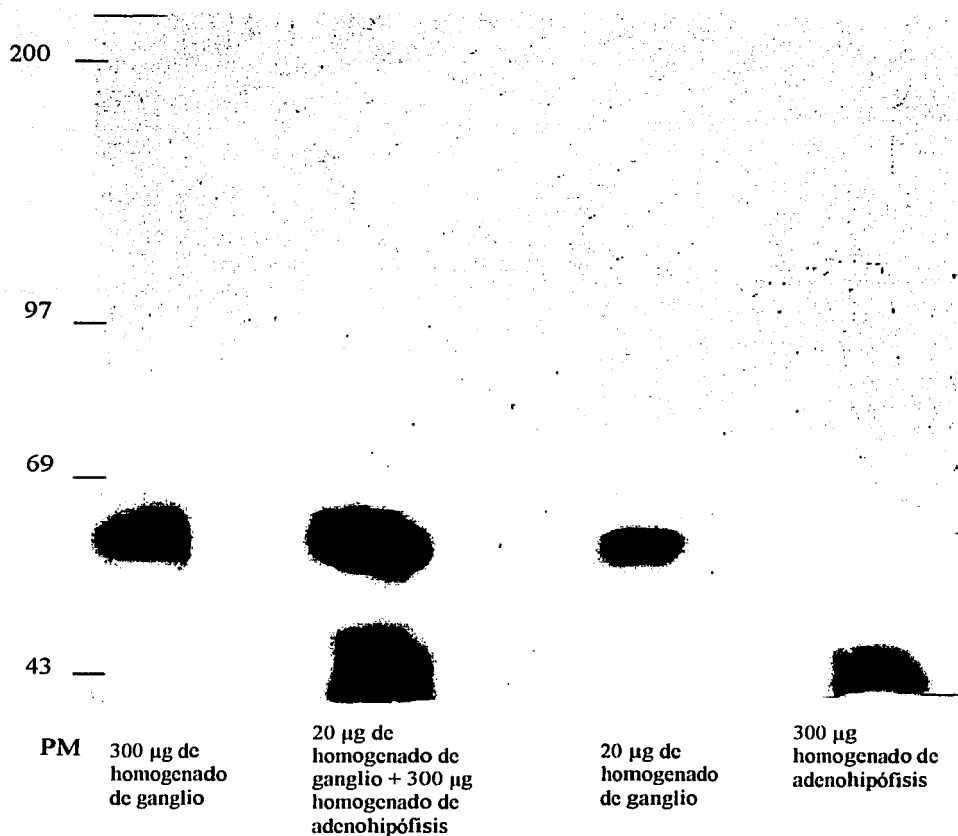


Fig. 18. Western blot que muestra el efecto de la cantidad de proteína cargada en cada pozo en geles de 8% con .7 mm de grosor. Obsérvese que el peso molecular de la banda correspondiente a 300 µg de homogenado de ganglio no se ve modificado y que en el caso de la mezcla de 20 µg de homogenado de ganglio con 300 µg de adenohipófisis se observan 2 bandas, siendo la de más bajo peso molecular igual a la de sólo homogenado de adenohipófisis.

En la figura 19 al comparar los homogenados de adenohipófisis de rata hembra de 60 días, ratas macho de 60 días y ratas con 7 días posparto, se observa que en estas últimas la intensidad de la banda correspondiente a NF68 es más intensa en las dos bandas.

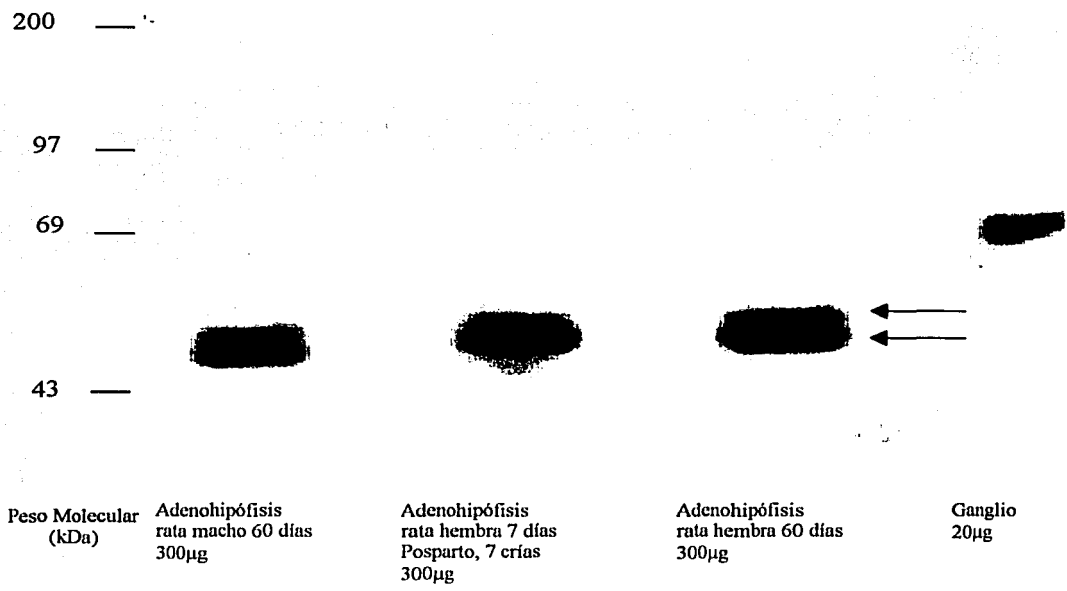


Fig. 19. Western blot con geles de .7 mm de grosor, de homogenados de ratas hembras de 60 días de edad, 7 días posparto y ratas macho de 60 días de edad. Nótese que ambas bandas son más intensas en los homogenados de ratas hembras de 60 días de edad y con 7 días posparto.

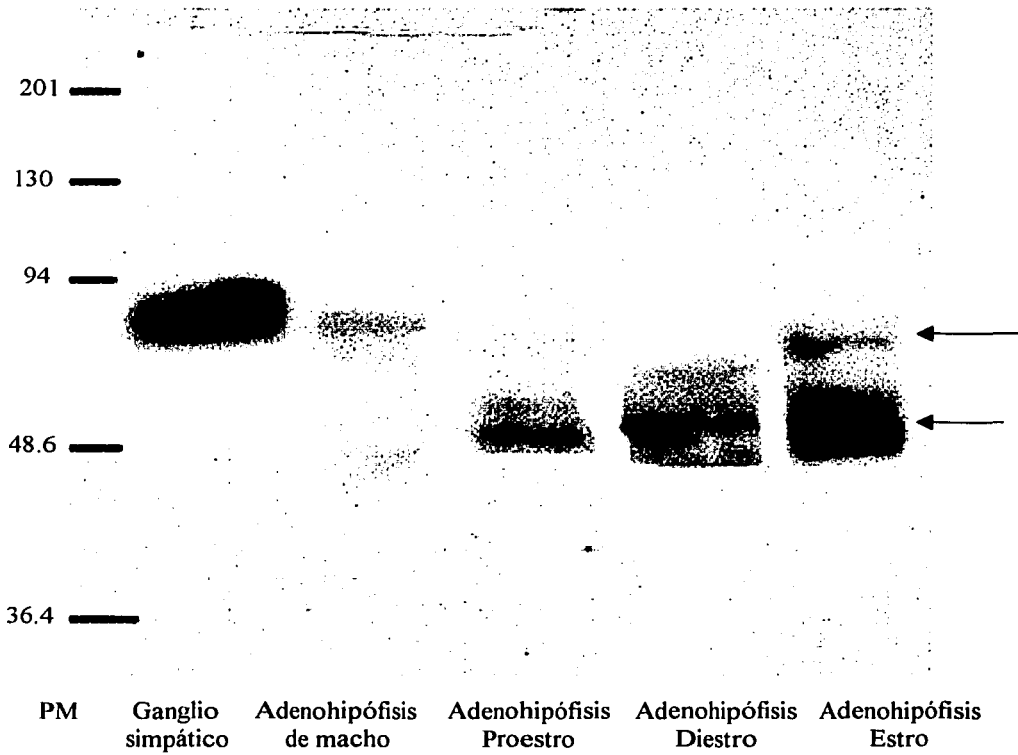


Fig. 20. Western blot en geles con 1.5 mm de grosor, de homogenados de ratas hembras de 60 días de edad en diferentes días del ciclo estral (proestro, estro y diestro), ratas macho de 60 días de edad y ganglio simpático. Nótese que ambas bandas son más intensas en los homogenados de ratas hembras en estro.

Finalmente, en la figura 20 se pueden observar las diferencias encontradas en las bandas de homogenados de ratas hembras sexualmente madura en las diferentes fases del ciclo estral (proestro, estro y diestro), en comparación con ratas macho de 60 días, en este caso para lograr una mejor distribución del homogenado se utilizaron geles de 1.5 mm de grosor. Como se observa, en los homogenados de adenohipófisis de ratas hembras de 60 días en estro, las bandas obtenidas son mucho más intensas que las de diestro, proestro o del macho. También se puede observar que al emplear geles más gruesos las dos bandas correspondientes a NF68 en adenohipófisis se separan de mejor manera y se observa una más cercana a 68 kDa y otra cerca de los 48.6 kDa.

A pesar de las diferencias en el peso molecular de las bandas de neurofilamentos adenohipofisiarias, estos resultados tienden a confirmar los hallazgos obtenidos con la inmunofluorescencia medida a nivel celular. Es decir, que en las ratas sexualmente maduras en estro la expresión de neurofilamentos es mayor que en las ratas en proestro, diestro y que esta expresión es sexualmente dimórfica.

DISCUSIÓN

Expresión de marcadores neuronales en la adenohipófisis

Como se explica detalladamente en el anexo 2, los neurofilamentos (NFs) son heteropolímeros compuestos de la combinación de 2 de los tres polipéptidos fibrilares de diferente peso molecular 200, 160 y 68 kDa, en algunos casos se pueden encontrar homopolímeros de 68 kDa. Estos neurofilamentos se consideran específicos de fenotipos neuronales, aunque se han encontrado en otras células como paraneuronas, células parafoliculares de tiroides y células del sistema endocrino del intestino así como células de Sertoli y Leydig (2). Además aparecen en células cromafines en condiciones de cultivo (23-25). La expresión de neurofilamentos en la adenohipófisis ha sido en extremo controversial (8, 11-14, 20 y 38). Sin embargo, como este estudio claramente demuestra, en las ratas existe una subpoblación de células del lóbulo anterior de la glándula que expresa tanto NFs como otros marcadores neuronales (MAP2).

Los neurofilamentos tienen varios sitios de fosforilación en el extremo carboxilo y se ha descrito que cuando se encuentran completamente fosforilados se da el proceso de polimerización que forma el filamento de 10 nm. Los anticuerpos empleados en este estudio (anti-NF68, clon NR4 y anti-NF200, clon RMO-24) reconocen y se unen a las proteínas de NF completamente fosforiladas en el extremo carboxilo terminal, por lo que podemos inferir que la fluorescencia que detectamos en las células adenohipofisiarias corresponde a la unión de los anticuerpos al estado polimerizado del FI (39). Esto nos da una idea de que los neurofilamentos están interactuando de alguna manera con otros elementos del citoesqueleto como lo hacen en los axones neuronales en donde se ha descrito con mayor detalle su función (anexo 2).

En el caso de los resultados obtenidos por Western Blot para los homogenados de adenohipófisis, llama la atención la presencia de dos bandas de NF68 con un peso molecular entre los 43 y 69 kDa (figs. 19 y 20). Sin tener resultados concluyentes que den una explicación a

la presencia de dos bandas específicas (dado que el anticuerpo no se une a ningún otro antígeno) de los neurofilamentos de bajo peso molecular en la adenohipófisis, podemos decir que, dado que el resultado del control positivo (homogenado de ganglio simpático) no se modificó con la presencia de albúmina o por la cantidad de proteína utilizada (fig. 17 y 18) el corrimiento en las bandas no se debe a un factor artefactual de la cantidad de proteína o de las condiciones en que se corrieron los geles. Esta diferencia de peso molecular observada en las bandas en los geles de homogenado de adenohipófisis de rata, debe ser producto de que los NF-L sufren algún cambio postraduccional que no ocurre en el ganglio (delección de aminoácidos) o que alternativamente no están sujetos a ciertos cambios postraducionales (glucosilación en al menos dos y hasta cuatro sitios; 40), lo que podría modificar el peso molecular de la proteína.

Los NFs de bajo peso molecular tienen 93 amino ácidos (a.a.) en el segmento amino, 308 a.a. en la región helical y 142 a.a. en el segmento carboxilo. Se ha reportado (41) que cuando se producen delecciones en hasta un 43% del carboxilo terminal (61 a.a.), la proteína filamentosa de aproximadamente 49 kDa conserva los sitios de fosforilación y mantiene la capacidad de ensamblaje para formar el heteropolímero y posteriormente el protofilamento (ver anexo 2), aparentemente sin alterar su función en el citoesqueleto. El anticuerpo utilizado en este trabajo reconoce como ya se mencionó, al filamento completamente fosforilado y esta fosforilación se produce en el extremo carboxilo (42) antes del posible punto de delección (a.a. carboxilo 81). Con los datos que contamos, no podemos dilucidar si los NF68 de las células adenohipofisiarias sufrieron una delección o un cambio en el estado de glicosilación. Sin embargo, lo que sí podemos decir es que en el caso de la adenohipófisis, los neurofilamentos de bajo peso molecular mantienen sus propiedades de fosforilación y ensamblaje, no solo porque el anticuerpo empleado reconoce la proteína de bajo peso molecular fosforilada, sino también porque el anticuerpo para NF200 (clon RMO-24) reconoce de igual forma el filamento de 200 kDa completamente fosforilado, lo que significa que está polimerizado y dado que esta proteína fibrilar no forma homopolímeros, necesariamente estaría formando un heteropolímero con NF68, aunque pareciera sin embargo (fig. 9) que la expresión y el porcentaje de células positivas a NF200 es mayor que para NF68. A pesar de que no en todos los cultivos se observó el mismo porcentaje de células positivas a NF200, probablemente por las diferencias en las etapas del ciclo estral, esta diferencia podría deberse a la accesibilidad del antígeno para ser reconocido por el

anticuerpo, ya que la parte carboxilo terminal de la proteína 200 kDa se encuentra más expuesta (ver anexo 2). Sin embargo, esta hipótesis necesitaría ser descartada o confirmada.

Habiéndose corroborado por diversos métodos la expresión de neurofilamentos en la adenohipófisis, podría pensarse que ésta es una evidencia que apoya la idea de que una parte de la adenohipófisis tiene un origen neuroectodérmico (9, 10). Sin embargo, nuestros datos de hecho, son inconsistentes con esta interpretación. En el caso de las células cromafines cuyo origen neuroectodérmico está más claramente establecido y en las células de islotes pancreáticos que provienen del endodermo, los NFs se expresan en páncreas y glándulas adrenales de embriones, pero no en los animales adultos (3). En contraste, como se muestra en este estudio, la expresión de NFs en la adenohipófisis está ausente en ratas recién nacidas y ratas jóvenes, comenzando a aparecer cuando las ratas se aproximan a la madurez sexual. Pareciera entonces que la expresión de neurofilamentos en las células adenohipofisiarias, más que una reminiscencia de origen embrionario, refleja una función activa y regulada, que está sobre todo relacionada con el desarrollo ligado al inicio de la madurez sexual en las ratas hembras, ya que en las ratas macho, si bien están presentes, los neurofilamentos se expresan en menor cantidad.

Al llegar la madurez sexual algunos de los cambios fisiológicos más notables son aquellos relacionados con las hormonas sexuales, sus efectos en diversos órganos y el comienzo de la etapa reproductiva. Estos cambios hormonales marcan algunas de las diferencias entre los machos y las hembras (ver dimorfismo sexual, anexo1), que de cierta forma podrían estar produciendo el dimorfismo sexual observado en la expresión de los marcadores neuronales en la adenohipófisis.

En el caso de las ratas hembras, el ciclo reproductor se divide como ya se mencionó en: diestro, fase del ciclo durante la cual la progesterona ejerce una influencia dominante en los órganos accesorios y, la secreción de estrógenos es el resultado de la interacción entre las hormonas gonadotrópicas y el desarrollo del folículo. El proestro, durante el cual la actividad secretora del cuerpo luteo declina y los órganos reproductores se encuentran bajo la influencia de

los folículos y de las hormonas gonadales; debido al incremento de la secreción de estrógenos (que comienza en el diestro; fig. 21), se presenta una acumulación de fluidos en el útero y un aumento en la LH, que ocasiona la ovulación y el inicio de la formación del cuerpo lúteo. El estro está definido conductualmente como la fase del ciclo durante la cual la hembra es receptiva al coito; en esta fase, se presenta un crecimiento rápido y cornificación (queratinización celular) del epitelio vaginal estimulado por estrógenos. El metaestro o diestro 1, es un estado de transición corto posterior a la ovulación en el cual, los niveles circulantes de estrógenos son bajos, y por ende sus efectos declinan al tiempo que la secreción de progesterona comienza a incrementarse (43-45).

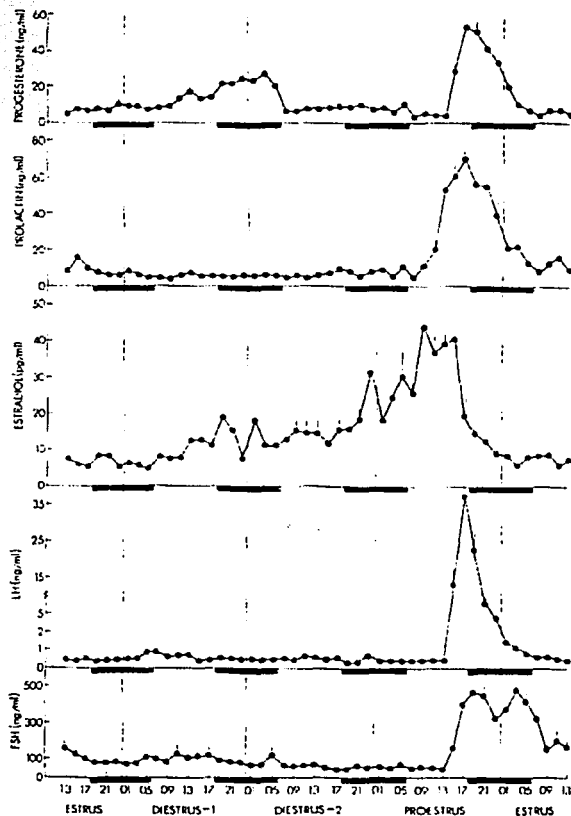


Fig. 21. Perfil hormonal de prolactina, estradiol, LH y FSH a través de los 4 días del ciclo estral. Las barras negras representan el período de oscuridad (1800-0600 h) y las líneas puntcadas marcan la medianoche (tomada de cita 46).

Las células adenohipofisarias, especialmente los lactotrofos (47, 48) y los gonadotrofos (49, 50), son regulados por varios factores, entre los cuales están los estrógenos, que inducen entre otras cosas, la transdiferenciación de los lactosomatotrofos en lactotrofos (fig. 4; 51) y estimulan la proliferación de lactotrofos (52). También induce la expresión de galanina (53), péptido vasoactivo intestinal (54) y el gen c-fos (55), además de incrementar el número de células positivas a neurotensina (56). En este estudio se demuestra que la expresión de NFs en la adenohipófisis es de igual forma dependiente de los estrógenos y que está regulada por los cambios que éstos sufren durante el ciclo estral, observándose el máximo de expresión en el estro, moderada expresión en el diestro y baja en el proestro. Como se muestra en la figura 21, es durante esta última etapa del ciclo (8 horas antes del inicio del estro) que los niveles estrogénicos plasmáticos alcanzan un pico máximo (4.7 ng/ml), esto implicaría que dado que la máxima expresión de neurofilamentos se observó durante el estro, la síntesis y/o polimerización de NFs en las células hipofisarias tiene un retraso con respecto a la elevación de los niveles estrogénicos, decayendo lentamente después de que los niveles estrogénicos disminuyen en el estro y hasta alcanzar el mínimo al volver a llegar al proestro. Este retraso en la expresión de neurofilamentos con respecto al pico máximo de estradiol aparentemente podría indicar que son otros factores, más que el estradiol, los que están influyendo en la expresión de neurofilamentos. Sin embargo, como se discutirá más adelante, los resultados de las ratas ovariectomizadas y las manipulaciones con 17 β -estradiol y tamoxifén, apoyan la idea de que el estradiol regula de manera directa o indirecta la expresión de los neurofilamentos.

Los esteroides sexuales (estrógenos y andrógenos) son producidos principalmente en los ovarios y testículos. La producción ovárica de esteroides depende de la biosíntesis de colesterol y de su transporte a través de la circulación. En respuesta a la secreción de gonadotropinas hipofisarias, varios compartimentos foliculares interactúan de forma integrada para convertir el colesterol en esteroides. En el ovario las células de la teca interna poseen todas las enzimas necesarias para la biosíntesis de andrógenos, y las células de la granulosa son capaces de producir progestinas y de aromatizar los andrógenos para convertirlos en estrógenos. Dado que el receptor de FSH está presente únicamente en las células granulosas, esta hormona regula la actividad de la aromatasas que transforma finalmente la androstenediona a estradiol y la LH estimula la biosíntesis de andrógeno a partir de colesterol en las células de la teca interna. Al

extraer quirúrgicamente los ovarios de la rata, los niveles de estradiol decaen significativamente y con ello también decae la expresión de neurofilamentos en las ratas ovariectomizadas, hasta ser intermedia a la observada en ratas hembras de 45 días y machos. A pesar de que la extirpación de los ovarios podría modificar algunos otros factores y hormonas, la recuperación de la expresión de neurofilamentos con el tratamiento de ratas OVX con 17 β -estradiol refuerza la idea de que es el estradiol el que de alguna forma regula la expresión de los neurofilamentos y produce su expresión sexualmente dimórfica.

En los machos la principal fuente de estradiol se produce por la aromatización local de testosterona a 5 α -DHT (dihidrotestosterona) o a estradiol. Esta metabolización está regulada por los esteroides gonadales (anexo 1). La castración supusimos debe producir una caída en la concentración plasmática de testosterona, que de alguna forma puede inhibir el efecto del estradiol sobre la expresión de neurofilamentos. Sorprendentemente, tanto en las ratas macho castradas como en las ratas controles de la operación, la expresión de NF68 aumentó moderadamente. La explicación más simple a este hecho, podría ser que el estrés asociado a la manipulación y la cirugía incrementaran los niveles estrogénicos plasmáticos. En estos animales, se sabe que el estrés incrementa los niveles de corticosterona y progesterona plasmáticas y que la testosterona y la androstenediona disminuyen en concordancia con la caída en la actividad enzimática de las células de Leydig (58). Igualmente, se ha reportado que el estrés estimula la liberación de ACTH y PRL de las células adenohipofisarias de la rata macho (59 y 60). Es posible que el estrés y la estimulación de los corticotropos y lactotropos en las ratas macho operadas control y castradas, pueda explicar la pequeña elevación en la expresión de NF68 en el cultivo de estas células. Este fenómeno no nos permitió evaluar claramente el efecto neto que la castración tiene sobre la expresión de los neurofilamentos. No obstante, si pudimos constatar que la aplicación de 17 β -estradiol aumento aún más la expresión del marcador.

Numerosos estudios han documentado la importancia de los esteroides gonadales para la diferenciación sexual de las funciones neuroendocrinas, cognitivas y de comportamiento (ver anexo 1; 61 y 62). Además, se ha reconocido que los estrógenos constituyen factores de crecimiento neural, con acciones semejantes a las que tienen la familia de las neurotrofinas y péptidos tróficos (58 y 59). Los estrógenos desempeñan diferentes funciones en la glándula

hipofisiaria, incluyendo la proliferación celular y la regulación de la síntesis hormonal, además de que aumenta la expresión del propio receptor a estrógenos (RE) en la glándula (63). El mecanismo mediante el cual los estrógenos regulan tal variedad de funciones no está cabalmente comprendido todavía. Se sabe que los estrógenos se unen a receptores intracelulares (REs) ocasionando su dimerización y activación e interacción con elementos de la maquinaria de transcripción en el DNA que activan o inhiben la expresión de los genes regulados por estrógenos (64). Hasta ahora se han reportado la existencia de al menos 2 de estos receptores RE- β y RE- α . A pesar de que la mayoría de las veces se ha descrito que la ubicación de estos receptores es intranuclear, existen cada vez más evidencias que demuestran acciones estrogénicas independientes del proceso de transcripción y que dependen de receptores localizados en la membrana plasmática (65 y 66). La baja o nula expresión de neurofilamentos observada en las células adenohipofisarias de ratas tratadas con tamoxifén (antagonista estrogénico), sugieren que el efecto del estradiol está mediado por la unión de éste a sus receptores. Sin embargo, no explica porque la respuesta relativamente retrasada.

El efecto tardío y sostenido de los estrógenos en la hipófisis contrasta con sus efectos en el útero, en donde éstos inducen una activación inmediata y temprana de genes y donde la activación de genes asociados a la estructura celular y el metabolismo es rápida y transitoria (57). Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento prolongado con estrógenos estimula la expresión de c-fos en lactotopos y células foliculo estrelladas en la adenohipofisis (55). Podríamos especular que c-fos puede mediar tanto el incremento de la expresión del gen de prolactina como la estimulación de la síntesis de proteína de NFs inducida por estrógenos, aunque esta especulación requiere ser comprobada experimentalmente. Otra explicación al retraso observado, podría ser que el estradiol esté actuando sinérgicamente con otros factores o esté regulando la expresión de un segundo elemento. En el caso de las neuronas, se ha propuesto que este mecanismo puede explicar el incremento de la expresión del gen de neurofilamentos en las neuronas de ganglio dorsal de ratas hembras, en donde se coexpresan los receptores de RE y trkA para NGF (60), resultando en la regulación diferencial y recíproca de la transcripción de los receptores por ambos ligandos (61 y 67).

Estudios con inmunocitoquímica (68), hibridización *in situ* (69) y de RT-PCR (66) han mostrado que del 60 al 70% de las células del lóbulo anterior de la hipófisis expresan REs, tanto en las ratas hembras como en las macho (70 y 71). Además, un porcentaje alto de estas células sintetiza tanto los factores tróficos como sus receptores, en particular, se ha reportado que el receptor *trkA* (receptor de alta afinidad para NGF) está presente en todos los fenotipos celulares de la adenohipófisis (72) y, cerca del 30% de las células del lóbulo anterior muestran inmunoreactividad a NGF (73). Estos datos sugieren que algunas de estas células pueden ser blanco del estradiol y a su vez de la acción del NGF ya sea autócrina o parácrinamente. En este sentido, algunos resultados obtenidos recientemente en el laboratorio, sugieren que al menos *in vitro* el NGF por sí solo no es capaz de regular la expresión de neurofilamentos en las células adenohipofisarias. Sin embargo su posible relación con el estradiol o su efecto *in vivo* no está determinada.

¿El efecto del estradiol en las células de la hipófisis es directo o indirecto?

Como pudo verse en los cultivos primarios de células hipofisarias, la expresión de NF presenta una pérdida dependiente del tiempo (fig. 13). Esto es que, después de 6 días en cultivo, la expresión de NF decae a niveles comparables a los que presentan las células de ratas macho o las de ratas hembras inmaduras. Esta pérdida no se pudo evitar cuando los cultivos fueron suplementados con 17β -estradiol. Estos resultados indican que, al menos en cultivo, el estradiol no es capaz de actuar de manera directa en la expresión de los neurofilamentos en las células adenohipofisarias. Sin embargo, en este sentido, Allen y colaboradores (74) también mostraron que no es posible inducir la expresión de *c-fos* por estradiol en cultivos de células hipofisarias. El hecho de que se haya reportado que el efecto directo de los estrógenos en los lactotropos aumenta al alterar los factores hipotalámicos que afectan estas células (75-77) nos da un indicio de que, probablemente, la optimización de las condiciones de cultivo podría revelar algunos efectos directos de los estrógenos (78).

Finalmente, resultan interesantes los resultados de la expresión de NF68 en adenohipófisis de ratas hembras embarazadas en donde el pico de estradiol es semejante al que

se produce durante el proestro (fig. 14 y 21), pero el tiempo en el que alcanza este punto es de 5 días y su duración es del al menos 3 días. El hecho de que la expresión de neurofilamentos al final del embarazo no fuese significativamente diferente al de la rata virgen y que en las células adenohipofisarias de ratas hembras con 7 días posparto la expresión de neurofilamentos es semejante a la observada en células de ratas en estro, confirma el retraso que se presenta en el aumento en la expresión de neurofilamentos y la necesidad de que se produzca un pico de estradiol, ya que a pesar de que el aumento en el estradiol es más paulatino y dura más tiempo (fin del embarazo y de 2 a 3 días pos parto; fig. 14 y 21) la mayor expresión se presenta hasta el posparto y una vez que se da un aumento de al menos 2 nM/l (fig. 14 y 21). Así, podemos decir que la expresión de neurofilamentos se dispara al llegar el estradiol a cierta concentración y no se ve potenciada por la duración del estímulo. Algunos resultados obtenidos en células adenohipofisarias de ratas hembras amamantando diferente número de crías, dejan ver que la expresión de neurofilamentos puede decaer aún más rápidamente si el número de crías es muy bajo (2) o no tiene crías.

Así, con estos indicios, todavía resta por determinarse si la regulación de los estrógenos sobre la expresión de NF se da a través de incrementar la sensibilidad (aumentando la expresión del receptor o actuando sinérgicamente a través del mismo camino de segundos mensajeros) de las células adenohipofisarias a las neurotrofinas u otros factores tróficos y si cualquiera de estas dos vías requieren de un periodo específico de tiempo.

Identificación de las poblaciones celulares hipofisarias que expresan neurofilamentos.

En los cultivos primarios de células de la adenohipófisis de ratas hembras sexualmente maduras, la población de células positivas a NF68 se encontraron en proporciones que varían de $11.7 \pm 2\%$ en somatotropos a $33.1 \pm 8\%$ en tirotropos. En este sentido, recientemente se ha reportado que los neurofilamentos de alto peso molecular (200 kDa) que se coensamblan con los de 68 kDa, están presentes en el 13% de los tirotropos en ratas control y que su expresión se aumenta a 75% en ratas hipotiroideas (20). Nuestros resultados demuestran que la expresión

específica de marcadores neuronales no es exclusiva de un tipo celular adenohipofisario, sino que todos los fenotipos endocrinos contienen una subpoblación de células que expresan NFs. Por los resultados obtenidos de la identificación de células que expresan neurofilamentos en células adenohipofisarias de ratas con siete días posparto y de los resultados obtenidos por Quintanar y colaboradores (20), podemos decir que el porcentaje de células positivas a los marcadores neuronales en cada tipo celular varía dependiendo de la condición fisiológica. Los factores que determinan estas variaciones y que podrían ser independientes del estradiol restan por conocerse.

Trabajos recientes con interrupción de la expresión genética (*knockout*) han mostrado que las subunidades de NF de diferente peso molecular tienen diferentes funciones en el ensamblaje de los neurofilamentos y el crecimiento radial de los axones en células nerviosas, y que las mutaciones de los genes de neurofilamentos están involucradas en algunos modelos de muerte neuronal en ratón (78). Sin embargo, el rol funcional de los neurofilamentos en células no neuronales no se ha examinado a detalle. Recientemente se ha sugerido que el incremento en la expresión de NFs en las células hipofisarias puede afectar la tasa de secreción de TSH y otras hormonas (22). Asimismo, las diferencias sexuales en la expresión de marcadores neuronales en las células adenohipofisarias de animales maduros, puede incluir cambios en el número de receptores hormonales o función además de producir cambios en la secreción hipotalámica y/o hipofisaria. Así, la hipófisis puede ser una vía a través de la cual los esteroides actúan para producir diferencias sexuales en la propia adenohipófisis.

Durante muchos años se pensó que las diferencias entre las células de la glándula adenohipofisaria solamente dependían del tipo de hormona que cada una secreta, e inicialmente se planteó que cada tipo celular secretaba sólo un tipo de hormona. Con el tiempo y el avance de las metodologías y los instrumentos de estudio, algunas de estas ideas empezaron a cambiar y se encontró que hay células que pueden sintetizar y secretar más de una hormona (lactosomatotropos o los gonadotropos que secretan FSH y LH) y que estas mismas células pueden cambiar el tipo de hormona secretada dependiendo mayoritariamente de factores fisiológicos como la edad, el sexo, la fase del ciclo reproductivo, etc. Ahora, se considera bien establecido que las células de la adenohipófisis representan una población celular muy heterogénea y por lo tanto la cabal comprensión de los mecanismos de regulación y organización

de esta heterogeneidad se ha vuelto más complejo (ver anexo 3). En el caso de las células que expresan neurofilamentos bajo una regulación estrogénica dependiente del ciclo estral se necesitan más investigaciones para poder entender el significado funcional (si es que existe alguno) de esta subpoblación de células.

Conclusiones

Estos resultados demuestran incuestionablemente que las células adenohipofisarias de rata expresan marcadores neuronales como los neurofilamentos de 68 y 200 kDa, así como MAP2. Los NF68 se expresan en gonadotropos, tirotropos, lactotropos y somatotropos de las ratas hembras adultas y los niveles de expresión dependen de la edad y el sexo. La expresión de neurofilamentos cambia en respuesta a manipulaciones endocrinas que modifican tanto las concentraciones de las hormonas ováricas, en especial del estradiol, como la inhibición de su acción por medio del tratamiento con drogas antiestrogénicas. Dado que los NF68 son más abundantes en células adenohipofisarias de ratas hembras, se puede concluir que la distribución de NF68 en las células adenohipofisarias es sexualmente dimórfica y sugiere un rol fisiológico diferente para esta subpoblación de células positivas a NF68.

REFERENCIAS

1. Saland LC. The mammalian pituitary intermediate lobe: a update on innervation and regulation. *Brain Res Bull.* 2001; **56**:587-593.
2. Carbajo S, Gonzalez del Pozo, Carbajo-Perez E. Quantification of the cellular proliferation on freshly dispersed cells from rat anterior pituitaries after in vivo and in vitro labeling with bromodeoxyuridine. *Histochemical J.* 1992; **24**:137-143.
3. Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fuji T, Morii S. Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrous cycle, and circadian change. *Anat Record.* 1993; **235**:11-120.
4. Borrelli E. Pitfalls during development: controlling differentiation of the pituitary gland. *Trends Genet.* 1999; **10**:222-224.
5. Asa S, Ezzat S. Molecular determinants of pituitary cytodifferentiation. *Pituitary.* 1999; **1**: 159-168.
6. Takor T, Pearse AG. Neuroectodermal origin of avian hypothalamo-hypophyseal complex: the role of the ventral neural ridge. *J Embryo Exp Morph.* 1975; **34**:311-325.
7. Eagleson G, Jenks B, Van Overbeeke AP. The pituitary adrenocorticotropes originate from neural ridge tissue in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morph.* 1986; **95**:1-14.
8. Ogawa A, Sugihara S, Nakanishi Y, Suzuki S, Sasaki A, Hirato J, Nakazato Y. Intermediate filament expression in non-neoplastic pituitary cells. *Virchows Archiv B Cell Pathol.* 1990; **58**:331-340.
9. ElAmraoui A, Dubois PM. Experimental Evidence for the early commitment of the presumptive adenohypophysis. *Neuroendocrinology.* 1993; **58**:609-615.

10. Dubois PM, ElAmraoui A. Embryology of the Pituitary Gland. *TEM*. 1995; **6**:1-7.
11. Tooze J, Hollinshead M, Fuller SD, Tooze SA, Huttner WB. Morphological and biochemical evidence showing neuronal properties in AtT-20 cells and their growth cones. *Eur J Cell Biol*. 1989; **49**:259-273.
12. Trojanowski JQ, Gordon D, Obrocka M, Lee MY. The developmental expression of neurofilament and glial filament proteins in the human pituitary gland: An immunohistochemical study with monoclonal antibodies. *Brain Res*. 1984; **13**:229-239.
13. Halliday WC, Asa SL, Kovacs K, Scheithauer BW. Intermediate filaments in the human pituitary gland: an immunohistochemical study. *Can J Neurol Sci*. 1990; **17**:131-136.
14. Bäck N, Tyynelä M, Portier MM, Virtanen I, Soinila S. Distribution of neurofilament proteins and peripherin in the rat pituitary gland. *Neurosci Res*. 1995; **22**:267-275.
15. Amara Y, Danniels P. 17 β -estradiol has a biphasic effect on GH cell growth. *Endocrinology*. 1983; **112**:1141-1143.
16. Hernández-Cruz A, Escobar A, Jiménez N. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the rate of rise of trigger Ca^{2+} . *J Gen Physiol*. 1997; **109**:147-167.
17. Yoshinaga K, Hawkins RA, Stocker JF. Estrogen secretion by the rat ovary *in vivo* during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology*. 1969; **85**:103-112.
18. Friend K, Resnick E, Ang L, Shupnik M. Specific modulation of estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary throughout the estrous cycle and in response to steroid hormones. *Mol Cell Endocrinol*. 1997; **131**:147-155.

19. Donath J, Nishino Y. Effects of partial versus pure antiestrogens on ovulation and the pituitary-ovarian axis in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998; **66**:247-254.
20. Salinas E, Quintanar J. Neurofilaments in thyrotrophs of hypothyroid rats: An immunohistochemical study. *Endocrine Pathol.* 2000; **11**:195-200.
21. Lewis C, Gillete-Ferguson I, Ferguson D. An indirect immunofluorescence procedure for staining the same cryosection with two mouse monoclonal primary antibodies. *J Histochem Cytochem.* 1993; **41**:1273-1278.
22. Quintanar J, Salinas E. Neurofilament expression in cultures rat adenohypophysial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2001; **11**:27-32.
23. Tixier-Vidal A, Gourdji D, Tougard C. A cell culture approach to the study of anterior pituitary cells. *Int Rev Cytol.* 1975; **41**:173-239.
24. Yang HY, Kriho V, Lieska N, Pappas GD. Immunomicroscopy of neurofilaments in chomaffin cells of the adult bovine adrenal gland. *J Comp Neurol.* 1996; **371**:461-468.
25. Orpen BG, Furman N, Wong PY, Fleming AS. Hormonal influences on the duration of postpartum maternal responsiveness in the rat. *Physiol Behav.* 1987; **40**:307-315.
26. Childs G., Unabia G., Komak S. Differential expression of estradiol receptors alpha and beta by gonadotropes during the estrous cycle. *J Histochem Cytochem.* 2001; **49**: 665-666.
27. Fallest P, Schwartz N. Acute inhibitory effects of 17 β -estradiol are observed on gonadotropin secretion from perfused pituitary fragments of metestrous, but not proestrous, rats. *Endocrinology.* 1991; **128**:273-279.

28. Moreira RM, Lisboa PC, Curty FH, Pazos-Moura CC. Dose-dependent effects of 17-beta-estradiol on pituitary thyrotropin content and secretion in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 1997; **30**:1129-34.
29. Demay F, Geffroy S, Tiffoche C, Monti M, Thieulant ML. Cell-specific mechanisms of estrogen receptor in the pituitary gland. *Cell Biol and Toxicol.* 1996; **12**:317-324.
30. Burger HG. Selective oestrogen receptor modulators. *Horm Res.* 2000; **Suppl 3**:25-2.
31. Mohamed MK, Abdel-Rahman AA. Effects of long term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *Eur J Endocrinol.* 2000; **142**:307-314.
32. Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer.* 1999; **6**:131-137.
33. Davidge S, Zhang Y, Stewart KA. Comparison of ovariectomy models for estrogen studies. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; **280**:R904-R907.
34. Bruce RC. Disorders of the ovary and female reproductive tract. In: Wilson and Foster ed. *Williams textbook of endocrinology.* E.U.: W.B. Saunders Company, 1995: 733-798.
35. Childs GV, Lloyd J, Unabia G, Rougeau D. Growth and secretory responses of enriched populations of corticotropes. *Endocrinology.* 1989; **125**:2540-2549.
36. Childs GV. Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes. *Mic Res Tech.* 1997; **39**:114-130.
37. Orpen G, Furman N. Hormonal influences on the duration of postpartum maternal responsiveness in the rat. *Physiology and Behav.* 1987; **40**:307-315.

38. Ogawa A, Sugihara S, Hasegawa M, Sasaki A, Nakazato Y, Kawada T, Ishiuchi S, Tamura M. Intermediate filament expression in pituitary adenomas. *Virchows Archiv B Cell Pathol.* 1990; **58**:341-349.
39. Waegh SM, Lee VM, Brady ST. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell.* 1992; **68**:451-63.
40. Dong DL, Xu ZS, Chevrier MR, Cotter RJ, Cleveland DW, Hart GW. Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *Biol Chem.* 1993; **268**:16679-87.
41. Gill SR, Wong PC, Monteiro MJ, Cleveland DW. Assembly properties of dominant and recessive mutations in the small mouse neurofilament (NF-L) subunit. *J Cell Biol.* 1990; **111**:2005-19.
42. Sihag RK, Nixon RA. In vivo phosphorylation of distinct domains of the 70-kilodalton neurofilament subunit involves different protein kinases. *J Biol Chem.* 1989; **264**:457-64.
43. Cole HH, Cupps PT. (1969) Reproduction in domestic animals. Academic Press. NY. EU. 657pp.
44. Knobil E, Hotchkiss J. (1988) The physiology of reproduction. Edited by Knobil E. and J. Neill. Raven Press, Ltd. NY. EU., 2351 pp.
45. Nalbandov A. (1969) Fisiología reproductiva. Ed. Acribia Zaragoza. España. 303 pp.
46. Smith R, Farquhar M. Lysosome function in the regulation of secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J Cell Biol.* 1974; **31**:319-347.
47. Scoville SA, Bufton SM, Liuzzi FJ. Estrogen regulates neurofilament gene expression in adult female rat dorsal root ganglion neurons. *Exp Neurol.* 1997; **146**:596-599.

47. Scoville SA, Bufton SM, Liuzzi FJ. Estrogen regulates neurofilament gene expression in adult female rat dorsal root ganglion neurons. *Exp Neurol*. 1997; **146**:596-599.
48. Sar M, Parikh I. Immunohistochemical localization of estrogen receptor in rat brain, pituitary and uterus with monoclonal antibodies. *J Steroid Biochem*. 1986; **24**:497-503.
49. Pelletier G, Liao N, Follea N, Govindan MV. Distribution of estrogen receptors in the rat pituitary as studied by in situ hybridization. *Mol Cell Endocrinol*. 1988; **56**:29-33.
50. Zafar M, Ezzat S, Ramyar L, Pan N, Smyth HS, Asa SL. Cell-specific expression of estrogen receptor in the human pituitary and its adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; **80**:3621-3627.
51. Keefer DA, Stumpf WE, Petrusz P. Quantitative autoradiographic assessment of 3H-estradiol uptake in immunocytochemically characterized pituitary cells. *Cell Tissue Res*. 1976; **166**:25-35.
52. Nishihara E, Nagayama Y, Satoshi I, Hisahiko H, Masami M, Shunichi Y, Takehiko K. Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry. *Endocrinology*. 2000; **141**:615-620.
53. Missale C, Spano PF. Nerve growth factor in pituitary development and pituitary tumors. *Front Neuroendocrinol*. 1998; **19**:128-150.
54. Patterson JC, Childs GW. Nerve growth factor and its receptor in the anterior pituitary. *Endocrinology*. 1994; **135**:1689-1696.
55. Lieberman ME, Maurer RA, Claude P, Gorski J. Prolactin synthesis in primary cultures of pituitary cells: regulation by estradiol. *Mol Cell Endocrinol*. 1982; **25**:277-294.
56. Murai I, Ben-Jonathan N. Acute stimulation of prolactin release by estradiol: mediation by the posterior pituitary. *Endocrinology*. 1990; **126**:3179-3184.

57. Turgeon JL, Waring DW. Acute progesterone and 17 β -estradiol modulation of luteinizing hormone secretion by pituitaries of cycling rats superfused in vitro. *Endocrinology*. 1981; **108**:413-419.
58. Pellegrini A, Grieco M, Materazzi G, Gesi M, Ricciardi P. Stress-induced morphohistochemical and functional changes in rat adrenal cortex, testis and major salivary glands. *Histochem J*. 1998; **30**:695-701.
59. Pignatelli D, Magalhaes MM, Magalhaes MC. Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm Metab Res*. 1998; **30**:464-474.
60. Almeida SA, Petenusci SO, Anselmo-Fraci JA, Rosa-e-Silva AA, Lamano-Carvalho TL. Decreased spermatogenic and androgenic testicular functions in adult rats submitted to immobilization-induced stress from prepuberty. *Braz J Med Biol Res*. 1998; **31**:1443-1448.
61. Davidoff MS, Middendorff R, Pusch W, Müller D, Wichers S, Holstein AF. Sertoli and Leydig cells of the human testis express neurofilament triplet proteins. *Histochem Cell Biol*. 1999; **111**:173-187.
62. Escurat M, Djabali K, Huc C, Landon F, Becourt C, Boitard C, Gros F, Portier MM. Origin of the beta cells of the islets of Langerhans is further questioned by the expression of neuronal intermediate filament proteins, peripherin and NF-L, in the rat insulinoma RIN5F cell line. *Dev Neurosci*. 1991; **13**:424-432.
63. Julien J-P, Grosveld F. Structure and expression of neurofilament genes. In: R. Burgoyne, ed. *The Neuronal Cytoskeleton*. New York: Wiley-Liss, 1991:215-231.
64. Fracy AJM, van de Klundert JMH, Bloemendal H. Intermediate filaments: regulation of gene expression and assembly. *Eur J Biochem*. 1993; **214**:351-366.

65. Benten WP, Stephan C, Lieberherr M, Wunderlich F. Estradiol signaling via sequestrable surface receptors. *Endocrinology*. 2001; **142**:1669-77.
66. Coleman KM, Smith CL. Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci*. 2001; **6**:d1379-d1391.
67. Toran-Allerand D, Singh M, Sétáló G. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol*. 1999; **20**: 97-121.
68. Shupnik MA, Gordon MS, Chin WW. Tissue specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. *Mol Endocrinol*. 1989; **3**:660-665.
69. Cullen KE, Klade MP, Seyfred MA. Interaction between transcription regulatory regions of prolactin chomatin. *Science*. 1993; **261**:203-206.
70. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*. 1981; **211**:1294-1302.
71. Kawata M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Research*. 1995; **24**:1-46.
72. Toran-Allerand D. The estrogen/neurotrophin connection during neural development: Is co-localization of estrogen receptors with the neurotrophins and their receptors biologically relevant?. *Dev Neurosci*. 1996; **18**:36-48.
73. Toran-Allerand D, Singh M, György S. Novel mechanism of estrogen action in the brain: new players in old story. *Front Neuroendocrinol*. 1999; **20**:97-121.
74. Allen D, Mitchner N, Uveges T, Nephew K, Khan S, Ben-Jonathan N. Cell-specific induction of *c-fos* expression in the pituitary gland by estrogen. *Endocrinology*. 1997; **138**:2128-2135.

75. Kineman RD, Faught WJ, Frawley FS. Steroids can modulate transdifferentiation of prolactin and growth hormone in bovine pituitary cultures. *Endocrinology*. 1992; **130**:3289-3294.
76. Hashi A, Mazawa S, Chen S, Yamakawa K, Kato J, Arita J. Estradiol-induced diurnal changes in lactotroph proliferation and their hypothalamic regulation in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 1996; **137**:3246-3252.
77. Shen E, Hardenburg JL, Meade EH, Arey BJ, Merchenthaler I, López J. Estradiol Induces Galanin Gene Expression in the pituitary of the mouse in a estrogen receptor alpha-dependent manner. *Endocrinology*. 1999; **140**:2628-2631.
78. Shupnik MA, Gharib SD, Chin WW. Divergent effects of estradiol on gonadotropin gene transcription in pituitary fragments. *Mol Endocrinol*. 1989; **3**:474-480.
79. Julien JP. Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiology*. 1999; **9**:554-560.

ANEXO I

DIMORFISMO SEXUAL EN EL SISTEMA NERVIOSO

La mayoría de las especies animales tienen dos diferentes formas sexuales (hembras y machos) que generalmente exhiben una conducta dimórfica. Con regularidad, los patrones más complejos de actividad que tiene un animal (el cortejo, el apareamiento, la crianza, etc.) son específicos para cada sexo. Sin embargo, de todos estos patrones con diferencias sexuales, es necesario distinguir cuáles son directamente generados por la determinación sexual propia del organismo y cuáles se adquieren secundariamente como resultado del aprendizaje o imitación.

Desde hace muchos años, la observación de las diferencias en el comportamiento entre hembras y machos, llevó a plantear la idea de que sus cerebros debían de presentar diferencias anatómicas y funcionales. Desde entonces, el dimorfismo sexual en el sistema nervioso se ha descrito en cada nivel posible (molecular, ultraestructural, celular, etc.) según el desarrollo científico y tecnológico (tabla 1). Las diferencias que existen no sólo comprenden la presencia o ausencia de un tipo celular, sino a un conjunto de características como el volumen de un núcleo neuronal, dado por las diferencias en el número absoluto de neuronas, la densidad y tamaño de neuronas en lo individual. Dichas diferencias no se encuentran concentradas en una sola estructura, sino que están repartidas en el sistema nervioso (tabla 2).

Se han propuesto muchos modelos para explicar el desarrollo de las diferencias sexuales en el cerebro de los vertebrados y las consecuencias que éstas acarrearán en el comportamiento. Muchos autores han establecido que la mayoría de las diferencias sexuales son controladas por las hormonas. El desarrollo de las diferencias sexuales en el sistema nervioso es un proceso en el cual intervienen múltiples factores. Este empieza con un periodo de determinación sexual primario, en el cual los factores ambientales (en el caso de tortugas y reptiles en general) o genéticos (la mayoría de los organismos; mamíferos XX y XY; pájaros ZZ y ZO; etc.) determinan el sexo gonadal. La determinación del sexo de las gónadas hace posible la producción y secreción de las hormonas esteroideas gonadales (andrógenos y estrógenos) de lo cual depende el patrón para hembra o macho. La acción epigenética de los esteroides gonadales, es una de las determinantes en la diferenciación sexualmente típica del cerebro, que inicialmente es

monomórfico (igual en las hembras y en los machos) (Hodgkin 1991; Breedlove 1992; Anderson 1993; LeDouarin et al. 1993; McEwen 1994b).

Sin embargo, existen comportamientos sexualmente dimórficos, que no están tan claramente asociados a las funciones gonadales. Por ejemplo, en humanos algunas funciones cognitivas (percepción, memoria, lógica, etc.) (Springer y Deutsch 1998), o las diferencias sexuales que se presentan en las neuronas mesencefálicas e hipocampales del embrión de rata y ratón, observadas *in vitro* en el desarrollo morfológico y funcional sin la presencia de esteroides sexuales (Reisert et al. 1991; Pilgrim et al. 1994; Siburg et al. 1996).

En la mayoría de los casos las estructuras sexualmente dimórficas del sistema nervioso en mamíferos, se debe a que en las hembras son más grandes en volumen y contienen más células que en los machos. La ausencia de testosterona sobre todo en etapas tempranas del embrión, hace que el sistema nervioso se desarrolle pasivamente en un modo femenino primario; la presencia de testosterona induce la masculinización del cerebro, indicando que en estos casos, el dimorfismo sexual del cerebro está mediado por la acción epigenética de los esteroides gonadales (Gurney et al. 1980; MacLusky et al. 1981; Kirn et al. 1989; Simpson et al. 1991a, b; Burek et al. 1995; Kawata et al. 1995).

El descubrimiento de la actividad paradójica de los estrógenos mimetizando el efecto de los andrógenos, permitió que se desarrollara la teoría de la aromatización. Esta teoría, propone que algunas áreas del cerebro (al igual que la placenta) son capaces de convertir testosterona a 5 α -DHT (dihydrotestosterona) o a estradiol. La metabolización de la testosterona, está regulada por los propios esteroides gonadales (figura 1). En los mamíferos, la actividad de la aromataasa neuronal se encuentra regulada por los andrógenos a través de su receptor específico. Para el desarrollo femenino del cerebro, se requieren niveles locales bajos de estrógenos, mientras que para la masculinización del cerebro se requieren de niveles altos de estrógenos (Simerly 1991; Beyer et al. 1993; McEwen 1994 b; Kawata 1995).

Estudios inmunocitoquímicos utilizando anticuerpos específicos contra la aromataasa, demostraron que durante el período neonatal temprano y prenatal las neuronas que contienen esta

enzima, están distribuidas en el núcleo preóptico medio y periventricular, en el fondo del núcleo de la estria terminal y, en el núcleo medial amigdalóide (Shinoda et al. 1994). Esto sugiere que la aromatasa neuronal juega un papel muy importante en el dimorfismo sexual de estas áreas. Después del estado infantil, la actividad de la aromatasa se incrementa en el *septum* lateral, en el fondo del núcleo de la estria terminal y en el núcleo central amigdalóide (Jakab et al. 1993). El análisis con microscopía electrónica, ha permitido determinar la presencia de la aromatasa en la membrana nuclear y la membrana del retículo endoplásmico (Shinoda et al. 1994), sugiriendo que la conversión de andrógenos a estrógenos ocurre antes de entrar al núcleo y unirse al receptor nuclear específico.

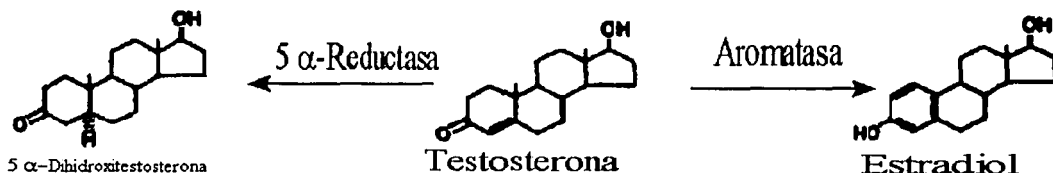


Fig 1. Esquema que ilustra la metabolización de la testosterona a estradiol, por la enzima aromatasa y a 5 α -dihydrotestosterona (5 α -DHT) por la enzima 5 α reductasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1
Parámetros de dimorfismo sexual

Macroscópicos

volumen, peso, tamaño y simetría del Cerebro.
largo de la medula espinal
forma y tamaño regional
conexión de fibras

Microscópicos

Neuronas

número de células
tamaño
núcleo y nucleolo
árbol dendrítico
organización sináptica
(densidad, tipo, salida axonal)
Glia
velocidad de diferenciación
forma y citoesqueleto

Fenotípicos

Péptidos, enzimas, proteínas, mRNAs

Tabla 2
Regiones sexualmente dimórficas

Telencefalo

Núcleos relacionados con el canto
CVA (en español), HVC (en inglés)
RA

Neocorteza

corteza primaria motora, corteza sensorial, corteza visual
bulbo olfatorio accesorio (NBBOA)
núcleo basal de la *stria terminalis* (NBST)
núcleos amigdaloides (MeA y McApd)
hipocampo y giro dentado
comisura anterior
cuerpo caloso

Diencefalo

Área preóptica
NAPV-APO, AVPN-POA (en inglés)
NSD-APO, SDN-POA (en inglés)

Hipotálamo

núcleo intersticial del hipotálamo anterior
núcleo supraquiasmático
núcleo supraóptico
núcleo ventromedial (HVM)
núcleo arcuato

Massa intermedia

Mesencefalo

Substancia negra

Rombencefalo

Locus coeruleus

Cuerda espinal

Núcleo intermediolateral
Núcleo estriado bulbocavernoso (NEBC)
Núcleo de Onuf

Sistema nervioso periférico

Ganglio cervical superior
Ganglio pélvico
Ganglio hipogástrico

En este trabajo, se describirán algunos de los modelos de dimorfismo sexual que han sido más ampliamente estudiados.

I.- Aves.

Muchas características fenotípicas de las aves son sexualmente dimórficas. Las hembras parecen escoger a los machos según como defienden su territorio, la complejidad de sus cantos, el plumaje o los ornamentos físicos. La mayoría de estos comportamientos en hembras y machos están controlados por los esteroides gonadales. Sin embargo, a pesar de que pareciera que esto significa que el comportamiento típico femenino está controlado por estrógenos y que el de los machos está controlado por andrógenos, ya habíamos mencionado que la testosterona puede funcionar como una prehormona que puede sufrir una conversión hacia estrógenos en el cerebro, siendo éstos críticos para el desarrollo del cerebro del macho (Balthazart et al. 1996; Schlinger et al. 1998). El hecho de que los comportamientos masculinos y femeninos sean activados por la misma hormona, implica que deben existir diferencias en los mecanismos locales por medio de los cuales los estrógenos pueden tener diferentes efectos. Las diferencias en el comportamiento dimórfico se pueden deber tanto a la secreción hormonal por sí sola como a las respuestas que tienen los cerebros de los machos y las hembras pueden tener a los esteroides gonadales. Dentro de los variados comportamientos que presentan dimorfismo sexual en las aves, el comportamiento reproductivo de la codorniz Japonesa macho y el canto del pinzón cebra macho, son los que más se han estudiado. De estos dos, en esta revisión haremos referencia el canto del pinzón cebra.

1.1.- El canto del pinzón cebra

El estudio del control del canto en las aves, fue de los primeros en demostrar diferencias sexuales anatómicas en el cerebro de algún vertebrado.

El pinzón macho adulto canta una canción que aprende durante su desarrollo, generalmente de sus padres o de la interacción con otros machos (Zann et al. 1990). La expresión del canto en el adulto es dependiente de las hormonas esteroideas; los machos castrados cantan

menos que los machos normales y la administración de testosterona restaura el canto en los machos castrados (Arnold 1975). A diferencia de lo que se ha podido observar en muchas otras especies, en donde las hembras naturalmente cantan o el canto puede ser inducido con el tratamiento de testosterona (Nottebohm 1980; Gurney et al. 1980; Simpson et al. 1991; Shlinger 1998; Gah et al. 1999). Las hembras pinzón no cantan ni el control nervioso del circuito de canto se modifica aun cuando exista una manipulación endocrina en la vida temprana del embrión que produce el desarrollando de grandes cantidades de tejido testicular (Wade et al. 1996). Es por ello, que algunos autores (Baltahazart et al. 1995; Casto et al. 1996; Arnold et al. 1996, 1997; Wade et al. 1996; Schlinger 1998) han sugerido mecanismos gonadales independientes de esteroides para la diferenciación sexual del circuito de control vocal en el pinzón cebra.

En el pinzón y en el canario se ha demostrado que las áreas del cerebro que están relacionadas con el control del canto (denominado núcleo de control de canto) son seis veces mayor en el macho que en la hembra; estas diferencias pueden notarse en cortes de cerebro (Nottebohm et al. 1976a; Brenowitz et al. 1985).

El núcleo de control del canto, (que contempla el control vocal) está constituido por dos circuitos; el primero es una vía motora para la producción del sonido y está compuesto a su vez por tres partes; el *hiperestriatum* ventral y caudal, conocidos como el centro vocal alto (CVA en español y *higher vocal center* CVA); el núcleo robusto del *archistriatum* (RA), ambos ubicados en el prosencéfalo posterior; y la porción traqueosiringeal del núcleo hipoglosal (nazi) en el bulbo raquídeo (Gurney 1982; Kawata 1995; Schlinger 1998). Las neuronas del RA reciben entradas del CVA, y algunas de ellas proyectan hacia las moto neuronas de nazi. Estas moto neuronas envían sus axones directamente a los músculos de la siringe que produce los sonidos que forman el canto. El segundo circuito del sistema de canto está a su vez integrado por tres partes: el prosencéfalo anterior (que consiste del Área X), la porción media del núcleo dorsolateral del tálamo; y la porción lateral del núcleo magnocelular del *neostriatum* anterior que indirectamente conecta CVA a RA (Arnold 1992; Schlinger 1998). Este camino del prosencéfalo anterior, es esencial para el aprendizaje del canto (Bottjer et al. 1986, 1988; Arnold 1992; Doupe 1993; Schlinger 1998; figura 2). En las especies de aves en las cuales tanto la hembra como el

macho cantan, estas regiones del cerebro son monomórficas o muy poco diferentes (Brenowitz et al. 1985; Gah et al. 1998).

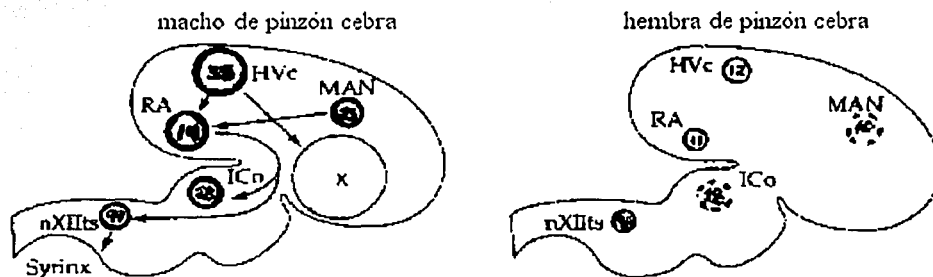


Fig 2. Diagrama que muestra las áreas neuronales que están involucradas en el control del canto en el pinzón cebra. Los círculos representan las áreas específicas del cerebro; el tamaño de cada círculo es proporcional con el volumen que ocupa esa región. Los círculos con líneas punteadas son volúmenes estimados. Los números en cada círculo representan el porcentaje de células que incorporan testosterona marcada. Las diferencias de volumen entre los machos y las hembras son significativas en tres de las áreas (CVA, RA y nazi), el área X no se ha observado en el cerebro de las hembras pinzón. Las flechas indican la conexión axonal entre las diferentes regiones en el cerebro del pinzón macho. Tomado de Developmental Biology, Gilbert 1997.

El dimorfismo sexual del circuito motor, puede deberse a la acción hormonal durante la neurogénesis. Los núcleos RA y CVA son mucho más grandes en volumen en el macho adulto que en la hembra, cuyo canto es mucho menos elaborado (figura 3). Las características sexualmente dimórficas en el sistema de canto, incluyen no solo el volumen de los diferentes núcleos, también implican el número y tamaño de las neuronas de estos núcleos, su capacidad de ligar andrógenos y su conectividad. Individualmente, las neuronas de estos núcleos son mucho más grandes, y tienen mayores extensiones dendríticas y conectividad sináptica en los machos que en las hembras (DeVoogd et al. 1981; Arnold, 1992). La aparición inicial del receptor de andrógenos en CVA, es inicialmente dimórfica, no así para el receptor de estrógenos (Gah et al. 1999).

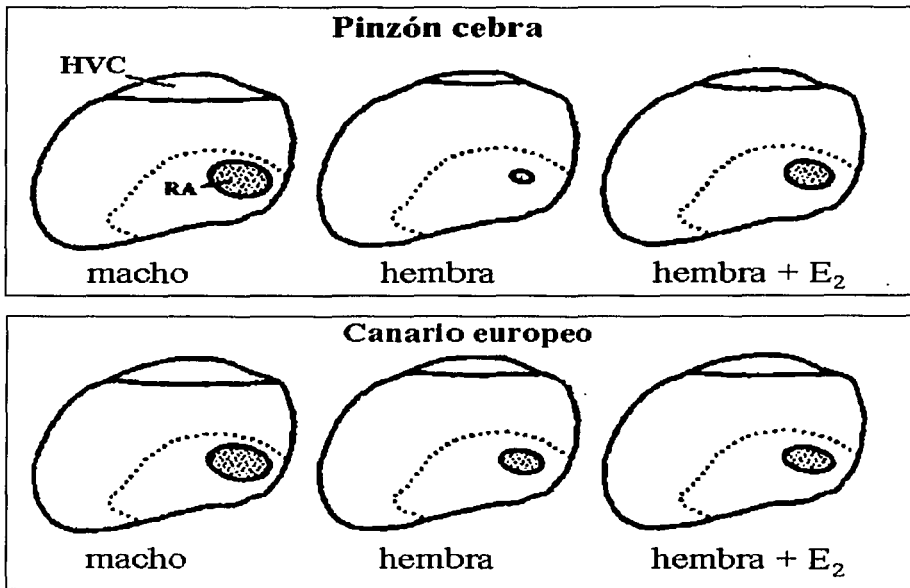


Fig 3. Esquema que ilustra el hemisferio izquierdo telencefálico del núcleo de canto del pájaro, en una sección coronal. El diagrama muestra el tamaño relativo de los 2 núcleos (CVA, *claro* y RA, *oscuro*), en adultos normales macho y hembra y en hembras a las que se trató con estradiol (E₂). Esquema tomado de Schlinger 1998.

Durante la época reproductiva (primavera) los adultos machos, generan un canto compuesto de patrones estereotipados de sonidos individuales, denominados sílabas. Estos patrones fijos de sílabas son denominados sonidos estables. Durante el verano, los pájaros vocalizan patrones variables de sílabas, denominado canto plástico; en esta etapa, la concentración de testosterona es baja. Posteriormente, la concentración de testosterona se incrementa y los núcleos RA y CVA aumentan el doble de tamaño (Nottebohm 1976, 1981; Arnold 1992). En la siguiente época de apareamiento, el canto es modificado por la adición de nuevos elementos al estereotipo estable y por la remoción de otros (Nottebohm et al. 1976, 1981; Margoliash et al. 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En los machos, el núcleo CVA presenta variaciones estacionales en la actividad metabólica que dependen de los cambios en los niveles circulantes de testosterona, mismos que están correlacionados con el tiempo en que se da la adquisición del canto. Un aspecto interesante en la remodelación de la conexión entre neuronas, es que no sólo pueden preexistir conexiones que son modificadas por las hormonas, sino que también pueden sumarse más neuronas en el camino. Cada otoño, nuevas neuronas en el CVA se incorporan en circuitos funcionales, en el tiempo en que se da el aumento de testosterona (Paton et al. 1984). Este es también el tiempo durante el cual los machos modifican su canto para la próxima estación de apareamiento. Al parecer, esta neurogénesis representa el remplazamiento de aquellas neuronas que se pierden, más que un continuo incremento en el número de células (Alvarez-Buylla et al. 1988). El núcleo RA presenta un período de muerte celular ontogenética, que es mayor en las hembras que en el macho (Konishi et al. 1990); este período ocurre antes del establecimiento del dimorfismo sexual en RA y, antes de que las fibras aferentes del CVA hayan inervado las neuronas de RA. La muerte celular en RA, empieza cuando las fibras de CVA invaden RA, indicando que una conexión aferente apropiada, o la acción de factores tróficos, pueden regular la muerte celular y de esta forma también controlan el dimorfismo sexual (Hermann et al. 1991). En este caso, CVA determinaría la masculinización de RA. Los estrógenos previenen o disminuyen la muerte celular en RA que ocurre durante las primeras semanas después de la eclosión (Goldman et al. 1983).

En los pinzones cebra recién eclosionados, el tratamiento del sistema de canto con esteroides gonadales, produce cambios profundos en la estructura y química del cerebro. El tratamiento de la hembra pinzón con estradiol después de eclosionar, causa la masculinización del sistema neural de canto, incluyendo la capacidad de cantar en el adulto y la masculinización anatómica y celular del sistema de canto (Gurney et al. 1980, 1982; DeVoogd et al. 1981; Pohl-Apel et al. 1985; Simpson et al. 1991; Arnold 1992). Al parecer, los andrógenos exógenos tienen poco o nulo efecto directo (actuando sobre los receptores androgénicos) en la masculinización del sistema de canto del pinzón cebra; más bien parecen actuar a través de su conversión a estradiol en tejidos extraglandulares, incluyendo el cerebro (Schlinger 1998; Cooke et al. 1998).

En uno de tres experimentos, se reportan altos niveles de estradiol en machos recién eclosionados; en los otros dos, los niveles de estradiol en los individuos recién eclosionados

fueron bajos y no había diferencias entre las hembras y los machos (Schlinger et al. 1992). Estos últimos elementos reafirman la teoría de la aromatización, y por lo tanto, que la formación local del estradiol en el cerebro masculiniza el sistema de canto de las aves (Schlinger et al. 1992; Grisham et al. 1994; Schlinger 1998; Cooke et al. 1998).

La distribución del receptor estrogénico (RE) en el *neostriatum* caudomedial del macho y la hembra del pinzón es similar en etapas del desarrollo temprano del CVA. Debido a que los ER's son expresados en el CVA hasta el día posnatal 15 (P15) cuando el CVA ya es sexualmente dimórfico en tamaño y número de neuronas, el mecanismo dependiente de RE no puede estar involucrado en el desarrollo sexual inicial del CVA (Gah et al. 1999). Similarmente, el mecanismo local dependiente de los receptores de andrógenos (RA) no podría controlar inicialmente el desarrollo del dimorfismo sexual del CVA porque la distribución de AR es altamente dimórfica y no se encuentra antes de P9 (Gah et al. 1999). Sin embargo, alguna señal sexualmente dimórfica se difunde a través de vías de conexión o factores difusibles al CVA desde otras zonas del cerebro que expresan RAs o REs antes del desarrollo del sistema de canto. Estos factores dependientes de esteroides pueden entonces inducir el desarrollo dimórfico sexual del tamaño del CVA y la expresión de RA. Una de estas áreas puede ser el área preóptica-hipotalámica que expresa altos niveles de RA y RE antes de E10 (Kendrich et al. 1996; Arnold 1996). Otros autores han planteado que el 60-70% del patrón de crecimiento del CVA en los machos, es determinado por la expresión genética de una forma esteroide-independiente en P9; esto explicaría en parte, por qué los intentos de feminizar el tamaño de las áreas de control vocal en los machos, utilizando anti-esteroides han fallado (Wade et al. 1994; Merten et al. 1995).

A diferencia de los pinzones, el núcleo de canto de los canarios es plástico aún en el adulto, es decir, las diferencias sexuales se pueden producir no sólo durante el desarrollo, sino que pueden ser afectadas por la exposición a hormonas en el adulto. Estos efectos, pueden ser detectados en las estructuras del cerebro (Cooke et al. 1998). Gah y Metzdorf (1999) han propuesto un modelo que une todos los aspectos descritos anteriormente (figura 4), y que resume las relaciones dependientes e independientes de las hormonas esteroides en el establecimiento del dimorfismo sexual en el núcleo de control del canto en el pinzón cebra.

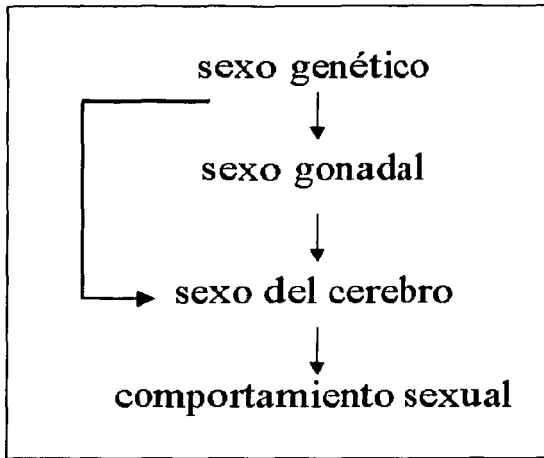


Fig 4. Un nuevo modelo para la diferenciación sexual del cerebro y el comportamiento en vertebrados. La mayoría de los modelos de diferenciación sexual del cerebro (líneas sencillas) sugieren que la acción epigenética de los esteroides gonadales controla totalmente el sexo del cerebro. En contraposición, Gah et al., proponen factores que determinan el sexo cerebral por un mecanismo independiente de las hormonas esteroideas, pero que no excluye su acción (líneas dobles). Esquema tomado de Gah y Metzdorf, 1999.

2.- Anfibios y peces

2.1. El canto de las ranas

La rana Africana (tanto la hembra como macho) al igual que las aves, utiliza vocalizaciones para la comunicación social. El macho produce un canto de cortejo que las hembras no producen, en parte porque la laringe de éstas es más pequeña (Kawata et al. 1995; Cooke et al. 1998). Los andrógenos inducen este dimorfismo por la potenciación de la miogénesis y condrogénesis en la laringe de los machos juveniles (Sassoon et al. 1987). El sistema neuromuscular que controla el canto de ranas es sexualmente dimórfico. Las moto neuronas del los núcleos IX-X del nervio craneal que inervan los músculos laringeos son más grandes y numerosos en el macho (Simpson et al. 1990); hay un mayor número de axones en el nervio laringeo y las dendritas de estas neuronas son también mayores y más numerosas en los machos que en las hembras (Kelley et al. 1983, 1990).

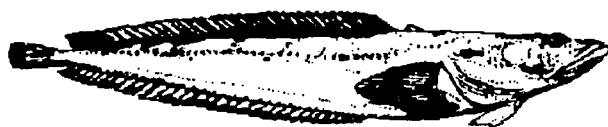
Se ha demostrado que la secreción de andrógenos en los machos regula la mayoría de los dimorfismos sexuales en el sistema de canto en las ranas. Durante la metamorfosis, las concentraciones plasmáticas de andrógenos son bajas y los niveles entre machos y hembras son

similares. En los seis meses siguientes a la metamorfosis, las concentraciones de andrógenos se incrementan nueve veces más en los machos (Kelley et al. 1986) y los niveles de estrógenos son más altos en las hembras. Sin embargo, en el adulto, el sistema laringeal femenino permanece sensible a la acción de andrógenos. El dimorfismo sexual en el sistema de canto de la rana es conducido por la exposición a andrógenos, antes y después de la metamorfosis en los machos, aunque es posible que otras hormonas estén involucradas, ya que la exposición previa a tiroxina es crítica para la efectividad del receptor androgénico. El proceso de diferenciación sexual en este sistema, como en muchos otros, es más complicado que la simple acción activadora y organizacional de las hormonas esteroideas. Las interacciones entre las hormonas, la duración y la amplitud de la exposición, así como el tiempo en el cual se presentan durante el desarrollo, son parámetros críticos que determinan la respuesta del sistema nervioso y el último estado de diferenciación sexual (Cooke et al. 1998).

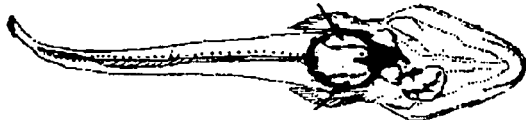
2.2.- Peces

Algunas especies de peces teleosteos generan sonidos por contracción del músculo sonical. Estos músculos vocales están inervados por el nervio occipital ventral que se considera homólogo al nervio hipoglosal de los mamíferos. Estos peces tienen dos tipos de machos reproductivos, designados como tipo I y tipo II; el tipo I construye nidos en la zona intersticial, donde ponen sus huevos; el tipo II no construye estos nidos (Bass et al. 1989 a y b). Los machos del tipo I generan una vocalización larga, denominada zumbido. Este llamado es producido casi específicamente para cuidar el nido y se detiene cuando una hembra preñada entra a él, por lo que se ha supuesto que este canto es un atrayente (Bass 1992). Los andrógenos, pero no los estrógenos, inducen la expansión del músculo sonical y amplían la población de moto neuronas del bulbo raquídeo caudal (Bass et al. 1990). Los esteroides gonadales regulan la diferenciación sexual de los músculos vocales y de las moto neuronas (figura 5).

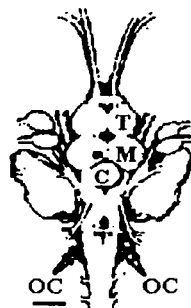
A. *Porichthys notatus*



Músculos vocales



B. Vista ventral de un macho tipo I



C. Nervios sónicos occipitales

Fig 5. Ilustración del sistema sónico motor de *Porichthys notatus*. (A) dibujo lateral del pez. Barra de escala = 1cm. (B) vista ventral de un macho tipo I, mostrando con flechas la posición de los músculos vocales (sonic swimbladder muscles). (C) vista dorsal del sistema nervioso central del pez. Dos vías occipitales (OC) se encuentran ventralmente de cada lado del cerebro, caudalmente al nervio vago. Cada uno de éstos, inerva un músculo sonical. La barra de escala = 1mm. C, cerebelo; M, cerebro medio; T, telencéfalo. Tomado de Bass y Baker, 1990.

3.- Mamíferos

3.1.- El núcleo espinal del músculo bulbocavernoso

Un sistema neuromuscular sexualmente dimórfico en mamíferos, parece tener muchas similitudes con las características sexualmente dimórficas del sistema neuromuscular laríngeo de las ranas. Un grupo de moto neuronas en la medula espinal lumbar baja inerva el músculo estriado bulbocavernoso (BC) y el músculo elevador del ano que está unido al pene. Las moto neuronas forman el núcleo estriado del bulbocavernoso (NEBC en español, SNB en inglés) en la porción dorsomedial del asta ventral en los segmentos lumbares 5 y 6 en ratas; estas neuronas son tres veces más numerosas en los machos que en las hembras y son la mitad de grandes en las hembras que en los machos (Breedlove 1992). Tanto las ratas hembras como los machos tienen músculos bulbocavernosos. Sin embargo, los músculos y las moto neuronas normalmente

degeneran poco tiempo después de nacer en las hembras, estableciendo la diferencia sexual en el número de moto neuronas NEBC (Sengelaub et al. 1986; Breedlove 1986; Rand et al. 1987; Tobin et al. 1991). La evidencia más convincente sobre el efecto de los esteroides en la masculinización del sistema NEBC es la feminización que se observa en las ratas genéticamente macho (XY) que no presentan el gen para el receptor androgénico (Breedlove et al. 1983). Estas ratas que son insensibles a los andrógenos, desarrollan un fenotipo femenino incluyendo BC y NEBC. El tratamiento androgénico de ratas hembras recién nacidas resulta en más moto neuronas NEBC y fibras musculares BC más grandes (Breedlove 1997).

3.2.- Núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (NSD-APO o SDN-APO)

Gorski y colaboradores en 1978, fueron los primeros en mostrar que una parte del área preóptica (APO o POA en inglés) en la rata es cinco o seis veces más grande en los machos que en las hembras. Desde entonces, esta área fue denominada NSD-APO. La NSD-APO está ubicada rostralmente de área preóptica y caudalmente del hipotálamo, verticalmente del quiasma óptico a la comisura anterior. El descubrimiento del dimorfismo sexual dio bases morfológicas al importante papel del APO y el hipotálamo en la regulación del comportamiento sexual y los patrones de secreción de gonadotropinas (Kawata et al. 1995).

EL NSD-APO de rata, al igual que el sistema de canto en los pájaros, ejemplifica la conjunción de las hipótesis de organización y aromatización. El incremento del número de neuronas en el NSD-APO del macho, es resultado de la acción de la testosterona durante el desarrollo. La manipulación hormonal en el adulto no altera el volumen del NSD-APO en ninguno de los dos sexos. La administración de esteroides gonadales en ratas adultas gonadectomizadas, no tiene ningún efecto en NSD-APO (Gorski et al. 1978; Hines et al. 1985), sugiriendo que existen períodos críticos para el desarrollo del dimorfismo sexual. La administración de testosterona a ratas hembras neonatas, produce un incremento en el volumen de NSD-APO (Gorski et al. 1978). La masculinización de este núcleo depende de la presencia de esteroides gonadales entre el día posnatal 1 (P1) y P7 (Cooke et al. 1998). Sin embargo, la manipulación hormonal durante el período neonatal no ocasiona una reversión completa de las diferencias sexuales en el NSD-APO. Algunos autores han propuesto que para que se dé la

diferenciación, es necesario que se presenten una serie de pasos que actúan acumulativamente o secuencialmente (figura 6).

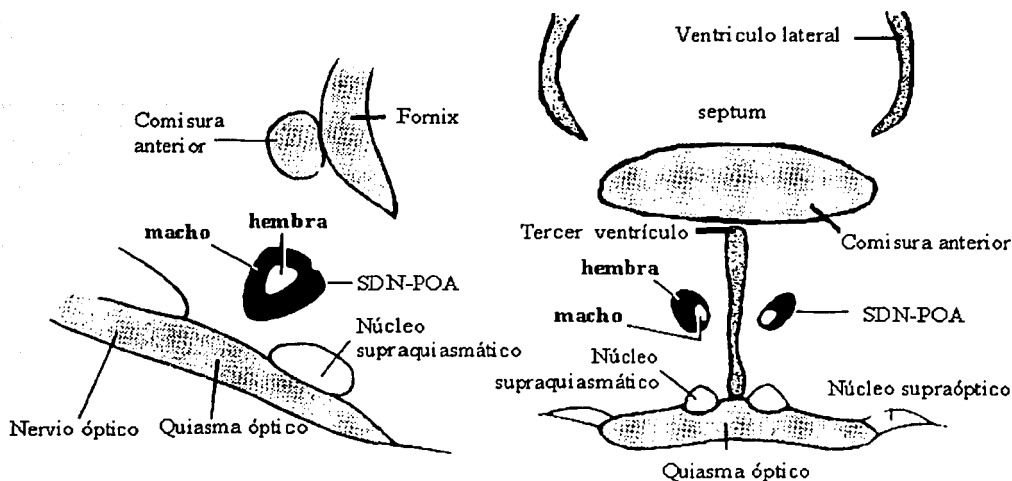


Fig 6. Esquema del núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (*NSD-APO*) en el cerebro de rata. (A) plano sagital. (B) plano coronal. Tomado de *Principles of Neural Science*, Kandel.

El dimorfismo sexual de los tipos de sinapsis en APO de rata, ha sido detectado utilizando microscopía electrónica. El APO de las hembras contiene un mayor número de dendritas sinápticas que las que contienen los machos; dado que el número de neuronas es mayor en el APO del macho que en la hembra, se puede pensar que esta baja densidad de neuronas en las hembras genera una mayor área para el desarrollo de dendritas (Arai et al. 1994; ver figura 6).

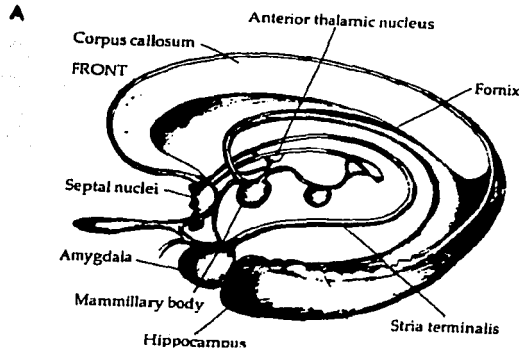
Sin embargo, el dimorfismo citoarquitectónico ha sido demostrado en el NSD-APO y la identificación de neurotransmisores y neuromoduladores han contribuido a establecer las diferencias sexuales en la comunicación neuronal (Simerly 1989; Alexander et al. 1991; Yuri et al. 1991, 1993; Herbison et al. 1992, 1993).

Núcleo anteroventroperiventricular del APO (NAVVPV-APO o AVPN-POA)

No todo el dimorfismo sexual en el número de neuronas es mayor para los machos; el NAVVPV-APO es mayor y más densamente poblado en las hembras, en las cuales este núcleo contiene mayor número que en los machos de neuronas secretoras de colecistocinina (CCK)- (Micevych et al. 1987), TH- (Simerly et al. 1985), factor liberador de corticotropinas (CRF)- (McDonald et al. 1994) y de neuronas con receptores estrogénicos (Simerly et al. 1990). En contraste, en las ratas macho, el NAVVPV-APO contiene más neuronas encefalinina positivas que las hembras (Simerly et al. 1988). Este núcleo es muy importante para la regulación de la secreción de gonadotropinas, a pesar de que no tiene cuerpos celulares positivos para GnRH. La formación de las neuronas NAVVPV-APO, comienza en el día 13 y termina en el día embrionario 18, tanto en las hembras como en los machos (Nishizuka et al. 1993). El tratamiento perinatal de las ratas hembras con testosterona o estrógenos, reduce el volumen de este núcleo y dado que el metabolito 5α -DTH no tiene este efecto, se ha propuesto que la aromatización es crucial para el desarrollo dimórfico de este núcleo.

3.3.- El sistema vomeronasal (VNS).

El sistema vomeronasal, sexualmente dimórfico está compuesto de circuitos multisinápticos que comienzan en un órgano sensorial, el órgano vomeronasal, y termina en diferentes órganos, endócrino, motivacional, y centros motores como el hipotálamo, el ganglio basal y en el tallo cerebral (figura 7).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

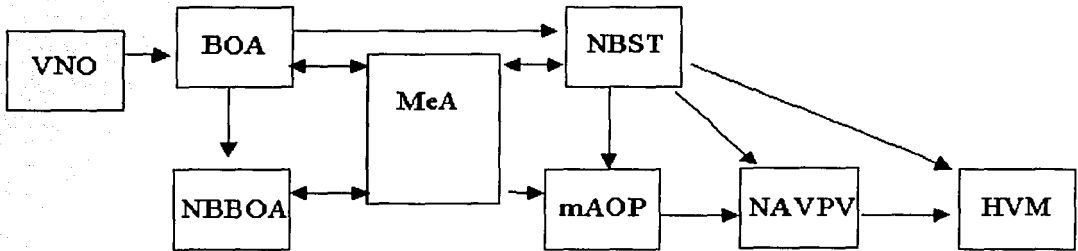


Fig 7. (A) Estructuras principales del sistema límbico. (B) Diagrama esquemático del circuito neural que recibe información del órgano vomeronasal (VNO), receptor de las señales feromonales. En la rata se ha reportado dimorfismo sexual en cada una de estas regiones. BOA, bulbo olfatorio accesorio; NAVPV, núcleo anteroventral periventricular; NBBOA, núcleo basal del bulbo olfatorio accesorio; NBST, núcleo basal de la *stria terminalis*; MeA, amígdala media; mAPO, área preóptica media; HVM, hipotálamo ventromedial; tomada de Cooke y col. 1998.

La mayoría de los datos que se tienen sobre VNS provienen de estudios en roedores, debido a que ellos dependen mucho de la acción de las feromonas para regular su sistema reproductor y el ambiente interno hormonal. También se ha encontrado dimorfismo sexual en el sistema límbico olfatorio de humanos y primates no humanos (amígdala, estria terminal, área preóptica y varios núcleos hipotalámicos; Cooke et al. 1998). A nivel del órgano vomeronasal (VNO) existe un dimorfismo sexual en varios niveles. Uno de ellos es el patrón de mRNA del receptor de feromonas en las dendritas de las neuronas bipolares (Herrada, et al. 1997). Los machos tienen más células bipolares que las hembras, pero los somas de las células bipolares de las hembras, tienen núcleos más grandes que los de los machos. Las neuronas bipolares

proyectan hacia el bulbo olfatorio accesorio (BOA), que es una estructura laminar localizada en el cuadrante dorsocaudal del bulbo olfatorio. El BOA, también es sexualmente dimórfico, las ratas macho tienen más neuronas, con un árbol dendrítico más abundante y un volumen total mayor que las hembras (Segovia et al. 1984; Valencia et al. 1986; Caminero et al. 1991). Las sinapsis eferentes del BOA son hacia la amígdala medial (MeA) y el núcleo basal de la estria terminal (NBST), que también presentan dimorfismo sexual.

La MeA contiene una gran cantidad de neuronas que poseen receptores para esteroides y es capaz de integrar la información que viene del BOA, así como la que proviene de los genitales. El volumen total del MeA es sexualmente dimórfico: más grande en los machos que en las hembras (Cooke et al. 1998); en especial, la porción posterodorsal de MeA (MeApd) es 85% más grande en los machos y contiene un gran número de células que concentran andrógenos (Simerly et al. 1990). La función de los receptores androgénicos y estrogénicos todavía no está clara, sin embargo se ha demostrado que la distribución de cada uno de ellos es diferente. Los receptores estrogénicos se han encontrado principalmente en MeApd y los androgénicos en MeA (Simerly et al. 1990) y ambos juegan un papel importante en la determinación de las diferencias sexuales (Cooke et al. 1998).

El núcleo basal de la *stria terminalis* (NBST) recibe conexiones aferentes de la MeA a través de la *stria terminalis* y directamente de BOA; es blanco de los esteroides gonadales y está involucrado en el control endocrino y en del comportamiento reproductor (Commins et al. 1985). El volumen total de NBST no es sexualmente dimórfico, pero algunos subnúcleos complementarios sí lo son. Segovia y Guillamon dividen el NBST de los roedores en cuatro grandes partes de acuerdo a dos ejes (antero/posterior y medio/lateral). El medial posterior (NBSTmp) es un núcleo que se observa oscuro y al cual también se denomina principal (Canteras et al. 1995) o encapsulado (Hines et al. 1992). Esta región está muy interconectada con MeApd y otras estructuras límbicas que son sexualmente dimórficas y/o que expresan receptores hormonales. El NBSTmp es sexualmente dimórfico, en el macho se observa que este núcleo es más grande y tiene un mayor número de neuronas que en la hembra (Gullamón et al. 1988 y Hines et al. 1992). Diferencias análogas se han encontrado en el cobayo (Hines et al. 1985) y en el humano en los cuales, el núcleo es 2.47 veces más grande en los machos que en las hembras

(Allen et al. 1990). Otras regiones del NBST son también sexualmente dimórficas, pero en dirección contraria a las observadas en el resto del VNS. Por ejemplo, el NBST anterior-lateral tiene más neuronas en hembras que en machos.

Existen grandes diferencias en el patrón de inmunoreactividad de muchos neuropéptidos, tanto en MeA como en NBST de los roedores. La substancia P-inmunoreactiva que se encuentra en MeApd y en NBST, es más de dos veces más grande en machos que en hembras y esta diferencia depende de la concentración androgénica en el adulto (Malsbury et al. 1994). Otros dos péptidos que están presentes en MeApd y que se sabe tiene una distribución sexualmente dimórfica son CCK y vasopresina (Cooke et al. 1998). La presencia de hormonas gonadales durante el desarrollo parece determinar el número de células que posteriormente serán positivas para estos péptidos.

El hipotálamo ventromedial (HVM) es, como ya se señaló en la figura 5, un núcleo que recibe señales de VNS, y proyecta al núcleo supraquiasmático, al núcleo supraóptico, a la eminencia media, al núcleo arcuato y otros. Este núcleo, que está relacionado con el control del comportamiento reproductor femenino, incluyendo la maternidad y la lordosis en las ratas, también presenta dimorfismo sexual (Madeira et al. 1995).

El primer reporte sobre las diferencias sexuales en HVM, lo presentaron Dörner y Staudt (1969) quienes demostraron que el núcleo celular de las neuronas de HVM es mayor en las hembras que en los machos, mientras que el volumen total de HVM, es más grande en los machos que en las hembras (Matsumoto et al. 1986). Estas diferencias parecen estar relacionadas con cambios hormonales, y a diferencia de lo que se ha descrito en la mayoría de los casos anteriores, en este caso, la castración de las ratas macho produce una feminización de HVM (Cooke et al. 1998).

3.5.- Otras áreas

En el núcleo supraquiasmático, la densidad de espinas dendríticas es mayor en los machos que en las hembras (Guldner 1982). El hipocampo de macho, contiene más células granulosas que la hembra (Wimer et al. 1985, 1988; Roof 1993). Se han reportado diferencias

sexuales en el sistema olfatorio, el núcleo arcuato y el *locus caeruleus* de la rata, pero existen algunas controversias al respecto (Guillamon et al. 1988; Pérez et al. 1990; Segovia et al., 1993). Se han descrito diferencias estructurales entre los dos sexos en la neocorteza de los roedores (Diamond 1987; Reid et al. 1992 a, b). En la rata, durante el desarrollo postnatal temprano, algunas regiones de la hembra crecen a tasas diferentes, mientras que en el macho crecen más uniformemente. La corteza visual de la rata macho es más gruesa y contiene más neuronas y células gliales que la de la hembra (Reid et al. 1992 a, b). Durante el desarrollo se han contado más espinas dendríticas en las células piramidales de la capa V de la corteza visual de la rata hembra que de la del macho, (Muñoz-Cueto et al. 1991) pero en el adulto, se han encontrado más dendritas en el macho que en la hembra (Seymour et al. 1992). Se han encontrado diferencias sexuales en las proyecciones visuales (Adret et al. 1989), en la corteza prefrontal (Kolb et al. 1991), en la médula espinal (segmentos toraco-lumbares) del gato en el ganglio cervical superior (Wright et al. 1983) y en muchas otras partes del sistema nervioso.

Conclusiones

Una de las conclusiones más obvias que podemos sacar a partir de todos los casos de diferenciación sexual del sistema nervioso aquí expuestos, es el papel crucial que juegan las hormonas esteroideas. La acción de estas hormonas es sumamente versátil. Se ha planteado que alteran el dimorfismo sexual, afectando la neurogénesis (Goldman et al. 1983), la muerte celular o apoptosis (Davis et al. 1995), la migración celular (Breedlove et al. 1985; Sengelaub et al. 1986), el crecimiento somático neuronal (Cooke et al. 1998), el crecimiento dendrítico (DeVoogd et al. 1981; Kurz et al. 1986; Forger et al. 1987), la formación sináptica (Leddy et al. 1987), la eliminación sináptica (Jordan et al. 1989), la expresión de neuropéptidos (Micevych et al. 1987; DeVries et al. 1990), etc. Esta multiplicidad de mecanismos celulares afectados por los esteroides, resultan de la poderosa acción que estas hormonas pueden tener en la regulación genética.

El efecto que tienen las hormonas esteroideas raramente es sobre un solo parámetro del sistema neural, como se observa en muchos de los modelos aquí descritos (el canto del pájaro, el canto de las ranas, el núcleo espinal del bulbocavernoso y el sistema vomeronasal).

Comúnmente, la acción de estas hormonas se da a lo largo del desarrollo del organismo y a muchos niveles del sistema nervioso. Las observaciones recientes han cambiado la visión que anteriormente se tenía sobre el efecto de las hormonas. Actualmente se sabe que los cambios en las estructuras nerviosas pueden ser afectados por la exposición o cambios hormonales. Sin embargo, en el adulto no todas las estructuras son plásticas y muchas de las diferencias sexuales que se establecen durante el desarrollo no pueden ser revertidas parcial o totalmente en la etapa adulta. Esto ha hecho pensar que el dimorfismo sexual se establece por los efectos genéticos y hormonales que se combinan en diferente forma y producen una gama de variaciones en el sistema nervioso, llevando a generar el dimorfismo sexual en los animales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adret, P. and Rogers L.J (1989) Sex difference in the visual projections of young chicks: a quantitative study of the thalamofugal pathway. *Brain Res* 478:59-73.
2. Alexander MJ, Kiraly ZJ and Leeman SE (1991) Sexual dimorphic distribution of neurotensin/neuromedin N mRNA in the rat preoptic area. *J Comp Neurol* 311:84-96.
3. Alvarez-Buylla A, Theelen M and Nottebohm F (1988) Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during and after song learning. *Proc. Natl Acad Sci USA* 85:8722-8726.
4. Allen LS, Gorski RA. (1990) Sex difference in the bed nucleus of the stria terminalis of the human brain. *J Comp Neurol* 302:697-706.
5. Anderson DJ (1993) Molecular control of cell fate in the neural crest: the sympathoadrenal lineage. *Annu Rev Neurosci* 16:129-158.
6. Arai Y, Murakami S and Nishizuka M (1994) Androgen enhances neuronal degeneration in the developing preoptic area: apoptosis in the anteroventral periventricular nucleus (AVPVN-APO) *Horm Behav* 28:313-319.
7. Arnold AP (1975) The effects of castration and androgen replacement on song courtship, and aggression in zebra finches (*Poephila guttata*) *J Exp Zool* 191:309-326.
8. Arnold AP (1992) Developmental plasticity in neural circuits controlling birdsong: sexual differentiation and the neural basis of learning. *J Neurobiol* 23:1506-1528.
9. Arnold AP (1996) Genetically triggered sexual differentiation of brain and behavior. *Horm Behav* 30:495-505.
10. Arnold AP (1997) Sexual differentiation of the zebra finch song system: positive evidence, negative evidence, null hypotheses, and paradigm shift. *J Neurobiol* 33:572-584.
11. Balthazart J, Tlemcani O, Ball GF (1996) Do sex differences in the brain explain sex reproductive behavior? What 25 years of research on the Japanese Quail tells us. *Horm Behav* 30:627-661.

12. Bass AH and Marchaterre MA (1989^a) Sound-generating (sonic) motor system in a teleost fish (*Porichthys notatus*): sexual polymorphisms in the ultra structure of myofibrils. J. Comp. Neurol 286:141-153.
13. Bass AH and Marchaterre MA (1989^b) Sound-generating (sonic) motor system in a teleost fish (*Porichthys notatus*): sexual polymorphisms and general synaptology of sonic motor nucleus. J Comp. Neurol 286:154-169.
14. Bass AH and Baker R (1990) Sexual dimorphisms in the vocal control system of a teleost fish: morphology of physiologically identified neurons. J Neurobiol 21:1155-1168.
15. Bass AH (1992) Dimorphic male brains and alternative reproductive tactics in a vocalizing fish. Trends Neurosci 15:139-145.
16. Beyer C, Wozniak A and Hutchinson JB (1993) Sex-specific aromatization of testosterone in mouse hypothalamic neurons. Neuroendocrinology 58:673-681.
17. Bottjer SW, Scoonmaker JN and Arnold AP (1986) Auditory and hormonal stimulation interact to produce neural growth in adult canaries. J. Neurobiol 17:605-612.
18. Bottjer SW and Dignan TP (1988) Joint hormonal and sensory stimulation modulate neuronal number in adult canary brains. J. Neurobiol 19:624-635.
19. Breedlove SM, Jordan CL and Arnold AP (1983) Neurogenesis of motoneurons in the sexually dimorphic spinal nucleus of the bulbocavernosus in rats. Dev Brain Res 9:39-43.
20. Breedlove SM (1985) Hormonal control of the anatomical specificity of motoneuron to muscle innervation in rats. Science 227:1357-1359.
21. Breedlove SM (1986) Cellular analyses of hormone influence on motoneural development and function. J. Neurobiol 17:157-176.
22. Breedlove SM (1992) Sexual dimorphism in the vertebrate central nervous system. J Neurosci 12:4133-42.

23. Breedlove SM (1997) Neonatal androgen and estrogen treatments masculinize the size of motoneurons in the rat spinal nucleus of bulbocavernosus. *Cell Mol Neurobiol* 17:687-697.
24. Brenowitz EA, Arno Id AP, Levin RN. (1985) Neural correlates of female song in tropical duetting birds. *Brain Res* 343:104-112.
25. Burek MJ, Nordeen KW, Nordeen EJ (1995) Estrogen promotes neuron addition to an avian song-control nucleus by regulating post-mitotic events. *Brain Res Dev Brain Res* 85:220-224.
26. Caminero AA, Segovia S, Guillamón A. (1991) Sexual dimorphism in accessory olfactory bulb mitral cells: A quantitative Golgi study. *Neuroscience* 45:663-670.
27. Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdale: A PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol* 360:213-245.
28. Casto JM, Ball GF (1996) Early administration of 17 β -estradiol partially masculinizes song control regions and α 2-adrenergic receptor distribution in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Horm Behav* 30:387-406.
29. Commins D, Yah P. (1985) Autoradiographic localization of estrogen and androgen receptors in the sexually dimorphic area and other regions of the gerbil brain. *J. Comp. Neurol* 231:473-489.
30. Cooke B, Hemgstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM (1998) Sexual differentiation of the Vertebrate Brain: Principles and Mechanisms. *Front. Neuroendocrinol* 19:323-362.
31. Davis EC, Shyne JE, Gorski RA (1995) A revised critical period for the sexual differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. *Neuroendocrinol* 62:579-85.
32. DeVries GJ. (1990) Sex differences in neurotransmitter systems. *J. Neuroendocrinol* 2:1-13.
33. DeVoogd T and Nottebohm F (1981) Gonadal hormones induce dendritic growth in the adult avian brain. *Science* 214:202-204.
34. Diamond MC (1987) Sex differences in the rat forebrain. *Brain Res Rev* 12:223-240.

35. Dörner G, Staudt J (1969) Structural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinol* 4:278-281.
36. Doupe AJ (1993) A neural circuit specialized for vocal learning. *Curr Opin Neurobiol.* 3:104-111.
37. Forger NG, Breedlove SM (1987) Seasonal variation in mammalian striated muscle mass and motoneurons morphology. *J Neurobiol* 18:155-65.
38. Gah M, Sonnenschein E, Wickler W. (1998) Sex differences in the size of the neural song control regions in a duetting songbird with similar song repertoire size of male and females. *J Neurosci* 18:1124-31.
39. Gah M, Metzdorf R (1999) The sexual dimorphic expression of androgen receptors in the song nucleus hyperstriatalis ventrale pars caudale of the zebra finch develops independently of gonadal steroids. *J. Neuroscience.* 19(7):2628-2636.
40. Gilbert S.F. *Developmental Biology.* Massachusetts. 1997
41. Goldman S and Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration and differentiations in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 80:2390-2395.
42. Gorski RA, Gordon JH, Shyne JE and Southam AM (1978) Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.,* 148:333-346.
43. Gorski RA (1988) Structural sex differences in the brain: their origin and significance. In: JM Lkoski, JR Perez-Polo, DK Rassin, CR Gustavson and CS Watson (Eds.), *Neural Control of reproductive Function,* Alan R. Liss, New York, pp. 33-44.
44. Grisham W, Mathews GA, Arnold AP (1994) Local intracerebral implants of estrogen masculinize some aspects of the zebra finch song system. *J Neurobiol* 25:185-196.

45. Guillamón A, Segovia S, DelAbril A (1988) Early effects of gonadal steroids on the neuron number in the medial posterior and the lateral divisions of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Dev Brain Res* 44:281-290.
46. Guldner FH (1982) Sexual dimorphisms of axo-spine synapses and postsynaptic density material in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.*, 28:145-150.
47. Gurney M, Konishi M (1980) Hormone induced sexual differentiation of brain and behavior in zebra finches. *Science* 208:1380-1382.
48. Gurney M (1982) Behavioral correlates of sexual differentiation in the zebra finch song system *Brain Res* 231:153-172.
49. Herbison AE (1992) Identification of sexually dimorphic neural population immunoreactive for calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the rat medial preoptic area. *Brain Res* 591: 289-295.
50. Herbison AE and Dye S (1993) Perinatal and adult factors responsible for the sexually dimorphic calcitonin gene-related peptide-containing cell population in the rat preoptic area. *Neuroscience*, 54:991-999.
51. Hermann K and Arnold AP (1991) Lesions of CVA block the developmental masculinizing effects of estradiol in the female zebra finch song system. *Neurobiol* 22:29-39.
52. Herrada G, Dulac C. (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*, 90:763-773.
53. Hines M, Davis FC, Coquelin A, Goy RW, Gorski RA (1985) Sexually dimorphic regions in the medial preoptic area and the bed nucleus of the stria terminalis of the guinea pig brain: a description and an investigation of their relationship to gonadal steroids in adulthood. *J Neurosci* 5:40-7.
54. Hines M, Allen L, Gorski RA (1992) Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res* 579:321-326.

55. Hodgkin J (1991) sex determination and the generation of sexually dimorphic nervous systems. *Neuron* 6:177-185.
56. Jakab RL, Horvath TL, Leranth C, Harada N and Naaftolin F (1993) Aromatase immunoreactivity in the rat brain: gonadectomy-sensitive hypothalamic neurons and an unresponsive "limbic ring" of the lateral septum-bed nucleus-amygdale complex. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:481-498.
57. Jordan CL, Letinsky MS, Arnold AP (1989) The role of gonadal hormones in neuromuscular synapse elimination in rats. I. Androgen delays the loss of multiple innervation in the levator ani muscle. *J Neurosci* 9:229-38.
58. Kandel E.R. y Schwartz J.H. Principles of Neural Science, New York: Elsevier 1991
59. Kawata M, Yuri K, Morita N and Morimoto M (1994) Steroid hormone effects on gene expression, neuronal structure, and differentiation. *Horm Behavior* 28:477-482
60. Kawata M (1995) Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci. Res.* 24:1-46.
61. Kelley DB, Fentstemaker S, Hannigan P, Shih S (1983) Sex differences in the motor nucleus of cranial nerve IX-X in *Xenopus laevis*: a Golgi study. *J Neurobiol* 19:413-429.
62. Kelley DB. (1986) Neuroeffector for vocalization in *Xenopus laevis*. Hormonal regulation of sexual dimorphism. *J Neurobiol* 17:231-248.
63. Kelley DB, Dennison J (1990) The vocal motor neurons of *Xenopus laevis*. Development of sex differences in axon number. *J Neurobiol* 21:869-882.
64. Kendrick AM, Schlinger BA (1996) Independent differentiation of sexual and social traits. *Horm Behav* 30:600-610.
65. Kirn JR, DeVoogd TJ (1989) The genesis and death of vocal control neu~ during sexual differentiation in the zebra finch. *J Neurosci* 9:3176-3187.

66. Kolb B and Stewart J (1991) Sex-related differences in dendritic branching of cells in the prefrontal cortex of rats. *J. Neuroendocrinol* 3:95-99.
67. Konishi M and Akutagawa E (1990) Growth and atrophy of neurons labeled at their birth in a song nucleus of the zebra finch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3538-3541.
68. Kurz EM, Sengelaub DR, Arnold AP (1986) Androgens regulate the dendritic length of mammalian motoneurons in adulthood. *Science* 232:395-8.
69. LeDouarin NM and Ziller C (1993) Plasticity in neural crest cell differentiation. *Curr. Biol.* 5:1036-1043.
70. Leedy MG, Beattie MS, Bresnahan JC (1987) Testosterone-induced plasticity of synaptic inputs to adult mammalian motoneurons. *Brain Res* 424:386-90.
71. MacLusky NJ and Naftolin F (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211:1294-1302.
72. Madeira MD, Lieberman AR (1995) Sexual dimorphisms in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol* 45:275-333.
73. Malsbury CW, McKay K (1994) Neurotrophic effects of testosterone on the medial nucleus of the amygdale in adult male rats. *J Neuroendocrinol* 6:57-69.
74. Margoliash D, Fortune ES, Sutter ML, Yu AC, Wren-Hardin BD, Dave A (1994) Distributed representation in the song system of oscines: evolutionary implications and functional consequences. *Brain Behav Evol* 44:247-264.
75. Matsumoto A and Arai Y (1986) Male-female difference in synaptic organization of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. *Neuroendocrinology* 42:232-236.
76. McDonald AJ, Mascagni F and Wilson MA (1994) A sexually dimorphic population of CRF neurons in the medial preoptic area. *Neuroreport* 5:179-183.
77. McEwen BS (1994^a) How do sex and stress hormones affect nerve cells? *Ann. NY Acad. Sci.*, 1-17

78. Mc Ewen BS (1994b) Steroid Hormone Actions on the Brain: When Is the Genome Involved? *Horm. Behavior* 28:396-405.
79. Merten MDP, Stcker-Buschina S (1995) Fadrozole induces delayed effects on neurons in the zebra finch song system. *Brain Res* 671:317-320.
80. Micevych PE, Park SS, Akesson TR, Elde R (1987) Distribution of cholecystokinin-immunoreactive cell bodies in male and female rats. *J Comp Neurol* 225:124-136.
81. Munoz-Cueto JA, Garcia Segura LM and Ruiz-Marcos A (1991) Regional sex differences in spine density along the apical shaft of visual cortex pyramids during postnatal development. *Brain Res.* 540:41-47.
82. Nishizuka M, Sumida H, Kano Y and Arai Y (1993) Formulation of neurons in the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area of the rat: effects of prenatal treatment with testosterone propionate. *J. Neuroendocrinol* 5:569-573.
83. Nordeen EJ, Nordeen KW, Sengelaub DR and Arnold AP (1985) Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science* 229:671-673.
84. Nottebohm F and Arnold AP (1976) Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science* 194:211-213.
85. Nottebohm F (1980) Testosterone triggers growth of brain vocal control nuclei in adult female canaries. *Brain Res.* 189:429-436.
86. Nottebohm F (1981) A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. *Science* 214:1368-1370.
87. Paton JA and Nottebohm FN (1984) Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225:1046-1048.
88. Pilgrim C, Hutchison JB (1994) Developmental regulation of sex differences in the brain: Can the role of gonadal hormones be redefined? *Neuroscience* 60:843-55.

89. Pohl-Apel G (1985) The correlation between the degree of brain masculinization and song quality in estradiol-treated female zebra finches. *Brain Res* 336:381-383.
90. Rand MN and Breedlove SM (1987) Ontogeny of functional innervation of bulbocavernosus muscles in male and female rats. *Dev. Brain Res.* 33:150-152.
91. Reisert I, Pilgrim C (1991) Sexual differentiation of monoaminergic neurons: genetic or epigenetic? *Trends Neurosci* 14:468-473.
92. Sassoon DA, Gray GE and Kelley DB (1987) Androgen regulation of muscle fiber type in the sexually dimorphic larynx of *Xenopus laevis*. *J. Neurosci.* 7:3198-3206.
93. Schlinger BA, Arnold AP (1992) Plasma sex steroids and tissue aromatization in hatchling zebra finches: implications for the sexual differentiation of singing behavior. *Endocrinology* 130:289-299.
94. Schlinger BA (1998) Sexual differentiation of avian brain and behavior; current views on gonadal hormone-dependent and independent mechanisms. *Annu Rev Physiol* 60:407-429.
95. Segovia S, Orensanz LM, Valencia A, Guillamon A (1984) Effects of sex steroids on the development of the accessory olfactory bulb in the rat: a volumetric study. *Brain Res* 318:312-331.
96. Segovia S and Guillamon A (1993) Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res. Rev.* 18:51-74.
97. Sengelaub DR and Arnold AP (1986) Development and loss of early projections in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *J Neurosci.* 6:1613-1620.
98. Seymoure P and Juraska JM (1992) Sex differences in cortical thickness and the dendritic tree in monocular and binocular subfields of the rat visual cortex at weaning age. *Dev. Brain Res.* 69:185-189.

99. Shinoda K, Nagano M and Osawa Y (1994) Neuronal aromatase expression in preoptic strial and amygdaloidal regions during late prenatal and early postnatal development in the rat. *J. Comp. Neurol.* 343:113-129.
100. Simerly R.B Swanson, L.W. and Gorski, R.A. (1985) Reversal of the sexually dimorphic distribution of serotonin-immunoreactive fibers in the medial preoptic nucleus by treatment with perinatal androgen. *Brain Res.* 340:91-98.
101. Simerly RB, McCall LD and Watson SJ (1988) Distribution of opioid peptides in the preoptic region: immunohistochemical evidence for a steroid-sensitive enkephalin sexual dimorphism. *J. Comp. Neurol.* 276:442-459.
102. Simerly RB, Chang C, Muramatsu M and Swanson LW (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol* 294:76-95.
103. Simerly R (1991) Prodynorphin and proenkephalin gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the rat: sexual differentiation and hormonal regulation. *Mol cell. Neurosci.* 2:473-484.
104. Simpson H, Tobias M, Kelley DB (1990) Origin and identification of fibers in the cranial complex of *Xenopus laevis*. Lucifer Yellow backfills in vitro. *J Comp Neurosci* 2:430-444.
105. Simpson HB, Vicaio DS (1991) Early estrogen treatment of female zebra finches masculinizes the brain pathway for learned vocalizations. *J Neurobiol* 22:777-793.
106. Simpson HB, Vicario DS (1991) Early estrogen treatment alone causes female zebra finches to produce male-like vocalizations. *J Neurobiol* 22:755-776.
107. Springer & Deutsch (1998) Left brain. Right brain. Perspectives from cognitive. *Neuroscience* 5th. Edition NY. pp. 139-156.
108. Tobin C and Joubert Y (1991) Testosterone-induced development of the rat levator ani muscle. *Dev. Biol.* 146:131-138.

109. Valencia S, Segovia A, Guillamón A (1986) Effects of sex steroids on the development of the accessory olfactory bulb mitral cells in the rat. *Dev Brain Res* 24:287-290.
110. Wade J, Arnold A (1994) Posthatching inhibition of aromatase-activity does not alter sexual-differentiation of the zebra finch song system. *Brain Res* 639:347-350.
111. Wade J, Arnold A (1996) Functional testicular tissue does not masculinize development of the zebra finch song system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5264-5268.
112. Wimer RE, Wimer CC and Alameddine I (1988) On the development of strain and sex differences in granule cell number in the area denttata of house mice. *Dev. Brain Res.* 42:191-197.
113. Wright LL and Smolen AJ (1983) Neonatal testosterone treatment increases neuron and synapses numbers in male rat superior cervical ganglion. *Dev Brain Res* 8:145-153.
114. Yuri K and Kawata M (1991) The effect of estrogen on the estrogen receptor-immunoreactive cells in the rat medial preoptic nucleus. *Brain Res* 548:50-54.
115. Yuri K and Kawata M (1993) Time-course analysis of changes in calcitonin gene-related peptide- and methionine-enkephalin-immunoreactivity in the female rat preoptic area after estrogen treatment. *Neuroscience* 55:1067-1074.
116. Zann RR (1990) Song and call learning in wild zebra finches in south-east Australia. *Anim Behav* 40:811-28.

ANEXO 2

NEUROFILAMENTOS

Los neurofilamentos consisten en un triplete de polipéptidos de cerca de 60-70 (NF-L), 130-170 (NF-M) y 180-200 kDa (NF-H) que son expresados principalmente en las células neuronales. Hasta ahora se conoce la secuencia de 3 genes que codifican la expresión de las subunidades de los neurofilamentos. El mecanismo molecular de la expresión de estos genes, todavía no se conoce. Sin embargo, se ha demostrado que el NGF a través de sus receptores de alta afinidad modula la expresión de NFs y que la presencia de estradiol aumenta la expresión de estos filamentos intermedios, posiblemente a través de estimular un aumento en la expresión del receptor de NGF trkA (Scoville y col. 1997). Estudios realizados durante el desarrollo del cerebro en ratas hipotiroideas (inducidas desde el embarazo), demostraron que las hormonas tiroideas juegan un papel importante en la regulación de la expresión de los tres genes, siendo los niveles de RNAm de NF reducidos en 68% para NF-H, 56% NF-M y 50% NF-L en animales hipotiroideos (Ghosh S. y col. 1999).

Las proteínas de neurofilamentos de medio y alto peso molecular no son capaces de formar filamentos homopoliméricos y solamente en conjunto con NF-L se pueden ensamblar, formándose un filamento heteropolimérico. El primer paso en el proceso de ensamblaje del filamento en el citoplasma es la formación de dos cadenas enrolladas, que posteriormente se unen con otro para y forman un tetrámero (protofilamento) y finalmente 4 protofilamentos se unen de manera enrollada par formar un neurofilamento (fig. 1). El tetrámero, es la forma más pequeña y estable que pueda haber en solución (21).

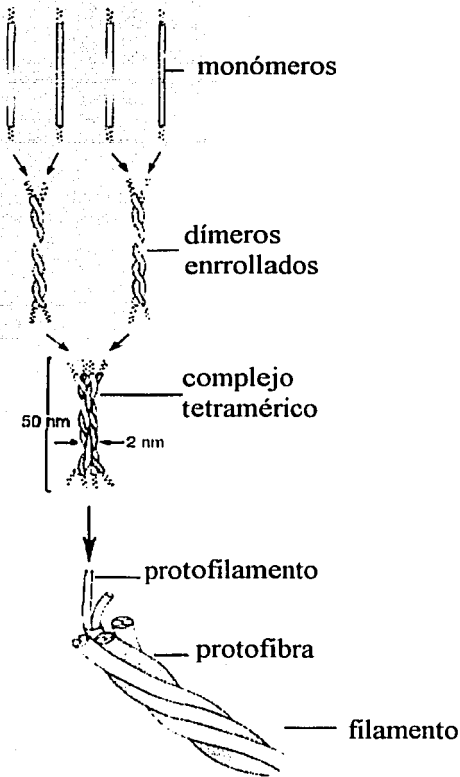


Fig. 1 Esquema que muestra la formación de neurofilamentos. La unidad más pequeña son monómeros, que forman heterodímeros enrollados. Estos heterodímeros forman un complejo tetramérico que se convierte en el protofilamento. Dos protofilamentos se unen para formar una profibra y cuatro profibras forman un neurofilamento de 10 nm.

Los NF al igual que otros elementos del citoesqueleto presentan una variedad de cambios postraduccionales que regulan su dinámica y organización. El comportamiento dinámico de las proteínas de citoesqueleto depende, en el caso de los neurofilamentos de su estado de fosforilación, al cual afecta el proceso de transporte y ensamblaje. Varias proteínas cinasas están involucradas en la fosforilación de los dominios de la cabeza (asociado a su transporte) y la cola (asociado al ensamblaje) de estos filamentos intermedios. NF-L y NF-M son fosforilados preferencialmente en el dominio de la cabeza aminoterminal por la proteína cinasa A (PKA) o cinasa C (PKC); los motivos KSPXK en el carboxilo terminal de NF-M y NF-H son fosforilados por un segundo mensajero independiente de cinasas (Fig. 2; 22).

porción de la cola

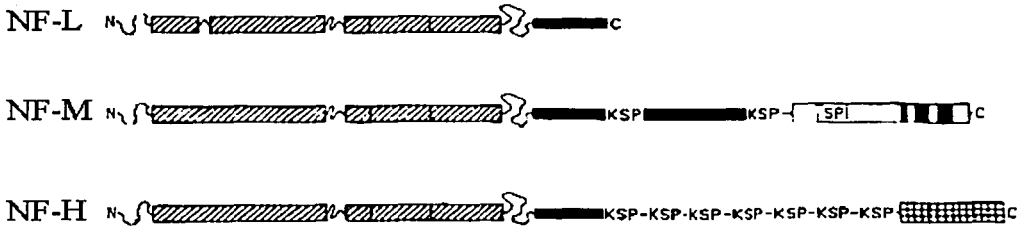


Fig. 2. Representación diagramática de la secuencia aminoacídica de las proteínas de neurofilamentos, se muestran los segmentos KSP que son fosforilados, en la última porción de NF-H se muestra con un rectángulo cuadriculado una zona con alta frecuencia K-SP o K—SP.

Durante la maduración neuronal, el número de NF con relación al de microtúbulos y filamentos de actina se va incrementando, hasta convertirse en el filamento predominante del citoesqueleto en las neuronas mielinizadas. El incremento en el número de neurofilamentos en general se presenta en coincidencia con un aumento significativo en el tamaño axonal, lo cual facilita la conducción de los potenciales de acción a través del axón e incrementa la velocidad de transporte axonal. La importancia de los NF en el control del crecimiento radial de los axones es una de las primeras funciones que se describieron, en correlación con el número de neurofilamentos y el diámetro del axón. La mayor consecuencia de la pérdida de la expresión de NF es la incapacidad de los axones de crecer radialmente. Algunos autores han planteado la hipótesis de que los brazos fosforilados del extremo carboxilo de los neurofilamentos al cambiar su carga podrían regular el calibre axonal (fig. 3) y que esta fosforilación al menos en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal está regulada por la mielinización y la cadena de segundos mensajeros que se desprende del contacto célula-célula entre las neuronas y las células mielinizantes de Schwann que finalmente activa proteínas cinasas que fosforilan los neurofilamentos (Starr y col. 1996, Julien J. 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

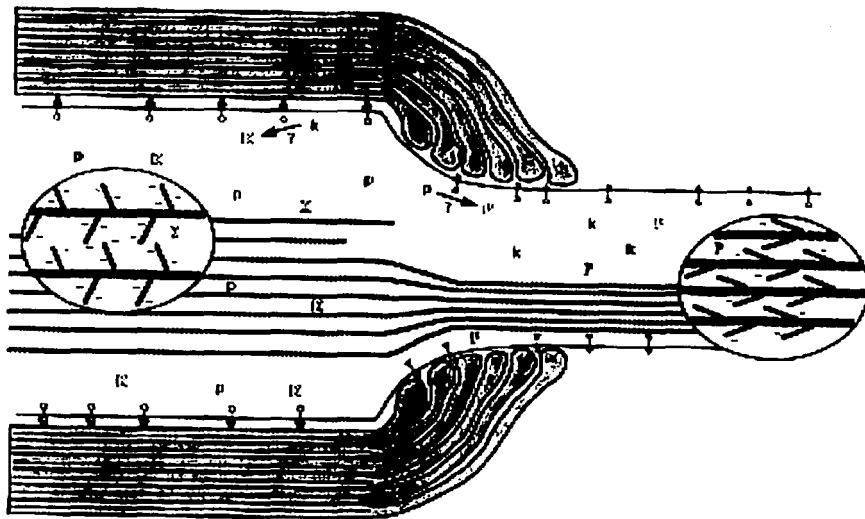


Fig. 3. Diagrama que ilustra la modulación de las propiedades axonales por medio de las células de mielinización Schwann. Los efectos de la mielinización y desmielinización en la densidad de NF, el calibre axonal y el transporte axonal lento parecen estar relacionados con un cambio neto en el estado de fosforilación de los NFs y posiblemente de otros sustratos. El modelo más simple que explica este patrón indica que ligandos (estructuras en V) de la célula de Schwann se unen a receptores del axón. Esta interacción modula a su vez las fosfatasa cinasas axónicas. En este diagrama las letras mayúsculas abiertas representan la cinasa (K) y las fosfatasa (P) activas, mientras que las letras minúsculas cerradas corresponden a las formas inactivas (k y p). El resultado es que la actividad de las cinasas predomina en las partes mielinadas y la de las fosfatasa en las partes no mielinadas. Cuando los brazos del NF están altamente fosforilados la carga de la superficie es alta y por lo tanto se repelen generando un engrosamiento del calibre axonal en estas zonas (tomado de Waegh S y col. 1992).

La expresión de neurofilamentos se ha reportado además en células no neurales; las células cromafines a medida que maduran y comienzan a secretar catecolaminas pierden sus rasgos neuronales. Ésta inhibición de los marcadores neuronales es reversible dado que en cultivo expresan NF (Yang HY y col. 1996). Al igual que las células cromafines, la línea celular PC12, expresa NF. En ambos casos, la capacidad de expresar marcadores neuronales está relacionada con que ambas tienen su origen embrionario en las crestas neurales. Finalmente, la expresión de neurofilamentos se ha descrito también en otros tipos celulares no neurales como las células de Leydig y de Sertoli en humano; en estas células los neurofilamentos coexisten con

otros filamentos intermedios como la vimentina y su expresión varía según el estado de la espermatogénesis (Davidoff y col. 1999) y en las células neoplásicas del tracto gastrointestinal y pancreáticas la expresión de NF-M o NF-H se da diferencialmente dependiendo de la zona donde se origina el tumor (Perez MA y col. 1990).

ANEXO 3

SUBPOBLACIONES CELULARES DE LACTOTROPOS Y GONADOTROPOS

Se han descrito muchos métodos para obtener fracciones enriquecidas de cada uno de los diferentes tipos celulares adenohipofisarios. Estas técnicas (velocidad de sedimentación, desviación de la luz, antígenos de superficie, etc.) se basan en las diferencias entre las características de cada tipo celular como son la densidad y el tamaño de los gránulos y el tipo de hormona que sintetizan y secretan.

Además de las diferencias existentes entre las poblaciones que específicamente sintetizan y secretan un tipo hormonal específico, se ha visto que cada población celular puede a su vez, tener subpoblaciones que difieren morfológica y funcionalmente. Por ejemplo, los lactotrofos, difieren en sus características inmunocitoquímicas, en su tamaño y en su respuesta a la hormona liberadora de tirotropinas (TRH) o dopamina (DA). Asimismo los somatotrofos también pueden dividirse en subgrupos que responden de manera diferente a los estímulos fisiológicos (Velkeniers et al. 1988).

Mucho del conocimiento que ahora tenemos sobre la ontogenia, anatomía y fisiología de los lactotrofos y gonadotrofos en la adenohipófisis se ha obtenido empleando estudios de inmunocitoquímica, microscopía electrónica y medidas de la concentración hormonal de extractos, medios de cultivo y muestras de plasma de adenohipófisis utilizando por ejemplo radioinmunoensayos. Neil y Frawley (1983) iniciaron el uso de otra técnica llamada ensayo hemolítico de placa (RHPA por sus siglas en inglés), para medir la liberación hormonal en células individuales en cultivo. El uso de esta técnica junto con otros avances en la microscopía electrónica, en la separación de las células adenohipofisarias, y en otros métodos de estudio de células únicas, han revelado nuevos aspectos de la morfología y fisiología de las células adenohipofisarias que sugieren una gran heterogeneidad en estructura, anatomía, distribución y comportamiento funcional.

En esta revisión nos enfocaremos a algunos aspectos que se han descrito de la heterogeneidad de las poblaciones de los lactotrofos y los gonadotrofos.

LACTOTROPOS

Los lactotrofos o mamotrofos fueron descritos por primera vez en 1957 como las células de la pituitaria con los gránulos secretores más grandes. Estudios posteriores, demostraron que en la adenohipófisis la prolactina se produce por una subpoblación heterogénea de lactotrofos que pueden identificarse utilizando diferentes técnicas, como inmunocitoquímica, ensayos hemolíticos de placa y sedimentación en gradientes discontinuos de Percoll o de albúmina de suero bovino (BSA).

- *Subpoblaciones morfológicas.*

El gradiente diferencial de Percoll o de BSA es una de las técnicas más empleadas para obtener poblaciones enriquecidas de los diferentes tipos celulares adenohipofisarios. Esta técnica se basa en las diferencias de velocidad de sedimentación que tienen las células y se realiza utilizando una columna de gradientes de densidad discontinuos de Percoll o BSA. En general, para separar las diferentes poblaciones de células adenohipofisarias se utilizan las densidades de 1.045, 1.065, 1.080 y 1.090 g/ml. Estos gradientes pueden variar según los métodos publicados y por lo tanto producir diferentes capas de separación.

Se ha reportado que en la separación de células obtenida mediante el gradiente de Percoll, los lactotrofos se encuentran en dos densidades diferentes: en la capa 1 (interfase 1.045-1.065) el 84% de las células son positivas a PRL y representan el 81% del total de lactotrofos de la glándula y, la capa 2 (interfase 1.065-1.080) contiene 26.5% a PRL y 64.5% de células positivas a GH (Kazemzadeh et al. 1992). En la glándula de cobayo y cerdo también se pueden separar dos tipos de lactotrofos con una morfología característica, una de ellas con gránulos relativamente grandes (250-350nm de diámetro) y el retículo endoplasmático (RE) bien desarrollado y las otras con muy pocos gránulos pequeños (180-200nm). En la rata, algunos autores, han reportado la presencia de tres tipos diferentes de células secretoras de prolactina; las de Tipo I, que contienen

gránulos esféricos y pequeños (130 a 200nm de diámetro); las de Tipo II, que poseen gránulos esféricos o polimórficos de tamaño mediano (de 250 a 300nm) y, las de Tipo III que contienen gránulos grandes y polimórficos con un diámetro de 300 a 700 nm (Nogami H. 1984; Vila-Porcile E. et al. 1996; De Paul A. et al. 1997). La distribución, frecuencia y abundancia relativa de estas 3 subpoblaciones de lactotopos varía dependiendo del sexo y la edad de los animales: a los 20 días de edad (animales prepúberes), los lactotopos de la adenohipófisis de rata, muestran mayor inmunoreactividad que a los 10 días de edad y sus porcentajes con respecto al total de la población celular de la glándula son de 10.7% en el macho y 13.5% en la hembra. En las ratas hembras prepúberes, los lactotopos son usualmente redondos o poliédricos y en algunos casos elongados. Sus gránulos secretores son pequeños (80-120nm de diámetro) y están esparcidos en la región periférica del citoplasma. El retículo endoplasmático es escaso y se encuentra aplanado, el complejo de Golgi no es muy prominente. En los machos prepúberes, la mayoría de las células inmunopositivas para PRL son *inmaduras* y contienen sólo un pequeño número de gránulos secretores (semejantes a células Tipo I). Ocasionalmente en estos animales se pueden observar células de tipo II, con gránulos secretores de tamaño mediano (150-200 nm), siendo posteriormente más comunes en ratas macho adultas (Nogami H. 1984). A diferencia del macho, en las hembras prepúberes, las células de Tipo-II son las que constituyen la población más grande, mientras que las células de Tipo-III con gránulos polimórficos raramente se observan (Nogami H. 1984). Así, la relación poblacional de los tres tipos celulares varía entre los machos y las hembras prepúberes, siendo en las ratas macho, las células de tipo-I cerca del 60% de los lactotopos, mientras que en la hembra, son las células de Tipo-II las que representan un poco más del 50% de los lactotopos (Nogami H. 1984).

Las diferencias en el tipo y abundancia de cada una de las subpoblaciones de lactotopos, son influenciadas o mantenidas por el efecto de hormonas esteroideas como el estradiol (E_2), un efectivo secretagogo de PRL que juega un papel muy importante en el desarrollo de los cambios morfológicos en los lactotopos y en sus gránulos de secreción. Con el objetivo de ver como el estradiol o la testosterona afectan la proporción y el tipo de células adenohipofisarias, algunos autores han hecho estudios en los que tratan a las ratas con E_2 o testosterona. Lo que han observado (tabla 1) es que después del tratamiento con E_2 las células de Tipo-I disminuyen numéricamente en ambos sexos y las de tipo III aumentan, en tanto que las células de Tipo-II se

incrementan un poco en el macho y disminuyen en la hembra. Con la administración de propionato de testosterona (TP), el cambio más significativo es que las células de Tipo-II incrementan moderadamente en machos y se vuelven la mayor proporción de lactotopos en ambos sexos. Por otro lado si las ratas hembras son tratadas con nafoxidina (antiestrogénico), las células de Tipo-III rápidamente disminuyen en número, mientras que las de tipo I y II incrementan. En los machos el tratamiento con este antiestrogénico no tiene un efecto significativo (Nogami H. 1984; De Paul A. et al. 1997).

	Hembras			Machos		
	Con E ₂	Con TP	Con nafoxina	Con E ₂	Con TP	Con nafoxina
Células tipo I	↓	-	↑	↓	-	↑
Células tipo II	↓	↑	↑	↑ poco	↑ poco	↑
Células tipo III	↑ más que el macho	-	↓	↑	-	↓

Tabla 1.- Respuestas observadas en la proporción de los subtipos de lactotopos de ratas hembras y machos después de ser tratadas con estrógenos (E₂), propionato de testosterona (TP) y el antiestrogénico nafoxina. Las flechas indican incremento (↑), disminución (↓) y sin cambio (-).

Existe una polémica en cuanto a si la heterogeneidad morfológica observada, puede estar relacionada con diferentes estados de maduración postnatal de las células o si representan diferentes estados funcionales. Hasta la fecha no se han reportado evidencias que muestren que las células de tipo-II y Tipo-III provengan de diferentes células primordiales, lo cual claramente indicaría que los diferentes subtipos representan diferentes estados de maduración postnatal. Nogami y colaboradores (1984), sugieren que los tres tipos de lactotopos pueden representar una interconversión entre ellos y que la secuencia de interconversión es del Tipo-I a Tipo-II o a Tipo-III. Finalmente, estos autores plantean que esta conversión puede reflejar cambios en la actividad secretora regulada por E₂ (Nogami H. 1984; De Paul A. et al. 1997). Esta idea se ve reforzada por el hecho de que las diferencias en cuanto a secreción de PRL de los lactotopos obtenidos en diferentes densidades de un gradiente de Percoll, se mantienen aún después de 3

días en cultivo (ver más adelante), sugiriendo que deben estar relacionadas con diferentes estados de actividad secretora del mismo tipo de célula (Nogami H. 1984; Velkeniers et al. 1988).

Algunos autores (Nogami H. 1984; Bollengier et al. 1988; Vila-Porcile E. et al. 1996) han reportado una disposición espacial diferencial de estas subpoblaciones en la glándula, siendo las células con gránulos grandes las que se encuentran mayoritariamente en la zona externa (periferia) de la misma.

- **Secreción**

Como se mencionó anteriormente, existe una discusión sobre si las diferencias observadas entre las dos o tres subpoblaciones descritas de lactotopos implican o no diferencias funcionales. Podría ser razonable pensar que los dos tipos de células obtenidas por Percoll, representan dos (sub)poblaciones de lactotopos en diferentes etapas de desarrollo secretor lo que explicaría que tienen más o menos gránulos de secreción o éstos son más o menos densos. Por esta razón es importante determinar si las diferencias morfológicas antes mencionadas se acompañan de diferencias funcionales.

La mayoría de los estudios de secreción se han realizado utilizando RHPA. Este tipo de ensayo permite registrar diferencias en la magnitud de la secreción hormonal en células individuales. En general, en este método se emplea la proteína A de *staphylococcus* conjugada a eritrocitos (RBCs) por medio de la incubación con Cr^{3+} . Los eritrocitos son posteriormente diluidos en proporción uno a uno con las células secretoras. Los anticuerpos específicos para la hormona que se desea medir, se unen a la proteína A a través de la porción Fc y a la hormona secretada a través de la porción Fab. La unión de la hormona con el anticuerpo activa el sistema complemento que es adicionado y provoca la lisis de los eritrocitos que se encuentran en la cercanía de la célula secretora en dependencia con la cantidad de hormona secretada (Smith P. et al. 1984) El tamaño de la placa de hemólisis es proporcional a la cantidad de hormona secretada por la célula endocrina y entre más grande es su tamaño mayor es la secreción.

Mediante el RHPA se ha caracterizado la formación de dos clases de placa de hemólisis en los lactotropos, estas placas difieren en su área y pueden ser placas pequeñas (SP) que tiene un área $<1,420 \mu\text{m}^2$ y placas grandes (LP) de $1,420 \mu\text{m}^2$ de área. El porcentaje de lactotropos que forman placas de hemólisis es de $19.5 \pm 1.3\%$ en los adultos macho y $5.9 \pm 0.6\%$ en los neonatos. El área de la placa promedio es de $3,090 \pm 240 \mu\text{m}^2$ en los adultos, con algunas células que forman placas pequeñas y otras que producen placas grandes. En contraste, en los neonatos la placa mide en promedio $780 \pm 60 \mu\text{m}^2$, y la mayoría de células forman placas pequeñas (Cota et al. 1990).

En las ratas hembras, la abundancia relativa de las células que secretan PRL varía según la fase del ciclo estral. En comparación con la fase lútea temprana, durante la etapa media lútea y folicular el número de células que secretan PRL se reduce, mientras que la proporción de células que secretan hormona del crecimiento (GH) se mantiene. Subdivisiones posteriores de células secretoras de GH y PRL en simples o dobles secretoras, muestran un cambio dramático en la abundancia relativa de estas subpoblaciones dependiendo de la fase del ciclo que podría producir las diferencias en cuanto a secreción. Kukstas, Kineman y colaboradores (Kukstas L. et al. 1990; Kineman R. et al. 1991) encontraron que los lactosomatotropos (células adenohipofisarias que sintetizan y secretan PRL y GH) son más abundantes en las hembras de animales preñados que en las lactantes o hembras vírgenes. También observaron que la abundancia relativa de las células que secretan PRL incrementa y que las que secretan GH disminuyen durante la transición del embarazo temprano a la lactancia (Kukstas L. et al. 1990; Kineman R. et al. 1991).

Se ha observado que al igual que las diferencias morfológicas antes descritas que varían en alguna medida con la regionalización de la glándula en zona interna (cerca al lóbulo neurointermedio) y zona externa (en la periferia de la glándula), el tamaño de las placas de hemólisis formadas por las células de estas diferentes regiones también varía; en las células aisladas de la zona interna estas miden de $5,000$ a $9,000 \mu\text{m}^2$, y las de la zona externa de $2,000$ a $7,500 \mu\text{m}^2$. En células estimuladas con solución de alto potasio, los tamaños de las placas de la zona interna varían entre $8,000$ y $24,000 \mu\text{m}^2$ mientras que las células de la zona externa presenta un rango más estrecho que va de $6,000$ a $8,000 \mu\text{m}^2$ (Vila-Porcile E. et al. 1996). En condiciones basales, los lactotropos de la zona interna secretan más que los de la zona externa y al ser

estimuladas con el secretagogo específico para lactotropos y tiotropos, la hormona liberadora de tiotropinas (TRH), el área de las placas de hemólisis producidas por las células de la zona interna aumenta; sin embargo, las células de la zona externa forman más placas nuevas, es decir que aumenta el número de células secretoras de PRL. Además se ha demostrado que estímulos fisiológicos como la succión de las crías aumenta la secreción de las células de la zona interna (Vila-Porcile E. et al. 1996).

- ***Respuesta a factores inhibitorios (DA) o estimulatorios (TRH y estrógenos) de la secreción.***

Dentro de la caracterización de las sub-poblaciones de lactotropos, un parámetro importante para el cual también se han tratado de establecer posibles diferencias, es la respuesta que estas células tienen a los secretagogos y factores inhibidores que fisiológicamente controlan la síntesis, almacenaje y secreción hormonal.

La secreción de PRL se encuentra bajo el control inhibitorio tónico de la dopamina (DA) hipotalámica que tiene un gran número de efectos en los lactotropos: por ejemplo; a través de G_i , media la reducción de AMPc, inhibe la fosfolipasa C (PLC), activa canales de K^+ , induce el ensamblaje y desensamblaje de la red cortical de actina. La estimulación física de la liberación de la hormona, una vez que ha sido transformada post-traduccionalmente se encuentra regulada por otros factores hipotalámicos como la hormona liberadora de tiotropinas (TRH) que actúa a través de la activación de PLC; el péptido vasoactivo intestinal (VIP), que activa la adenilato ciclasa y el péptido liberador de PRL, que eleva el ácido araquidónico (Cochilla A. et al. 2000).

Algunos estudios han mostrado evidencias de heterogeneidad en la respuesta de los lactotropos a DA por ejemplo; al utilizar técnicas electrofisiológicas se encontró que la respuesta eléctrica a DA difiere, existiendo 2 poblaciones de lactotropos, una que se observa en células que en su mayoría son separadas de las fracciones 3-5 (gradiente de BSA de 0.3-2.4%) y que muestran una hiperpolarización a partir del potencial de reposo, asociado con un incremento en la conductancia de K^+ después de la aplicación de DA (respuesta tipo 1) y, las otras que en su

mayoría son células de las fracciones 7-9 que no muestran respuesta a DA a su potencial de reposo, pero si la membrana se despolariza previamente, la DA induce una repolarización asociada a un decremento de la conductancia de calcio (respuesta tipo 2) (Cota et al. 1990; Kukstas L. et al. 1991). Además de estas diferencias en el potencial de membrana, en cultivos de lactotrofos adenohipofisarios en los cuales no se separaron las células en poblaciones enriquecidas en los cuales se ha registrado el cambio de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a DA también se han descrito dos poblaciones; en uno de los tipos se observa un aumento en la concentración de calcio intracelular y en el otro una reducción (Winiger B. et al. 1987).

Los lactotrofos que son separados en gradientes de Percoll o de BSA y que están en las capas de baja densidad, tienen un alto nivel basal (sin estímulo) de secreción (mayor número de placas LP) y una alta actividad sintética. En contraste, los lactotrofos que tienen alta densidad, tienen baja capacidad secretora espontánea y niveles de mRNA para prolactina pero una gran poza de PRL lista para liberarse. Utilizando el RHPA se ha visto que el TRH aumenta el área promedio de las placas (pequeñas y grandes), pero no altera la fracción de lactotrofos que forman placas (Luque et al. 1986), y al separar la adenohipófisis en zona interna y zona externa, en la zona interna las áreas de todas las placas de hemólisis son mayores a $10,000 \mu m^2$ ($10,000-28,000 \mu m^2$) mientras que en la zona externa son de $6,000-14,000 \mu m^2$ (Vila-Porcile E. et al. 1996).

El efecto que la DA o el TRH tienen en los lactotrofos puede variar de una célula a otra. En células separadas utilizando un gradiente diferencial de Percoll, la dopamina inhibe dramáticamente la acumulación del mRNA de PRL en las células de la capa 1 pero no en las de la capa 2. Sin embargo, el promedio de gránulos aumenta significativamente en las células de la capa 2, lo que contrasta fuertemente con la inhibición de la liberación de PRL (Kazemzadeh et al. 1992). Utilizando el ensayo hemolítico de placa, Arita y colaboradores (Arita et al. 1991) mostraron que la población de lactotrofos que se inhibe con dopamina aumenta de manera dependiente de la dosis. Ellos y otros autores han visto que la población de células que forman placas grandes disminuye considerablemente a una concentración de $10^{-7}M$ de DA, sin un decremento en las células que forman placas pequeñas. Esto sugiere que la dopamina inhibe preferencialmente la subpoblación de lactotrofos que forman placas grandes. Además

observaron que el 6% de la población de lactotropos no se inhibe con concentraciones de $10^{-5}M$ de DA, indicando que existe una subpoblación de lactotropos con muy baja sensibilidad a la dopamina. Puesto que la concentración fisiológica de dopamina en la sangre hipofisial parece ser menor a $10^{-7}M$, es posible que estos lactotropos que no fueron inhibidos con $10^{-5}M$ de dopamina *in vivo* no respondan a su efecto inhibitorio. (Luque et al. 1986; Arita et al. 1991).

Se ha observado que los lactotropos de ratas macho y las hembras madres lactantes, responden de manera diferente a los secretagogos o inhibidores de acuerdo a su localización en la glándula. A este respecto, se han identificado dos regiones, zona interna (en la vecindad con el lóbulo neurointermedio) y zona externa (comprende la periferia de la glándula). Muchas de estas diferencias regionales en las respuestas a TRH y DA están relacionadas con la variación en la concentración de los factores hipotalámicos de regulación, debido a que la parte interna recibe solo vasos portales cortos que contienen altas concentraciones de dopamina y la zona externa esta irrigada por vasos portales largos por los cuales reciben menos cantidad de DA. (Boockford F. et al. 1987; Mena F. et al. 1989 y Lamberts and Macleod 1990). Como ya se ha demostrado, la inhibición de la secreción de PRL por DA es dependiente de la concentración, por lo que una posibilidad para explicar la heterogeneidad de los lactotropos con respecto a la inhibición por dopamina podría ser que, como acabamos de ver, las células que se encuentran más cercanas a la región central de la glándula sean más sensibles al efecto de DA, lo cual podría implicar que las células que se encuentran en ésta región sean en su mayoría células LP. Sin embargo en esta misma idea de la heterogeneidad regional, se han realizado varios estudios; Boockfor F. et al. 1987 demostraron que las células de la periferia de la glándula secretan rápidamente PRL en respuesta a TRH y están moderadamente afectadas por DA. En contraste la tasa de liberación lenta de PRL de las células de la región central está escasamente influenciada por TRH y disminuye considerablemente con DA. Así la incubación de las células de la parte interna de la glándula con TRH, resulta solo en un pequeño aumento de la tasa de formación de placas de hemólisis, mientras que el tratamiento de las células de la zona externa con TRH, causa un marcado aumento de la tasa de formación de placas. Sin embargo, después de 6 horas en medio de incubación, los porcentajes de formación de placas son los mismos en ambas regiones (Boockfor F. et al. 1987), perdiendo así las diferencias existentes entre ambas regiones y sugiriendo que otros factores además de la concentración de DA y TRH que llega a las células a

través del sistema porta y de su la localización regional, deben de estar regulando la capacidad de los lactotrofos de responder a estos importantes factores hipotalámicos.

Observaciones hechas en poblaciones enriquecidas de células de cada una de las zonas (interna y externa) en ratas tratadas con estradiol o con estradiol y progesterona, mostraron que la células externas de las ratas tratadas con estradiol y las células internas de las ratas tratadas con estradiol más progesterona son significativamente más sensibles al efecto inhibitor de dopamina (Hu and Lawson 1996). Estas diferencias regionales que se observan cuando la población de lactotrofos no ha sido separada, se alteran cuando las células de cada una de las regiones se separan en fracciones pesada y ligera utilizando gradientes de Percoll así, se puede ver que en presencia de DA el estradiol genera un aumento en la liberación de prolactina de las células de la zona externa cuando no están separadas entre si, pero el efecto desaparece cuando son divididas. Por el contrario, en ratas ovariectomizadas (OVX) las células de la zona externa no responden a la ausencia de DA, pero cuando son subdivididas si lo hacen (Hu and Lawson 1996).

Los estrógenos son potentes estimuladores de la expresión genética, la síntesis y secreción de prolactina. Dependiendo de las concentraciones los esteroides pueden generar hipertrofia o hiperplasia de los lactotrofos e incrementar su sensibilidad a otras hormonas como la TRH, la angiotensina II (A-II), el péptido vasoactivo intestinal (VIP). Asimismo los estrógenos están involucrados en la regulación de la síntesis y secreción de PRL (De Paul A. et al. 1997). En algunas de las respuestas que se han descrito, el estradiol podría estar generando el desacople funcional del receptor de dopamina D2, además de interferir con la habilidad de los lactotrofos a incorporar DA y reducir el número de receptores D2 presentes en la célula. Sin embargo, existen dos posibilidades para explicar la heterogeneidad de la respuesta que presentan los lactotrofos a la DA: una es que en los lactotrofos haya dos tipos diferentes de receptores de dopamina; el primero de ellos que mediaría la regulación de liberación de prolactina, mientras que la unión al segundo tipo de receptor podría contribuir a la regulación del mRNA de prolactina. Así, según esta hipótesis los lactotrofos de la segunda capa expresarían el receptor tipo 1 y no expresarían el receptor de tipo 2. Una explicación alternativa es que el receptor de dopamina utilice diferentes vías de segundos mensajeros o que, como se ha visto en el efecto de las señales de una célula puedan afectar la liberación hormonal de otra, como se ha mostrado que

el GnRH estimula la liberación de PRL de lactotopos cultivados en conjunto con una población de gonadotropos, pero no si los lactotopos están solos (Kazemzadeh et al. 1992).

Recientemente se descubrió que en el cerebro de rata existen dos isoformas del receptor membranal para dopamina D_2 (D_{2in} y D_{2o}), probablemente estas isoformas tengan vías de segundos mensajeros diferentes. Esto apoyaría la primera hipótesis y sugeriría una mayor plasticidad para la respuesta de los lactotopos a la DA. Además de esto, se ha visto, que la relación entre estas dos isoformas del receptor D_2 es significativamente diferente entre las poblaciones de los lactotopos de las fracciones 3-5 y 7-9 y que el estrógeno y la testosterona sólo modifican la relación de su expresión (Kukstas L. et al., 1991).

Como hemos visto, la respuesta a DA y TRH es heterogénea y esta heterogeneidad funcional depende de muchos factores además de la ubicación y la densidad individual de los lactotopos, entre ellos, la presencia o ausencia del estradiol o DA y la comunicación célula-célula, dejando ver que no solo existe una heterogeneidad morfológica entre las regiones de la glándula, sino que además existe una heterogeneidad fisiológica celular.

- *Niveles de calcio libre intracelular y canales iónicos*

En estrecha relación con la secreción y los posibles diferentes efectos que tienen los secretagogos o factores inhibidores sobre los lactotopos, está la concentración y dinámica intracelular de calcio, que se modifica o mantiene según el estímulo y que podría variar según las subpoblaciones celulares que hasta aquí se han descrito. En ese sentido se han desarrollado algunos experimentos que también han mostrado diferencias entre los lactotopos.

En ausencia de estimulación, se pueden observar dos grupos de lactotopos; el primero con grandes fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ (máximo de 300 nM) probablemente debido a potenciales de acción, y el segundo con $[Ca^{2+}]_i$ estables (entre 65 nM y 200 nM). El efecto de la DA sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal no es homogéneo, pudiéndose observar al igual que para el resto de los parámetros antes descritos, dos tipos de respuestas; una se observa en el grupo de las células en las cuales la $[Ca^{2+}]_i$ es estable, en las cuales aún con concentraciones muy elevadas de DA no ocurren

cambios importantes, mientras que en el primer tipo las fluctuaciones desaparecen y disminuye marcadamente la $[Ca^{2+}]_i$ (Horta J. et al. 1993; Malgaroli A. et al. 2000). Algunos autores hacen una división más detallada de los tipos de células según el efecto sobre el $[Ca^{2+}]_i$; proponiendo que hay células que no presentan oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ (tipo A); células que presentan oscilaciones de alta frecuencia y baja amplitud con incrementos de la basal de 100 nM (tipo B); células tipo C que están caracterizadas por oscilaciones de una alta frecuencia, alta amplitud y que tienen un aumento de la basal de aproximadamente 500 nM y, finalmente las células tipo D que tienen al menos una onda lenta de $[Ca^{2+}]_i$ (Gore A. et al., 1999).

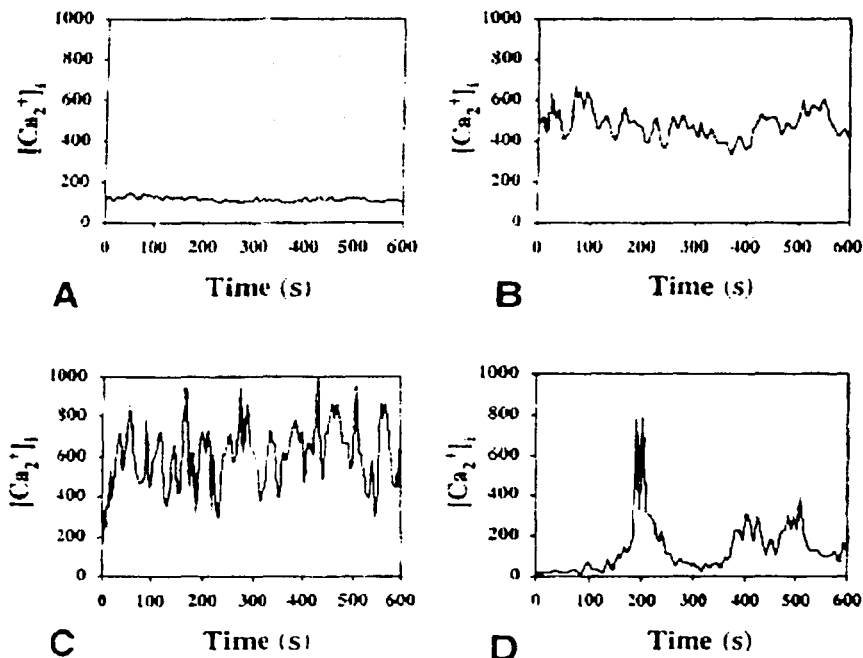


Fig. 1 Patrones espontáneos de oscilación de $[Ca^{2+}]_i$ en lactotopos. Se muestran los 4 patrones descritos en el texto como A, B, C y D. Tomado de Gore A. et al. 1999 .

La presencia y abundancia de estos subtipos de lactotropos en la glándula también varía según el sexo y el estado fisiológico. Los lactotropos de las ratas lactantes, tienden a presentar mayores proporciones de células tipo C y D y pocas de tipo A. Los machos, tienden a tener una alta proporción de células de tipo A mientras que, una proporción abundante de células en las ratas hembras ciclantes tiende a ser intermedia entre machos y lactantes, excepto en las células de subtipo B, que parecen no cambiar en función del sexo o la edad del animal (Gore A. et al. 1999).

De las células que aparecen en la fracción ligera el 73% muestra un nivel basal de $[Ca^{2+}]_i$ alto (114 ± 34.3 nM), generalmente asociado con oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} (Lledo P. et al. 1991; Kwiecien R. et al. 1998). En cambio en las células de la fracción pesada el 79% se caracterizan por tener un nivel de $[Ca^{2+}]_i$ basal bajo y estable (61 ± 13 nM) y muchas de ellas responden solo a 10 nM de TRH. Sin embargo el 28% de las células de esta fracción tienen oscilaciones espontáneas de $[Ca^{2+}]_i$, son insensibles a TRH y tienen una respuesta a DA similar a las de la fracción ligera (Lledo P. et al. 1991).

Utilizando poblaciones de células separadas por centrifugación diferencial, se ha visto que el potencial de reposo de la membrana (V_m) de las células de la fracción pesada es más negativo (-65.5 ± 10.2 mV) que en las células de la fracción ligera (-47.4 ± 8.4 mV) mientras que los valores de resistencia de la membrana (R_m) no varían significativamente entre ellas. Las células de la fracción pesada parecen ser más grandes (9.3 ± 3.18 pF) que las de la ligera (7.42 ± 2.25 pF) y las curvas de conductancia-voltaje, así como las propiedades correspondientes a los dos componentes de la corriente de Ca^{2+} , son similares en las células de ambas fracciones (Lledo et al. 1991).

Cuando la corriente de Ca^{2+} se registra utilizando pulsos de voltaje, se pueden activar dos componentes: uno de decaimiento lento (SD o corriente tipo L) y otro de decaimiento rápido (FD o corriente tipo T). La contribución de cada componente al total de la corriente de Ca^{2+} de los lactotropos varía de célula a célula. La contribución de la corriente FD es pequeña en las células de la fracción ligera y grande en las de la fracción pesada. La relación corriente-voltaje

(I-V) determinada por la medida del pico de la $I_{Ca^{2+}}$ muestra diferentes máximos: -10 mV para las células de la fracción ligera y +10 mV para las de la fracción pesada (Cota et al. 1990).

Cota y colaboradores encontraron que en los lactotrofos de ratas macho, la corriente macroscópica que se produce a través de los canales de calcio activados por alto voltaje (HVA por sus siglas en inglés) en respuesta a una despolarización bajo fijación de voltaje es mayor en las células LP que en las SP. En los lactotrofos de animales adultos esta corriente llega a ser tres veces más grande que en los neonatos. En contraste, la actividad funcional de los canales de calcio activados por bajo voltaje (LVA por sus siglas en inglés) no difiere entre los 2 subtipos de lactotrofos. Estas observaciones sugieren que la entrada de calcio a través de los canales HVA puede ser un determinante crítico para la tasa basal de secreción de PRL (Felix R. et al. 1993; Horta J. et al. 1993). La inhibición de la secreción de PRL por omega-conotoxina (ω -CgTx) o nifedipina (bloqueadores orgánicos de los canales de calcio HVA) tampoco es uniforme en la población de lactotrofos; ω -CgTx así como nifedipina, reducen la fracción de lactotrofos que forman placas grandes, pero incrementa la proporción de los que forman placas pequeñas. Esto indica que los bloqueadores de HVA, disminuyen la secreción de las células LP a niveles mostrados por las SP (Horta J. et al. 1993).

Con respecto a otros canales, se ha descrito que en los lactotrofos de ratas macho, la expresión de canales de Na^{+} no es uniforme; la despolarización induce una mayor corriente de Na^{+} en los lactotrofos LP que en los SP. Los lactotrofos LP parecen expresar un mayor número de canales funcionales de Na^{+} por unidad de área de la membrana plasmática que los SP (Horta J. et al. 1991).

En resumen podemos decir que los lactotrofos se subdividen en tres sub-poblaciones morfológicas basadas en la densidad y diámetro de sus gránulos de secreción y en 2 sub-poblaciones según sus características fisiológicas y los parámetros que para evaluar esta característica se observen (calcio intracelular, potencial de membrana, secreción, etc.). Sin embargo no se ha establecido la relación entre estas sub-poblaciones y más aún, dentro de las sub-poblaciones fisiológicas pocas interrelaciones se han hecho con respecto a cada uno de los parámetros que se observan y que se describieron anteriormente.

GONADOTROPOS

Los gonadotropos (GtH) son células de la glándula pituitaria que al ser estimulados con hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) secretan dos gonadotropinas hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Al igual que en los lactotropos, en los gonadotropos se ha detectado la presencia de subtipos morfológicos y se ha observado que la distribución de las hormonas varía según el sexo, la edad y ciertas condiciones fisiológicas, llevando a pensar que además de la heterogeneidad morfológica, existe también una heterogeneidad funcional. Sin embargo pocos estudios se han realizado en cuanto a la heterogeneidad funcional de estas células.

Debido a que las variantes funcionales de los gonadotropos parecen estar relacionadas con los mecanismos de control de la secreción de gonadotropinas, la caracterización de estas variantes es muy importante. Sin embargo, no se ha desarrollado tanto como para los lactotropos (Denef C. et al. 1978).

- *Subpoblaciones morfológicas.*

Al igual que los lactotropos, los gonadotropos se pueden separar empleando diferentes técnicas como el gradiente diferencial de Percoll o de BSA. De esta forma se han podido caracterizar diferentes subpoblaciones de este tipo celular y se han tratado de establecer sus diferencias morfológicas y funcionales.

En las ratas, utilizando un gradiente de 0.3-2.4 de BSA, el porcentaje de gonadotropos incrementa gradualmente del 13% en la fracción 3 hasta el 75% en la fracción 7 (Denef C. et al. 1978). A su vez, los gonadotropos de porcino se pueden dividir en tres subpoblaciones: de baja densidad (fracción 8, densidad 1.087g/cm^3) de densidad media (fracciones 13-12, densidad 1.062g/cm^3) y de alta densidad (fracciones 15-14, densidad 1.049g/cm^3). Los animales neonatos poseen células de alta y baja densidad, los prepuberales poseen las tres subpoblaciones, mientras que los maduros sólo tienen de densidades alta y media (Torronteras R. et al. 1993).

En los neonatos de cerdo, se encuentran dos poblaciones enriquecidas de gonadotropos con densidades de 1.049g/cm^3 y 1.087g/cm^3 correspondiendo respectivamente al 57% y 19% del total de gonadotropos. En estos animales la subpoblación de baja densidad esta compuesta en su mayoría por células bihormonales FSH/LH (74.3%), aunque algunas células sólo contienen LH (25.7%) mientras que las células de alta densidad son exclusivamente células bihormonales. El examen ultraestructural de las células de baja densidad muestran un RE rugoso (RER) y complejo de Golgi (GC) muy desarrollados y gránulos de secreción (GS) en pequeñas cantidades. Por el contrario las células de alta densidad tienen grandes cantidades de gránulos (Torronteras R. et al. 1993).

En los animales prepúberes de cerdo, la población de gonadotropos está separada en tres subpoblaciones de acuerdo con su densidad: 1.087g/cm^3 , 1.062g/cm^3 y 1.049g/cm^3 con 41%, 21% y 8% del total de células GtH respectivamente. La población de baja densidad está básicamente compuesta por células monohormonales de LH (82.2%) e incluye pequeñas cantidades de monohormonales FSH y bihormonales. Tienen gránulos de secreción poco desarrollados y la maquinaria biosintética (RER y CG) muy desarrollada. Las poblaciones de densidad media y alta son casi exclusivamente células bihormonales. Las células de alta densidad tienen grandes cantidades de GS y una maquinaria de biosíntesis pobre. La subpoblación de densidad media tienen pocos y pequeños GS y muy poco desarrollado el RER y GC. Por el contrario, en los animales maduros sólo se detectaron células de media y baja densidad con 27% y 30% del total de células GtH respectivamente (Torronteras R. et al. 1993). Las células de baja densidad están compuestas en su mayoría de monohormonales LH y bajas proporciones de monohormonales FSH (19.6%) y bihormonales (20.6%). Las células de densidad media tienen primordialmente células bihormonales (62.5%) y 37.5% de monohormonales FSH. El examen ultraestructural de estas células muestra que las de baja densidad son morfológicamente similares a las de baja densidad de neonatos y prepúberes al igual que las de media densidad (Torronteras R. et al. 1993). Es interesante hacer notar que las células de los neonatos son en su mayoría bihormonales LH/FSH, mientras que los GtH de los prepúberes y maduros en su mayoría son monohormonales LH. Estas diferencias pueden estar relacionadas con los cambios en la secreción de las hormonas gonadales durante el desarrollo.

De acuerdo con Torronteras R. y colaboradores (1993), las subpoblaciones morfológicas de los gonadotropos se pueden dividir de la siguiente manera: 1) *células que sintetizan* y que corresponden a la población de baja densidad, estas células tienen muy desarrollada la "maquinaria" de síntesis (RER y GC) y pocos GS; 2) *células en descanso* (población de densidad media), con pocos GS desarrollados y maquinaria de síntesis. Por último, la subpoblación de alta densidad o *células de almacenaje*, con abundante GS y poca maquinaria de síntesis.

Existen diferentes interpretaciones de la función fisiológica que pueden tener estas subpoblaciones. Childs y colaboradores (1981) sugieren que en la rata las células con pocos gránulos de secreción pueden ser un grupo de células inmaduras que posteriormente se desarrollan, mientras que Torronteras y colaboradores (1993) plantean que al menos en el cerdo este tipo de subpoblación celular podría representar células maduras en una fase del ciclo secretor en el cual las células sintetizan hormona. Una explicación semejante se le da, al único grupo de células que no se encuentra en el animal maduro, la subpoblación de alta densidad o células de almacenaje según Torronteras y col. (1993) podrían representar también un grupo menos activo de células GtH que representan otra fase del ciclo secretor.

Estudios con ratas ciclantes indican que los gonadotropos de tamaño pequeño o medio pueden agrandarse o volverse más densos durante el diestro temprano y ser reclutadas para contribuir al pico de secreción de LH durante el proestro. Esto sugiere que los cambios de tamaño y densidad son fisiológicamente significativos y dependen del estado hormonal del animal (Torronteras R. et al. 1993).

En resumen, podemos decir que: 1) los gonadotropos de baja densidad que están presentes en animales neonatos, prepúberes y maduros tienen muy pocos gránulos de secreción que ocupan cerca del 10% del citoplasma, tienen muy desarrollado la maquinaria biosintética (retículo endoplásmico rugoso y Golgi) lo cual ocupa cerca del 30% del volumen citoplásmico. Esta subpoblación de gonadotropos es equivalente a las células de síntesis y almacenamiento. Preferentemente son bihormonales en los animales prepúberes y secretan un tipo de hormona (LH) en maduros (Lloyd J. et al. 1988). Algunos autores han planteado que estas células no son sensibles al GnRH y por lo mismo las denominan células inmaduras (Childs G. et al. 1983). Los

gonadotropos de densidad media o células en reposo que almacenan ambas gonadotropinas, están presentes en animales prepuberales y maduros. Tienen pocas vesículas de secreción que ocupan cerca del 12% del citoplasma y muy poco desarrollado RER y GS y por último los gonadotropos de alta densidad que sólo están presentes en animales neonatos y prepúberes. Sus gránulos de secreción tienen gran diámetro y ocupan cerca del 25% del volumen citoplasmático. El RER y las GC están escasamente desarrollados así, estas células representan un grupo de células de almacenaje que contienen ambas hormonas (Childs G. et al. 1983).

- *Secreción*

El GnRH es el principal regulador fisiológico directo de la secreción de gonadotropinas por los gonadotropos de la adenohipófisis. Otras hormonas y neurotransmisores como arginina, vasopresina (AVP), oxitocina (OT), neurotensina (NT), serotonina (5-HT), polipéptido pituitario activado por adenilato ciclasa (PACAP) y endotelina 1 (ET-1), pueden afectar la liberación de las gonadotropinas así como diferenciar entre grupos de gonadotropos y regular diferencialmente la secreción de FSH ó LH. Los gonadotropos difieren en su sensibilidad a estos factores (Billiard J., 1996).

Las células obtenidas de ratas hembras, forman placas de hemólisis cuyo tamaño es mucho mayor ($8668 \pm 399 \mu\text{m}^2$) que las de los machos ($1667 \pm 152 \mu\text{m}^2$). El porcentaje de células positivas para LH aumenta significativamente con la edad en ambos sexos, de $5.2 \pm 0.4\%$ y $5.6 \pm 0.2\%$ del total de la población celular de la adenohipófisis en la hembra y en el macho respectivamente a los 5 días, a aproximadamente 10% en ambos sexos al día 15, cayendo después significativamente a $5.7 \pm 0.4\%$ en la hembra en proestro y $6.7 \pm 0.4\%$ en el macho. No existen diferencias significativas entre el macho y la hembra excepto a los 30 o 40 días de edad (Chen H.T. 1988). La media de secreción de LH de células individuales indicadas por la media del tamaño de las placas en RHPA también incrementa gradualmente con la edad en ambos sexos de $1141 \pm 120 \mu\text{m}^2$ en la hembra y $1301 \pm 138 \mu\text{m}^2$ en el macho a los 5 días de edad, hasta un pico cerca de los 50 días de edad de $3193 \pm 55 \mu\text{m}^2$ en el macho y $8668 \pm 399 \mu\text{m}^2$ en la hembra (Chen H.T. 1988).

Los gonadotropos pequeños son multipotenciales y responden inicialmente a la estimulación con GnRH sintetizando y almacenando una de las gonadotropinas, mientras que los gonadotropos grandes se han reportado diferentes patrones de secreción de LH y FSH según si las células son monohormonales o bihormonales. Los gonadotropos grandes monohormonales presentan una mayor tasa de secreción y los gonadotropos grandes multihormonales responden incrementando tanto el número de células secretoras como la cantidad de hormona secretada y tienen una secreción de ambas gonadotropinas no paralela cambiando la tasa de empacamiento de las subunidades y su tránsito en el complejo de Golgi (Torronteras R. et al. 1995).

- *Variaciones de calcio libre intracelular.*

En comparación con todo lo que se ha estudiado y caracterizado acerca de las subpoblaciones entre lactotropos, poco se ha reportado a cerca de las subpoblaciones fisiológicas de los gonadotropos. Se sabe que en ausencia de GnRH, cerca del 50% de los gonadotropos presentan potenciales de acción espontáneos y fluctuaciones pequeñas de $[Ca^{2+}]_i$ basal con un nivel de $[Ca^{2+}]_i$ de aproximadamente 198 nM mientras que el otro 50% mantiene un nivel estable de $[Ca^{2+}]_i$ (175 ± 3 nM) (Lida T., et al. 1991). La respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ al estímulo con GnRH, endotelinas y PACAP es muy semejante en ambos subtipos celulares para células de machos, hembras y ratas ovariectomizadas, siendo su forma dependiente de la concentración del secretagogo (Kwiecien R. et al. 1998). La señal de $[Ca^{2+}]_i$ está fuertemente influenciada por la etapa del desarrollo, el ciclo estral y la ovariectomía, pero entre las células de la glándula de un mismo organismo parecen no haber diferencias significativas en la respuesta al GnRH (Tomic M. et al. 1994). Algunos autores han reportado diferencias en la respuesta a agonistas de canales de calcio tipo L como es el Bay K que en algunas de estas células produce una serie de transitorios en la $[Ca^{2+}]_i$ y en otras no tiene ningún efecto (Rawlings S. et al. 1991).

CONCLUSIONES

Durante muchos años se pensó que las diferencias entre las células de la glándula adenohipofisiaria solamente estribaban en el tipo de hormona que cada una secreta, e inicialmente se planteó que cada tipo de célula secretaba sólo un tipo de hormona. Con el tiempo y el avance de las metodologías e instrumentos de estudio, algunas de estas ideas empezaron a cambiar y se encontró que hay células que pueden sintetizar y secretar más de una hormona (lactosomatotropos o FSH/LH) y que estas mismas células pueden cambiar de un tipo a otro de hormona secretada dependiendo mayoritariamente de factores fisiológicos como la edad, el sexo, la fase del ciclo reproductor, etc. Ahora, resulta un hecho que las células de la glándula adenohipofisiaria representan una población celular muy heterogénea y por lo tanto la comprensión de los mecanismos de regulación y organización de esta heterogeneidad se ha vuelto más complejo.

A medida que se avanza en el estudio de los mecanismos de regulación de la secreción nos hemos dado cuenta que si bien existen características generales, como secretagogos específicos, mecanismos de cambio en la $[Ca^{2+}]_i$, tipos de canales iónicos, etc. éstos constituyen caminos generales sobre los cuales se encuentran muchas variaciones entre los 6 tipos celulares, pero no solo entre ellos, sino también internamente entre miembros de cada grupo.

En la adenohipófisis se han observado grupos de células (19-39%) que a pesar de que muestran un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ al ser estimuladas con una despolarización de la membrana, no responden a ninguna de las hormonas estimuladoras de la liberación de hormonas (HLHs). También existen células (31%-50%) que solamente responden a un HLH y, grupos (29%-31%) que responden a más de un HLHs, incluyendo una minoría (3%-7%) que responde a todos (Villalobos C. et al. 1997). El significado de esta heterogeneidad, incluso en la respuesta a los secretagogos "específicos" dista mucho de estar aclarado.

Como se ha descrito en esta revisión, muchas de las características o parámetros que se estudian de las células adenohipofisiarias, varían dependiendo del sexo, la edad, la fase del ciclo reproductor y la región de la glándula y, en su mayoría están asociadas con diferencias en la

secreción (síntesis, transporte y liberación) de hormonas. Sin embargo la discusión sobre el significado de estas diferencias no ha ido muy lejos, puesto que resulta difícil comprobar si estas diferencias se deben a que cierto tipo de células es más o menos inmaduro y por lo mismo no desarrolla los mecanismos o instrumentos para la secreción o si por el contrario constituyen subtipos diferentes con otras funciones como sintetizar y secretar factores tróficos o regular la secreción de otras células a su alrededor.

Por todo lo anterior, para poder estudiar y entender la hipófisis se vuelve cada vez más importante tomar en cuenta esta heterogeneidad celular considerando además, los factores que pueden intervenir en establecer dichas diferencias.

BIBLIOGRAFIA

1. Arita J., Kojima Y. and Kimura F. Identification by the sequential cell immunoblot assay of a subpopulation of rat dopamine-unresponsive lactotrophs. *Endocrinology* (1991)128; 4: 1887-1894.
2. Billiard J. Functional heterogeneity of pituitary gonadotropes in response to a variety of neuromodulators. *Mol. and Cellular Endocrinology* (1996)123: 163-170.
3. Bollengier F., Velkeniers B., Hooghe-Peters E., Mahler A. and Vanhaelst L. Multiple forms of rat prolactin and growth hormone in pituitary cell subpopulations separated using a percoll gradient system: disulphide-bridged and glycosylated variants. *Journal of Endocrinology* (1989)120: 201-206.
4. Boockfor F. and Frawley S. Functional variations among prolactin cells from different pituitary regions. *Endocrinology* (1987)120; 3: 874-879.
5. Cochilla A., Angleson J. and Betz W. Differential regulation of granule-to-granule and granule-to-plasma membrane fusion during secretion from rat pituitary lactotrophs. *Journal of Cell Biology* (2000)150; 2: 839-848.
6. Cota G., Hiriart M., Horta J. and Torre-Escalante J. Calcium channels and basal prolactin secretion in single male rat lactotropes. *Am. J. Physiol.* (1990)259: C949-C959.
7. Chen H. Sexual dimorphism of pituitary gonadotropes during postnatal development in the rat. *Mol. and Cellular Endocrinology* (1988)57: 33-39.
8. Childs G., Ellison D. and Garner L. An immunocytochemist's view of gonadotropin storage in the adult male rat: Cytochemical and morphological heterogeneity in serially sectioned gonadotropes. *American Journal of Anatomy* (1980)158: 397-409.
9. Childs G., Hyde Camille., Naor Z. and Catt K. Heterogeneous luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone storage patterns in subtypes of gonadotropes separated centrifugal elutriation. *Endocrinology* (1983)113; 6: 2120-2128.
10. Deneff C., Hautekeete E. and Rubin L. A specific population of gonadotropes purified from immature female rat pituitary. *Science* (1976)194: 848-850.
11. Deneff C., Hautekeete E., Wolf A. and Bernadette V. Pituitary basophils from immature male and female rats: distribution of gonadotropes and tirotrophs as studied by unit gravity sedimentation. *Endocrinology* (1978)103: 724-735.

12. Frawley L., Clark C., Schoderbek W., Hoeffler J. and Boockfor F. A novel bioassay for lactogenic activity: demonstration that prolactin cells differ from one another in bio- and immuno-potencies of secreted hormone. *Endocrinology* (1986)119; 6: 2867-2869.
13. Gore A., Villalobos C. and Frawley S. Differential influences of gender and physiological status on calcium dynamics and prolactin gene expression in rat mammatropes. *Endocrine* (1999)11; 2: 131-136.
14. Horta J and Cota G. Lactotrope subtypes are differentially responsive to calcium channel blockers. *Molecular and Cellular Endocrinology* (1993)92: 189-193.
15. Horta J, Hiriart M. and Cota G. Differential expression of Na channels in functional subpopulations of rat lactotropes. *Am. J. Physiol.* (1991)261: C865-C871.
16. Hu L. and Lawson D. Prolactin release from subpopulations of rat lactotrophs in the presence and absence of dopamine. *Journal of Endocrinology* (1996)148: 113-120.
17. Kazemzadeh M., Velkeniers B., Herregodts P., Collumbien R., Finné E., Derde M., Vanhaelst L. and Hooghe-Peters E. Differential dopamine-induced prolactin mRNA levels in various prolactin-secreting cell (sub)populations. *Journal of Endocrinology* (1992)132: 401-409.
18. Kukstas L., Domec Ch. Bascles L., Bonnet J., Verrier D., Israel J. and Vincent J. Different expression of the two dopaminergic D2 receptors, D2₄₁₅ and D2₄₄₄, in two types of lactotroph each characterised by their response to dopamine, and modification of expression by sex steroids. *Endocrinology* (1991)129; 2: 1101-1103.
19. Kukstas L., Verrier D., Zhang J., Chen Ch., Israel J. and Vincent J. Evidence for a relationship between lactotroph heterogeneity and physiological context. *Neuroscience Letters* (1990)120: 84-86.
20. Kwiecien R. and Hammond C. Differential Management of Ca²⁺ oscillations by anterior pituitary cell: a comparative overview. *Neuroendocrinology* (1998)68: 135-151.
21. Lamberts S. and Macleod R. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* (1990)70; 2: 279-317.
22. Lida T., Stojilkovic S., Izumi S. and Catt K. Spontaneous and Agonist-Induced Calcium Oscillations in Pituitary Gonadotrophs. *Molecular Endocrinology* (1991)5; 7: 949-958.

23. Luque E., Munoz M., Smith P. and Neill J. Subpopulations of lactotropes detected with the reverse hemolytic plaque assay differential responsiveness to dopamine. *Endocrinology* (1986)118; 5: 2120-2124.
24. Lledo P., Guerineau N., Mollard P., Vincent J. and Israel J. Physiological characterization of two functional states in subpopulations of prolactin cells from lactating rats. *Journal of physiology* (1991)437: 477-494.
25. Lloyd J. and Childs G. Differential storage and release of luteinizing hormone and follicle-releasing hormone from individual gonadotropes separated by centrifugal elutriation. *Endocrinology* (1988)122; 4: 1282-1290.
26. Malgaroli A., Vallar L., Elahi FR., Pozzan T., Spada A. and Meldolesi J. Dopamine inhibits cytosolic Ca^{2+} increases in rat lactotroph cells. Evidence of dual mechanism of action. *J. Biol. Chem* (1987)262; 29: 13920-12927.
27. Mena F., Clapp C., Aguayo D., Morales T., Grosvenor C. and Martinez de la Escalera G. Regulation of prolactin secretion by dopamine and thyrotropin-releasing hormone in lactating rat adenohypophysis: influence of intracellular age of the hormone. *Endocrinology* (1989)125; 4:1814-1820.
28. Neill J. and Frawley L. Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* (1983)112:1135-1137.
29. Nogami H. Fine-structural heterogeneity and morphologic changes in rat pituitary prolactin cells after estrogen and testosterone treatment. *Cell Tissue Res* (1984)237: 195-202.
30. Paul A., Pons P., Aoki A. and Torres A. Differential behavior of lactotroph cell subpopulations in response to angiotensin II and thyrotrophin-releasing hormone. *Cellular and Molecular Neurobiology* (1997)17; 2: 245-258.
31. Rawlings S., Berry D. and Leong D. Evidence for localized calcium mobilization and influx in single rat gonadotropes. *Journal of Biological Chemistry* (1991)266; 33: 22755-22760.
32. Smith P., Frawley S. and Neill J. Detection of LH release from individual pituitary cells by reverse hemolytic plaque assay: Estrogen increases the fraction of gonadotropes responding to GnRH. *Endocrinology* (1984)115; 6: 2484-2486.

33. Sortine Ma. and Wise P. Effects of age and long term ovariectomy on prolactin secretion, as assessed by the reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* (1989)124; 1: 90-96.
34. Tomic M., Cesnjaj M., Catt K and Stojilkovic S. Developmental and Physiological aspects of Ca^{2+} signaling in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* (1994)135; 5: 1762-1771.
35. Torronteras R., Castaño J., Almaden Y., Ruiz-Navarro A. and García-Navarro F. Hormonal storage patterns and morphological heterogeneity of porcine gonadotrope cells during postnatal development. *Molecular and Cellular Endocrinology* (1993)97: 51-59.
36. Torronteras R., Doblado-Berrios P., García-Navarro S., Malagón M. and García-Navarro F. Heterogeneous response of porcine gonadotrope subpopulations to gonadotropin releasing hormone (GnRH) during postnatal development. *Molecular and Cellular Endocrinology* (1995)112: 203-213.
37. Velkeniers B., Hooghe-Peters E., Hooghe R., Belayew A., Smets G., Claeys A., Robberecht P. and Vanhaelst L. Prolactin cell subpopulations separated on discontinuous percoll gradient: an immunocytochemical, biochemical, and physiological characterization. *Endocrinology* (1988)123; 3: 1619-1630.
38. Vila-Porcile E. and Barret A. Structural and functional differences between prolactin cells from the inner and outer zones of the male rat anterior pituitary. *Cell and Tissue Research* (1996)284: 247-259.
39. Villalobos C., Nuñez L., Frawley S., García-Sancho J. and Sánchez A. Multi-responsiveness of single anterior pituitary cells to hypothalamic-releasing hormones: A cellular basis for paradoxical secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997)94: 14132-14137.
40. Winiger B. Wuarin F., Zahnd G., Wollheim C. and Schlegel W. Single cell monitoring of cytosolic calcium reveals subtypes of rat lactotrophs with distinct responses to dopamine and thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* (1987)126; 6: 2222-2227.

Oestrogen Regulates Neurofilament Expression in a Subset of Anterior Pituitary Cells of the Adult Female Rat

T. Fiordelisis and A. Hernández-Cruz

Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Biofísica, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México City, México.

Key words: pituitary, anterior pituitary, neurofilament, oestrogen, subpopulations.

Abstract

It is the prevailing view that the neurohypophysis derives from neural crest while the pituitary's anterior lobe is of ectodermal origin. However, it has been recently suggested that anterior pituitary cells could have in part neuro-ectodermal origin, and thus should express specific neuronal markers. This issue was examined previously with conflicting results. The present study attempts to clarify the question of whether or not neuronal markers are expressed in the adenohypophysis. Using quantitative immunofluorescence, we have positively identified a subset of anterior pituitary cells, which express immunoreactivity for neuronal markers, including 68 kDa neurofilament (NF68). Interestingly, we noticed that the expression of NF68 is sexually dimorphic (i.e. neurofilament-positive cells are more abundant in sexually mature female rats). In addition, NF68 expression in female rats increases during ontogenic development and reaches a plateau level after puberty. Thereafter, it displays plastic changes along the oestrous cycle, with the maximum of neurofilament expression at oestrus and the minimum at proestrus. NF68 immunoreactivity was examined after ovariectomy, oestradiol replacement and treatment with an specific oestrogen receptor antagonist. Bilateral ovariectomy induced a significant reduction in the number of NF68-positive cells. This effect was completely prevented by treatment of ovariectomized rats with oestradiol. When intact female rats were treated with the anti-oestrogen tamoxifen, a drastic decrease in NF68 expression in anterior pituitary cells was observed. Furthermore, oestradiol administration in castrated male rats increased NF68 immunoreactivity. Double-immunolabelling experiments provided evidence that pituitary cells expressing neuronal traits correspond to subsets of lactotrophs, somatotrophs, thyrotrophs and gonadotrophs. It remains to be established if NF68 induction in the pituitary is due to direct and/or indirect effects of oestrogens. Also, the possible functional role of this subset of NF68-positive anterior pituitary cells in the female rat remains to be examined.

The pituitary comprises an endocrine (anterior) and a neural (posterior) lobe. Generally, it is accepted that the neurohypophysis derives from neural crest while the pituitary's anterior lobe is of ectodermal origin. However, separate observations have led some authors to suggest that at least a subpopulation of anterior pituitary cells could have a neuro-ectodermal origin. Takor and Pearse (1), working in the leghorn chicken, suggested that the two lobes of the pituitary originate from the ventral neural folding. More recently, Eagleson *et al.* (2) argued that at least the corticotrophs from the frog pituitary originate from the ventral neural plate, and Ogawa *et al.* (3) showed that endocrine cells from the anterior

lobe of human pituitary can express both keratin (an epithelial marker) and neurofilaments (a neuronal marker). Studies focused on the early development of the gland gave experimental support to the notion that the anterior pituitary cells could be partly of neuro-ectodermal origin. Performing microsurgical experiments on the chicken embryo during the open neural state, ElAmraoui and Dubois (4, 5) found evidence suggesting that the anterior ridge of the neural plate is predetermined to form part of the adenohypophysis.

If the above-mentioned hypothesis is correct, then it could be expected that at least a subset of anterior pituitary cells should express specific neuronal markers. This question has

Correspondence to: Arturo Hernández-Cruz, Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México City, D.F. 04510, PO Box: 70-253, México (e-mail: abernaa@ifscun1.ifisiol.unam.mx).

©2002 Blackwell Science Ltd

Journal of Neuroendocrinology 77211-7 7/3/02 14:21:51 Rev 7.51a/w (May 2 2001)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1A2

2 Oestrogen regulates neurofilament expression in anterior pituitary

been examined in the past with conflicting results. Ogawa *et al.* (3, 6) reported the expression of neurofilaments in human male and female adenohypophysis and Tooze *et al.* (7) showed that adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-secreting AT-20 cells derived from a murine pituitary tumour express all three neurofilament polypeptides among other neuronal features. However Trojanowski *et al.* (8) and, more recently, Halliday *et al.* (9) in human pituitary and Back *et al.* (10) in rat pituitary, reported that neurofilaments were absent in the anterior lobe, being only present in the neurohypophysis. These conflicting results could be due to differences in experimental conditions, different sensitivity of the assays or uncontrolled factors, such as age and sex of the animals.

The present work began with the specific goal of re-examining the expression of different neuronal markers [neurofilament (NFs) 68 kDa, NFs 200 kDa and MAP-2] in short-term primary cultures of rat pituitary. Our results provided convincing evidence that a subset of pituitary cells from the adult rat have a robust expression of these neuronal markers, which in addition is sexually dimorphic. Pituitary cells expressing neuronal traits correspond to subsets in the population of lactotrophs, somatotrophs, thyrotrophs and gonadotrophs. One question that remains to be answered is to what extent the findings of this study may imply differences in the physiological role of subsets of pituitary cells in males and females.

Methods

Primary cultures of rat pituitary cells

All animal studies were performed under an institutionally approved protocol similar to the USPHS Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Wistar rats were maintained in the Institute's animal facility under a 12:12 h light/dark cycle and were fed rat chow *ad libitum*. They were killed by decapitation under ether anaesthesia and pituitary glands were dissected under aseptic conditions. Pituitary glands were taken from female and male rats of different ages and experimental conditions, and cells obtained were cultured separately. Adult female rats were of random oestrous cycling.

After dissection, pituitary glands were transferred to ice-cold DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) supplemented with bovine serum albumin (BSA Fraction V, Gibco BRL) 0.75 mg/ml (DMEM-BSA). The adenohypophysis was separated from the neurohypophysis under a stereomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan), cut into pieces and digested by incubation with 2.5 mg/ml trypsin (Worthington Biochem Co., Lakewood, NJ, USA) and 0.1 mg/ml type 1 collagenase (Worthington Biochem Co.) in DMEM for 25 min at 37 °C. The tissue fragments were gently triturated with a fire polished siliconized Pasteur pipette and the cells were washed twice with DMEM-BSA and centrifuged for 10 min at 1200 r.p.m. The pellet was resuspended in DMEM-culture medium (DMEM supplemented with 10% heat-inactivated (60 °C, 1 h) Horse Serum, Gibco BRL, 2% heat-inactivated Fetal Bovine Serum Gibco BRL, 10 000 U penicillin Gibco BRL, 10 mg/ml streptomycin, Gibco BRL, and 5 µg/ml insulin, Sigma, St. Louis, MO, USA). The concentration of oestradiol in the batches of serum used in this study (before inactivation) was approximately 6.8×10^{-11} M (Serum Biochemical Profile, Gibco BRL), which gives a final concentration in the culture medium of 8.0×10^{-12} M. Pituitary cells were preplated for 45 min on sterile plastic Petri dishes to remove fibroblasts and other contaminating cells. Aliquots of 50 µl of unattached pituitary cells were then seeded on #1 round glass coverslips (Thomas Scientific; Swedesboro, NJ, USA) previously treated with 100 µg/ml poly-L-lysine (Sigma) and placed in the bottom of 12-well culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA) at a density of 5×10^4 cells per well. After 30 min, 1 ml of culture medium was added to the wells, and cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere (95% air and 5% CO₂). Routine medium changes were carried out three times per week. Although healthy cells could be maintained for up to

3 weeks in culture, all results here reported were carried out with cultures maintained for 24–36 h.

Culture of rat sympathetic neurones

Cultures of superior cervical ganglion neurones were prepared as previously described (11). Briefly, ganglia from 10-day-old rats were removed under aseptic conditions after ether anaesthesia and cervical dislocation. After cleaning and chopping, they were incubated in Ca²⁺/Mg²⁺-free Hanks with 1 mg/ml trypsin (Worthington Biochem Co.) and 2 mg/ml DNase I for 30 min at 37 °C. After digestion, trypsin was inactivated by dilution in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1 mg/ml trypsin inhibitor (Sigma) and the tissue was incubated in Hanks with 2 mg/ml collagenase and 2 mg/ml DNase I for 30 min at 37 °C. After trituration with a Pasteur pipette, the cell suspension was centrifuged, washed twice in Hanks and resuspended in fresh control culture medium. Cells were seeded on poly-L-lysine-treated #1 round glass coverslips (1×10^5 cells per well), and maintained in control culture medium supplemented with 30 ng/ml of 7S NGF (Sigma) at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Culture medium was changed three times per week. All experiments were carried out with cultures less than 5 days old.

Culture of Chinese hamster ovary (CHO) cells

CHO cells (CHO-K1, Chinese hamster ovary, American Type Culture Collection #ATCC CCL61 from *Osteoblast griseus*, a gift of Dr Bernardo Rudy), were cultured in α -MEM (pH 7.4, Gibco BRL) supplemented with 10% FBS in the presence of penicillin and streptomycin at 37 °C in a 95% air with 5% of CO₂ atmosphere in 100-mm diameter culture dishes (Costar). When the cells were confluent, the monolayer was incubated with trypsin-EDTA (Gibco BRL) for 1 min and the cells re-suspended in α -MEM containing 10% FBS and plated at a 1:10 dilution in new 100-mm dishes or in #1 glass coverslips. The medium was changed every two days and the cells were passaged every 4 days.

Determination of oestrous cycle

The phase of the oestrous cycle was determined in normal cycling rats by microscopic examination of vaginal smears in the morning of the experiment, just before decapitation under ether anaesthesia for primary culture of pituitary cells.

Gonadectomy

A group of 90 Wistar female or male rats 60 days of age were bilaterally gonadectomized following institutionally approved guidelines for animal care and use. The surgical procedure was conducted under aseptic conditions and general anaesthesia using pentobarbital 20 mg/kg i.p. Sham operations were performed by surgically exposing the gonads without their removal. After recovery from anaesthesia in warmed cages, the rats were treated orally for 5 days with 0.01 mg/kg of 10% fluorocinonol solution (Nuflo, Shering Plough) and examined daily for possible infection. Rats were fed *ad libitum* and maintained on a 12:12 h light/dark cycle. After 15 days postoperation, rats were killed and pituitary cell cultures were prepared as previously explained. [1]

Oestrogen replacement therapy

Oestrogen treatment was conducted as previously described (12). The oestrogen 17 β -oestradiol; 1,3,5(10)-oestratriene 3,17 β -diol (Sigma) was diluted in sesame oil (0.2 mg/ml) and administered subcutaneously (20 µg per 100 g weight) daily at morning, approximately 0.2 ml sesame oil injected per (rat), for 4 consecutive days to a group of 15 gonadectomized rats, beginning on the 15th day after the operation. Control gonadectomized rats were injected with the same amount of oil. After the treatment, rats were killed and pituitary cell cultures were prepared as previously described.

Anti-oestrogenic treatment

Tamoxifen administration was carried out as reported by Donath and Nishino (13). Tamoxifen 1 mg (Nolvadex; Zeneca Mexicana, México City, México) was dissolved in 25 ml of tap water. This amount of water was given daily to four female rats 60 days of age for 15 consecutive days. Control rats were given the same amount of tap water. Rats did not drink any other water during the tamoxifen treatment period. Thereafter, rats were killed and pituitary cell cultures were prepared as previously described.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Immunofluorescence

Immunostaining of specific neuronal markers and quantification of immunoreactivity

The primary antibodies used were anti-rat 68 kDa neurofilament [monoclonal immunoglobulin (IgG anti-NF68; clone NR4, Duako, Carpinteria, CA, USA), anti-rat 200 kDa neurofilament (monoclonal IgG anti-NF200; RMO-24, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) and anti-rat microtubule associated protein (anti-MAP-2; clone HM-4, Sigma). The secondary antibody used for detection of neuronal markers was tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated antineuronal antibody (Zymed).

Cultures were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature, washed with PBS and incubated with a blocking-permeabilizing solution containing 0.2% BSA (w/v) and 0.1% (v/v) Triton X 100 for 30 min at room temperature. Then, cultures were washed, and incubated in a humid chamber overnight at 4 °C with one of the primary monoclonal antibodies (anti-NF68, anti-NF200 or anti-MAP-2; dilution 1:100). The next day, cultures were washed and incubated for 2 h at room temperature with TRITC-conjugated antineuronal secondary antibody (dilution 1:80). After final washing with PBS, coverslips were mounted on glass slides with mounting medium containing 15 mM of Na₂S₂O₈ (Duako). Negative controls were prepared by reacting cultures with (i) the primary antibody alone or (ii) the secondary antibody alone. As expected, these samples showed no fluorescence.

Cultures were viewed with epifluorescence microscopy (excitation: 510–560 nm, dichroic mirror 580 nm, barrier filter 590 nm) with a 100-W mercury lamp mounted on a Nikon Diaphot TMD microscope (Nikon) and using an oil-immersion objective (Plan Apo 60 \times , NA 1.4, Nikon). Images were acquired with a cooled CCD digital camera of high sensibility and linearity (16 bit resolution; MCD1000, SpectraSource Instruments, Westlake Village, CA, USA). Illumination was limited to the exposure time with an electronic shutter (Lambda 10, Sutter Instruments, Axon Ins., Union City, CA, USA). To establish the appropriate exposure range, expected minimum and maximum fluorescence intensities were determined by measuring the mean fluorescence intensity of nonexpressing CHO cells and strongly expressing rat sympathetic neurons (negative and positive controls, respectively). Exposures of 0.25 s were found best for the range of fluorescence intensities of the samples. Uncompressed FITS images were converted to TIFF image format (8 bits) and stored for analysis. Images were analysed with Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Version 2.0, Silver Spring, MD, USA). A small circle (5.0 μ m in diameter) was defined as the area of interest from which mean brightness was determined. Fluorescence intensity measurements were obtained by placing this circle on the cytoplasmic (non-nuclear) region of each cell of the image, as well as from 3–8 areas of the coverslip free of cells (background values). Pituitary cells were easily distinguished from fibroblasts and other contaminating cells present in these pituitary cultures. The mean background fluorescence from each field was then subtracted from the raw fluorescence intensities of all cells measured from the same field. Background-corrected fluorescence intensities (specific fluorescence) from all cells comprised in up to 100 fields of at least three independent cultures from each experimental group were collected and processed (see below). The results were plotted with Origin 3.8 (Microcal, Northampton, MA, USA) and image composition was made with Microsoft PowerPoint (Microsoft Co., Redmond, WA, USA).

Every experimental condition was repeated at least three times, and data resulting from the analysis of up to 300 fields of the same experimental condition in different cultures were pooled. The mean, SEM and *n* reported correspond to all the cells counted in all repetitions of the same condition. Data analysis was performed using the statistical program Statview 4.57 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA), with comparisons using analysis of factorial variance (factorial ANOVA) at 99% confidence interval based upon Fisher's PLSD test (this statistic is not shown). A nonparametric statistical test (Kolmogorov–Smirnov) was also used. This test appears more appropriate to compare our data groups, since the distribution of the fluorescence intensity in pituitary cultures conforms a Poisson distribution rather than a normal distribution. Significant differences obtained with the Kolmogorov–Smirnov are reported at the 99% confidence interval. The main conclusions of this study remained unaltered regardless of the statistical test used.

Immunolabelling of pituitary slices

The pituitaries from 60-day old female rats were removed and fixed for 72 h in 10% buffered formalin (10% neutral formal), after washing overnight, the

tissue was dehydrated in graded ethanol and embedded in paraffin as described previously (14). Sections of 5 μ m in thickness were cut and mounted on glass slides. The paraffin was then removed and slices were rehydrated. For immunolabelling, the same protocol as for cell cultures was applied, with small modifications: the concentration of Triton X 100 in the BSA blocking solution was increased from 0.1 to 1% (v/v), and all incubations with antibodies were conducted in the presence of BSA-containing blocking-permeabilizing solution.

Identification with double-immunolabelling of pituitary cells expressing neuronal markers

Double-immunolabelling was carried out to ascertain the identity of pituitary cells expressing neuronal markers. Primary antibodies against pituitary hormones used were: rabbit anti- α follicle stimulating hormone, anti-prolactin and anti- α thyroid stimulating hormone (TSH) (kindly supplied by Dr A.F. Parlow from the National Program of Pituitary Hormones of the NIH-NHDDK), as well as polyclonal rabbit antibodies anti- α luteinizing hormone (LH) and anti-growth hormone (GH) (Biogenesis Laboratory, UK). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) was used as the secondary antibody for hormone detection. For double-immunolabelling, neurofilament staining was carried out with a Cy5-conjugated antineuronal antibody (Zymed) instead of the TRITC-conjugated one, to allow a greater difference between the peaks of the emission spectra and to minimize fluorescence bleed-through between the two detectors of the confocal microscope (see below).

Fixed and permeabilized cells were incubated overnight at 4 °C with one of the primary antihormone antibodies, and after several washes with PBS, they were incubated for 2 h with the FITC-conjugated secondary antibody (dilution 1:100). After three more washes, the cells were incubated for 1 h at room temperature with the F(ab)₂ fraction of guinea-pig anti-rabbit IgG (dilution 1:20; purified goat F(ab)₂ anti-rabbit IgG (H+L), Cedarlane Laboratory, Ontario, Canada). This procedure blocks residual binding sites in the primary antibody: pituitary hormone complex, thus preventing nonspecific binding either of the primary anti-NF68 antibody or of the second secondary antibody (15). After three more washes, cells were incubated at room temperature for 2 h, with the monoclonal anti-NF68 antibody, and then, for an additional 2 h with the second secondary antibody (dilution 1:100, Cy5-conjugated antineuronal; Zymed). Finally, the coverslips were mounted on glass slides with Duako mounting medium.

Several negative controls were required to achieve a reliable double-immunolabelling. Negative control of the primary antibodies, was accomplished by incubating for 2 h a primary antibody in the presence of an excess of their specific hormone (100 μ g/ml; supplied by Dr Parlow, NIH-NHDDK), and then reacting cultures, first with the preincubated antibody and then with the secondary antibody. No immunoreactivity was found after this procedure, nor by reacting cultures with the primary antibody alone or the secondary FITC-labelled antibody alone. Negative control for the secondary antibodies was accomplished by two approaches. In the first case, cultures were incubated with the primary antibody for a given hormone (rabbit antihormone) in the presence of the F(ab)₂ fraction of guinea-pig anti-rabbit IgG (dilution 1:20) and then reacted with the unmatched secondary antibody raised against neuronal markers (Cy5-conjugated antineuronal IgG). This procedure gave no Cy5 immunofluorescence. In the second case, cultures were incubated with the primary antibody (rabbit IgG), specific for a given hormone, the corresponding secondary antibody (FITC-conjugated anti-rabbit IgG) and the F(ab)₂ fraction of guinea-pig anti-rabbit IgG. Finally, the culture was incubated with the secondary antibody specific for the neuronal marker alone (Cy5-conjugated antineuronal IgG). Again, it was confirmed that this procedure gave no Cy5 immunofluorescence.

On the day after the staining, all cultures from a given experiment were imaged with a laser scanning confocal microscope (Bio-Rad MRC 1024, Hercules, CA, USA), equipped with a Kr/Ar laser. The confocal microscope was mounted on a Nikon inverted microscope (Diaphot 300, Nikon) and an oil-immersion objective (1.4 NA, Plan Apo 60 \times , Nikon) was used for the observations. Excitation and emission settings were as follows: excitation 488 nm, emission 522 nm/DF32, for imaging FITC staining and excitation 647 nm, emission 680 nm/DF32, for imaging Cy5 staining. Iris aperture, gain and laser power remained fixed for the same batch of cultures. They ranged from 2.5–2.7, 98–1500 and 1–3%, respectively. Images at 488 nm and 647 nm excitation were collected either separately or concurrently with the aid of the LaserSharp 1.02 program (Bio-Rad). Subsequent analysis and

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4 Oestrogen regulates neurofilament expression in anterior pituitary

processing of confocal images was carried with software written by Todd Clark Breile (Confocal Assistant 4.02).

In each experiment, approximately 9000 cells from 4–5 coverslips were analysed. Cell counting included unstained, NF68-positive, pituitary hormone positive and double positive cells. The results were expressed as the percentage of NF68-positive cells out of the total of identified cells positive for a given pituitary hormone. This percentage was determined by dividing cells immunoreactive to both NF68 and a given pituitary hormone by the total number of cells expressing the same pituitary hormone.

Results

NF68 immunofluorescence in the population of anterior pituitary cells.

The specific immunofluorescence of 68 kDa neurofilaments (NF68) in cultured anterior pituitary cells was first obtained from cycling young adult female rats (60 days of age). Fluorescence microscopy revealed a continuum of labelling intensities, which we decided to arbitrarily divide into three groups. The first group consisted of cells with very low specific fluorescence (i.e. less than 25 arbitrary units; au). Since this level of immunolabelling was similar to that of negative controls (e.g. CHO cells that were stained concurrently; Fig. 1A and histogram distribution in Fig. 2B), these cells were classified as nonexpressing cells (NE). A second group of cells, which showed weak NF68 immunoreactivity (25–100 au) was classified as weakly expressing cells (WE). Finally, a third group, showing robust NF68 immunoreactivity (100–250 au) was termed strongly expressing cells (SE). Immunostaining of SE cells was similar to that of positive controls (e.g. rat sympathetic neurones that were stained concurrently; Fig. 1B and histogram distribution in Fig. 2C). Examples of pituitary cells, grouped into three different types by its NF68 protein expression are shown in Fig. 1(C). Importantly, NF68-positive pituitary cells retained their round to polygonal cell morphology typical of the endocrine phenotype (i.e. they were otherwise indistinguishable from NF68-negative cells). The histogram distribution of specific fluorescence data from three independent cultures, is shown in Fig. 2(A). Here, the percentages of cells classified according to their NF68 immunolabelling were NE, 51.3%; WE, 38.6% and SE 10.1%. When immunostaining for the neuronal markers NF200 and MAP-2 was carried out in pituitary cultures, a staining pattern similar to that of NF68 was revealed (data not shown). These results suggest that the subset of pituitary cells that express NF68 may also express other neurone-specific markers (14, 16). However, this supposition awaits confirmation by multiple immunostaining with antibodies against the different neuronal markers.

Even when previous studies demonstrated that pituitary cells in culture can maintain their functional differentiation for several weeks, and sometimes for months (17), it could be argued that the synthesis of neuronal markers could reflect an anomalous condition resulting from tissue dissociation or culture conditions. In this regard, it should be mentioned that adrenal chromaffin cells, which do not express NFs *in situ*, can express them under culture conditions (18). To rule out this possibility, NF68 immunolabelling was conducted in 5 µm-thick sections of intact pituitary glands. The intensity of NF68 immunofluorescence in slices of the intact tissue is more

difficult to quantify than in cultured cells because of partial sectioning of cells and differences in fluorescence intensity due to variation in focal plane. However, as shown in Fig. 3(B), NF68-positive and NF68-negative endocrine cells could be distinguished without difficulty in the adenohypophysis. As shown in Fig. 3(B), the distribution of NF68 expression is heterogeneous across the gland (Figs 3C,D). Thus, a direct comparison of the relative proportions of these cells in the intact tissue with that in primary culture is of little value. Interestingly, in three out of seven glands processed for immunofluorescence, NF68-expressing cells were concentrated in more or less well defined areas of the gland. Fig. 3 shows the position of one such zone, and the fluorescence micrograph in Fig. 3(B) illustrates details of such an area. The conclusion that can be drawn from these studies is that both *in situ* and *in vitro*, a subset of anterior pituitary cells exists that express neuronal traits. To avoid redundancy, subsequently presented data refer exclusively to results obtained using immunoreactivity of the NF68 protein.

Conceivably, NF68-positive cells in the pituitary gland of 60-day-old rats could represent a population of immature anterior pituitary cells. If that were the case, they should be more abundant in early stages of ontogenetic development. To explore this possibility, NF68 immunostaining was carried out in cultures of anterior pituitary cells obtained from female newborn rats, as well as from female rats of 10, 20 and 45 days of age. Data from these experiments are summarized in Fig. 4 and in Table 1. The expression of NF68 protein in cells from newborn rats was minimal (mean specific fluorescence 8.9 ± 0.3 au, $n = 355$) compared to that of CHO cells (mean specific fluorescence 5.6 ± 0.3 au, $n = 332$, $P < 0.0001$), and weak in rats 10, 20 and 45 days of age (mean specific fluorescence 12.6 ± 0.4 au, $n = 346$; 17.2 ± 1 au, $n = 139$; and 15.1 ± 2.2 au, $n = 137$, respectively) (Fig. 4). In cells from 45-day-old rats, a small increment (3.5%) was seen in the percentage of NF68-positive cells, although SE cells were still infrequent (1.5%) (Fig. 4D). In contrast, the mean specific fluorescence of pituitary cells from 60-day-old rats (Fig. 2A) was high (40.4 ± 0.8 au, $n = 2637$), and the fluorescence distribution showed the three subsets previously depicted. Here, the total percentage of NF68-positive cells (WE and SE) was 48.7%. NF68 protein expression in 90-day-old rats was very similar: to that of rats aged 60 days of age (specific fluorescence 33.7 ± 2.2 au, $n = 751$). These results clearly indicate that the expression of neuronal markers in pituitary cells increases gradually during ontogenetic development, reaching a plateau level by the time the female rat acquires sexual maturity.

Sexually dimorphic expression of NF68 protein in pituitary cells

The finding of an apparent link between the expression of neuronal markers and the beginning of sexual maturity of female rats prompted us to examine if an age-dependent increase in NF68 protein expression also occurred in pituitary cells from male rats. Contrary to our observations in cells from female rats of the same age ($P < 0.0001$), the expression of NF68 in cells from adult male rats was weak and uniform (mean specific fluorescence 22.6 ± 1.2 au, $n = 383$), and

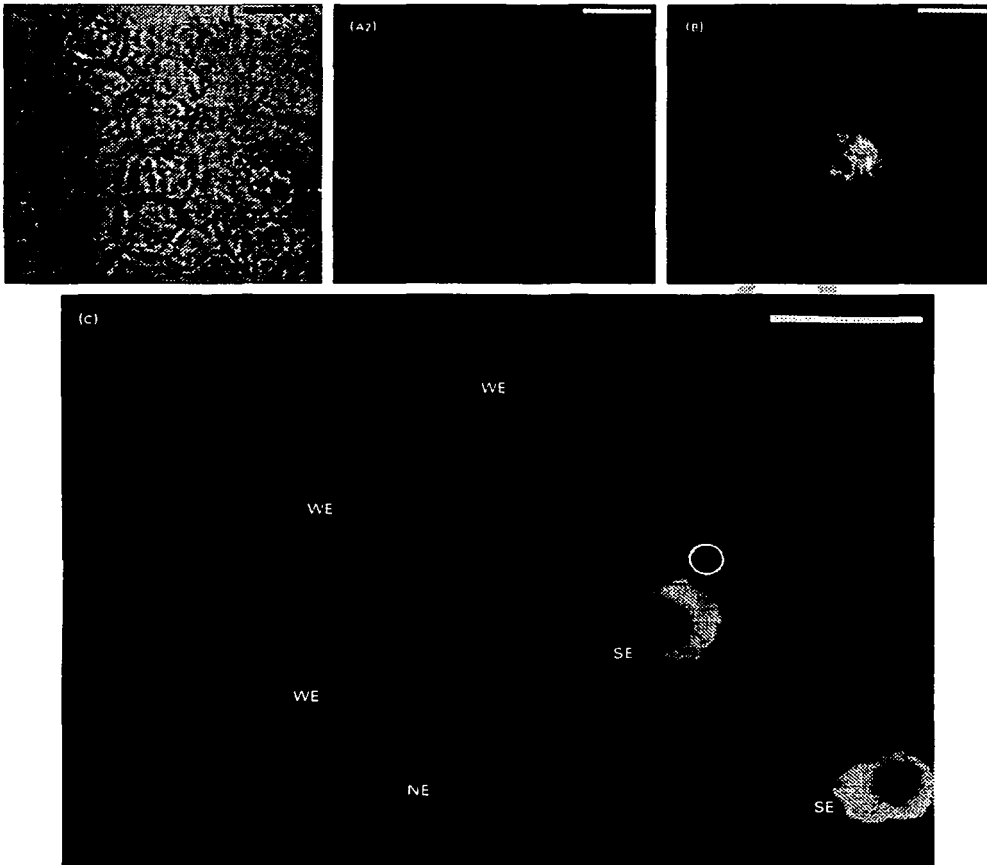


FIG 1. Determination of 68 kDa neurofilament protein (NF68) expression by digital fluorescence microscopy. (A) NF68 immunofluorescence of CHO cells, used as negative control. (A1) Phase contrast micrograph. (A2) Epifluorescence image of the same field showing negligible immunoreactivity. (A) Epifluorescence image of cultured rat sympathetic neurones, used as positive controls. (c) Pituitary cells in primary culture stained for NF68. Cells were obtained from a female rat aged 60 days. The figure illustrates examples of nonexpressing (NE), weakly expressing (WE) and strongly expressing pituitary cells (SE; see text for definitions). The white circle (5.0 μ m in diameter) illustrates the area of interest from which mean brightness was determined. Time of exposure is the same (250 ms) in A2, (A) and (c). Scale bar = 20 μ m.

slightly, but statistically significantly higher than in cells from pubescent (45-day-old) female rats ($P < 0.0001$). This is shown in Fig. 5, which compares the histogram distribution of NF68 immunoreactivity in pituitary cells obtained from male and female rats of the same age (data from three repetitions were pooled). The proportions of NE, WE, and SE cells are shown in Table 2. These results indicate that the expression of neuronal markers in the pituitary is sexually dimorphic, and implies that female gonadal hormones are likely to be involved

in the regulation of its expression. Obvious candidates are oestrogen and/or factors released by the ovaries, hypothalamus or by the pituitary itself.

Influence of oestrous cycle on the expression levels of NF68

It is well established that oestrogen plasma concentrations undergo large variations during the oestrous cycle (19, 20).

6 Oestrogen regulates neurofilament expression in anterior pituitary

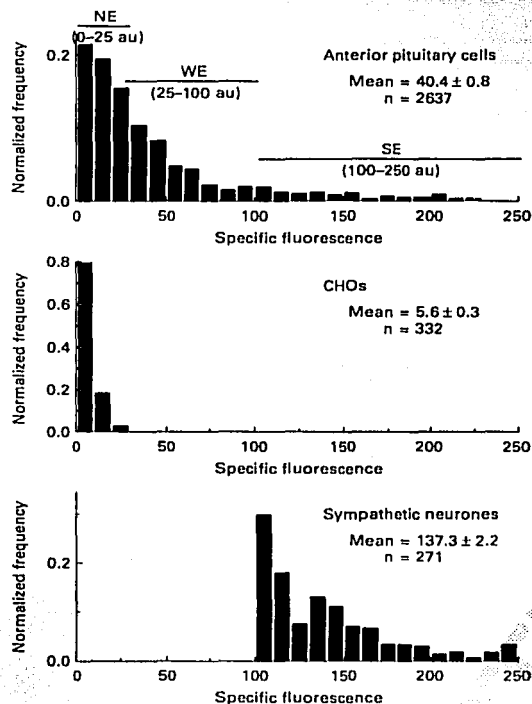


Fig 2. Frequency histogram distribution of the intensity of NF68-specific immunofluorescence. Data pooled from three independent cultures of each condition. (A) Distribution of normalized fluorescence intensity of pituitary cells from 60-day-old female rats. (B) Distribution of normalized fluorescence in Chinese hamster ovary (CHO) cells. (C) Distribution of normalized fluorescence in cultured rat sympathetic neurones. Mean specific fluorescence, SE and number of cells examined are indicated in each panel. The ranges chosen to discriminate nonexpressing (NE), weakly expressing (WE) and strongly expressing cells (SE) are also indicated in (A).

Thus, we wondered if oestrogenic levels in these physiological conditions could also affect pituitary neurofilament expression. Three stages of the oestrous cycle were analysed: proestrus, oestrus and diestrus. Significant differences were found between these stages ($P < 0.0001$ in all cases), with the maximum of neurofilament expression at oestrus (mean specific fluorescence: 63.4 ± 1.1 au, $n = 3704$) and the minimum at proestrus (mean specific fluorescence: 31.1 ± 0.7 au, $n = 4772$). As shown in Table 3, the percentage of SE cells diminished from 19.6% at oestrus, to 12.3% at diestrus and to 8% at proestrus. Similarly, the proportion of WE cells diminished gradually from 52.6% (oestrus) to 45.8% (diestrus) and finally to 18.5% (proestrus).

Effects of gonadectomy and antiestrogenic treatment on the expression of NF68 protein

With the purpose of further exploring the extent of female sex steroids involvement in neurofilament expression, female rats 60-day-old were ovariectomized, and the expression of NF68 in anterior pituitary cells examined 14 days postoperation. A second group of control rats underwent the same surgical procedure but without removal of the ovaries (sham operation). Ovariectomy (OVX) produced a significant decline in the expression level of neurofilaments (mean specific fluorescence 20.9 ± 0.5 au, $n = 1977$) compared to either intact or sham-operated rats (mean specific fluorescence 40.4 ± 0.8 au, $n = 2637$ and 45 ± 1.8 au, $n = 554$, respectively; $P < 0.0001$ in both cases). NF68 immunoreactivity in OVX rats even diminished below that of cells from adult male rats (mean specific fluorescence 22.6 ± 1.2 au, $n = 383$; $P < 0.0001$). Nevertheless, SE cells, which are scarce in male rats (1.6%), were still present (2.2%) in cultures from OVX rats at 14 days postoperation. These results are summarized in Table 2.

A more radical procedure, often used to eliminate oestrogenic function without affecting other ovarian secretions, is the administration of antiestrogenic drugs. Tamoxifen, which binds competitively to oestrogen receptors (13, 21), and has potent antiestrogen function in breast and a weak oestrogenic action in the uterus and endometrium (22–24), was administered to female rats 60 days of age for 15 consecutive days. A group of control rats received the same amount of tap water. Tamoxifen treatment diminished NF68 immunoreactivity in pituitary cells more drastically than ovariectomy (mean specific fluorescence 6.1 ± 0.4 au, $n = 710$, $P < 0.0001$ between both treatments). The difference was also significant ($P < 0.0001$) compared to control female rats 60 days of age. A possible explanation for the weaker effects of ovariectomy compared with antiestrogenic treatment is that oestrogens do not disappear from circulation in OVX rats (25), probably due to oestrogen release from extra-ovarian sources (25, 26). Expression of NF68 protein after tamoxifen treatment was below that found in cells from adult male rats ($P < 0.0001$), and even below that of cells from newborn rats ($P < 0.0001$). Results obtained after tamoxifen treatment support the hypothesis that the effects of ovariectomy on NF68 expression result from insufficient production of oestrogen rather than from shortage of other factors (i.e. proteins and peptides) secreted by the ovaries (27). Data from these experiments are summarized in Table 2.

Influence of oestradiol replacement therapy in ovariectomized rats on the expression levels of NF68 protein.

To provide additional support to the above-mentioned hypothesis, 17β -oestradiol was injected subcutaneously (20 µg per 100 g weight), to a group of OVX rats 60 days of age for four consecutive days. Treatment began 15 days after surgery. When NF68 protein expression was determined after the oestrogen replacement therapy, it was found considerably increased (mean specific fluorescence: 47.8 ± 1.6 au, $n = 511$) compared to OVX with vehicle injections or OVX with no injections (mean specific fluorescence 23.7 ± 0.7 au, $n = 917$ and 20.9 ± 0.5 au, $n = 1977$, respectively; in both cases $P < 0.0001$) and even became higher than that of 60-day-old female rats ($P < 0.0001$). Together, these results, strongly

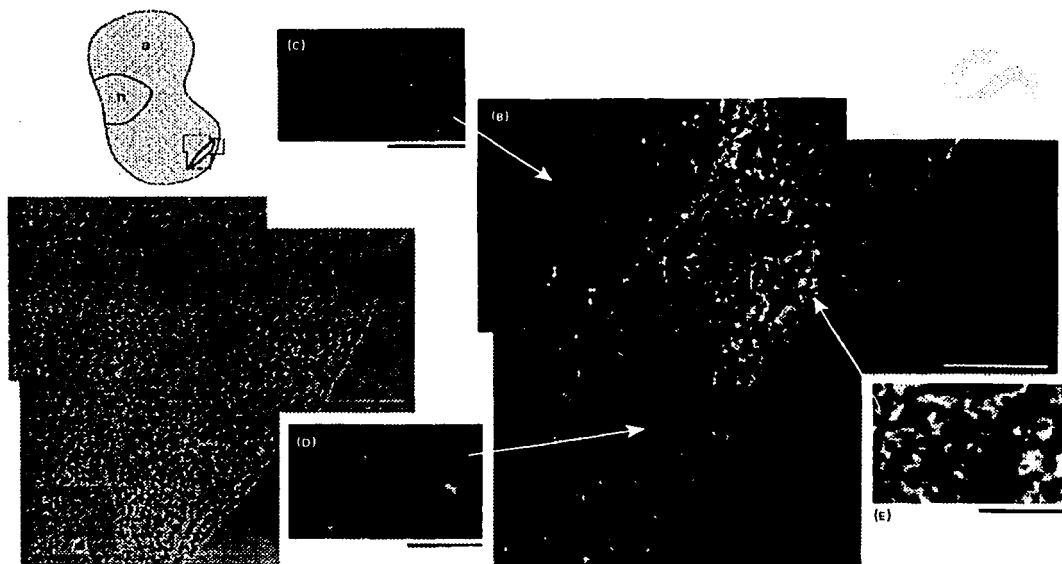


FIG 3. NF68 immunofluorescence in a pituitary slice from a female rat aged 60 days (5 μm thick). (a) Phase contrast composite image at low magnification ($\times 10$). (b) Fluorescence image from the same field. Notice the heterogeneous distribution of NF68-positive and NF68-negative cells throughout the gland. (c) Detail of a region scarce in NF68-positive cells. (d) Detail of a region with moderate abundance of NF68-positive cells. (e) Detail of a region with numerous NF68-positive cells. The diagram in the upper left corner illustrates the position in the gland of the area of detail (contour) and of the region densely populated with NF68-positive cells. a, Adenohypophysis; n, neurohypophysis. Camera exposure was 250 ms for (b) to (e) and 100 ms for (a). In (a) and (e), scale bar = 200 μm . In (c), (d) and (e), scale bar = 50 μm .

suggest that the expression level of NF68 protein in pituitary cells is affected by the plasma level of female steroid hormones and that these effects are mediated by oestrogen receptors. The effects of these maneuvers on the proportion of NE, WE and SE cells in pituitary cultures are summarized in Table 2.

Effects of orchectomy and oestrogen treatment on the expression levels of NF68

As shown earlier, NF68 protein expression is weak in the pituitary of male subjects (mean specific fluorescence 22.6 ± 1.2 au). After either orchectomy or sham operation, NF68 protein expression increased in cultured pituitary cells from male rat. NF68 immunoreactivity was not significantly different between castrated and sham-operated rats (mean specific fluorescence 42.6 ± 0.8 au, $n = 636$ and 40.2 ± 0.8 au, $n = 438$, respectively, $P = 0.0025$). The reasons for the increased expression of NF68 immunoreactivity in sham-operated rats in comparison with intact male rats ($P < 0.0001$) is unclear. When a group of castrated rats was injected with 17 β -oestradiol, using the same procedure than with OVX rats, a further increase in neurofilament expression was observed

(mean specific fluorescence 45.9 ± 0.9 au, $n = 680$). This difference is significant compared to sham-operated rats or castrated rats injected with vehicle ($P = 0.0004$ and $P < 0.0001$, respectively). In this case, NF68 expression even exceeded that of female rats 60 days of age ($P < 0.0001$). These results demonstrate that (i) androgen deficiency by itself does not substantially influence the expression of NF68 in pituitary cells and (ii) pituitary cells from male rats retain the competence to respond with increased expression of NF68 to elevated concentrations of circulating oestrogen.

Identification of pituitary cell populations expressing neurofilaments

To identify the population of pituitary cells expressing NF68, double-immunolabelling experiments were carried out for the hormones secreted by four of the five different cell populations of the adenohypophysis. These four cell types represent approximately 90% of the total endocrine population in the pituitary (28). The proportions of each cellular type found in our study were: somatotrophs, 30.6%; lactotrophs, 45.7%; gonadotrophs, 7.6% and thyrotrophs, 8.1%. In general, these

8 Oestrogen regulates neurofilament expression in anterior pituitary

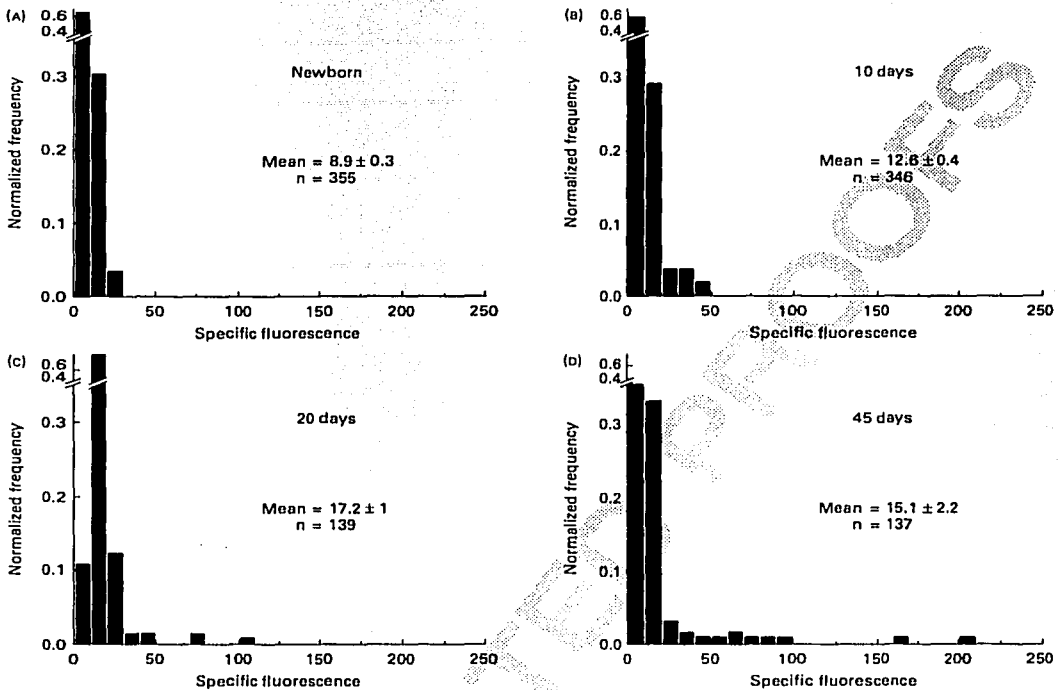


FIG 4. Frequency histogram distribution of NF68-specific fluorescence in pituitary cells from female rats of different postnatal ages. (a) Newborn, (b) (c) and (d) 10, 20 and 45 days old, respectively. The mean specific immunofluorescence, SE and number of cells examined are indicated in each panel. The histogram includes data pooled from three independent cultures of each condition. Notice that neurofilament-expressing pituitary cells begin to appear at around 20 days after birth.

TABLE 1. Percentages of Pituitary Cells Obtained from Female Rats of Different Ages (Data Pooled From Three Independent Cultures of Each Condition) Ranked According to the Expression Level of NF68.

Expression level of NF68 protein	Days of age				
	Newborn (n=355)	10 (n=346)	20 (n=139)	45 (n=137)	60 (n=2637)
SE	0%	0%	0.7%	1.5%	10.1%
WE	0%	5.2%	5%	7.3%	38.6%
NE	100%	94.8%	94.3%	91.2%	51.3%
	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	-

SE, Strongly expressing; WE, weakly expressing; NE, nonexpressing cells (see Fig. 3A for ranges). Pituitary cells were processed for immunofluorescence after 1 day in culture under control conditions; P-values were obtained with the Kolmogorov-Smirnov test and are reported here at the 99% confidence interval. Notice that the expression increases significantly between 45 and 60 days of age. P-values were computed against data from 60-day-old female.

percentages are in agreement with those reported previously for cultures of rat adenohypophysis taking into consideration differences between studies (28–30) and variations related to the phases of the oestrous cycle (30, 31). As illustrated in Fig. 6, double positive cells were identified within each of the four pituitary cell phenotypes studied. Each pituitary cell population displays a characteristic hormone-specific staining pattern. As shown in Fig. 6(B,C), which corresponds to confocal images of a gonadotroph and a thyrotroph, respectively, immunoreactivities to NF68 and LH or TSH are distributed differently within the cytoplasm of the cells and, in some cases, they appear not to be colocalized in the same cell regions. In pituitary cultures from female rats aged 60 days of age, NF68-positive cells were found to correspond to 20.2% ± 3 of lactotrophs (n=537), 12.6% ± 8 of gonadotrophs (n=47), 11.7% ± 2 of somatotrophs (n=279) and 33.1% ± 8 of thyrotrophs (n=229). These results indicate that the expression of specific neuronal markers is not exclusive of a particular cell type in the adenohypophysis, but rather of a subset within each population. The possible functional significance

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE 2. Percentages of Pituitary Cells Obtained from Control 60-Day-Old Female and Male Rats, and 60-Day-Old Female Rats After Different Experimental Conditions: Sham Operation, 14 Days After Ovariectomy (OVX), Treatment with Tamoxifen for 4 Days, OVX with Vehicle Injection for 4 Days and OVX with Treatment with 20 µg per 100 g of 17β-Oestradiol for 4 Days.

Expression level of NF68 protein	60 days female (n=2637)	60 days male (n=383)	Sham operation (n=354)	OVX (n=1977)	Tamoxifen (n=710)	OVX+vehicle (n=917)	OVX+17β-oestradiol (n=511)
SE	10.1%	1.6%	11.9%	2.2%	0%	2.3%	7.8%
WE	38.6%	22.2%	42.8%	18.2%	4.7%	24.1%	62.4%
NE	51.3%	76.2%	45.3%	82.6%	95.3%	73.6%	29.8%
	*P<0.0001**	P<0.0001	P=0.0031	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
		-	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P=0.0003	P<0.0001

Data are pooled from three independent cultures of each condition. Pituitary cells were processed for immunofluorescence after 1 day in culture under control conditions; P-values were obtained with the Kolmogorov-Smirnov test and are reported here at the 99% confidence interval. *P-values computed against data from 60-day-old female. **P-values computed against data from 60-day-old male.

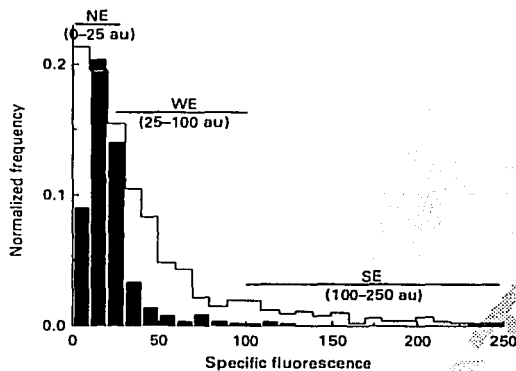


FIG 5. Comparison of frequency histogram distributions of NF68-specific fluorescence in pituitary cells obtained from male and female rats of the same age (60-day-old). Data are pooled from three independent cultures of each condition. The continuous line represents the contour of the histogram distribution of NF68 specific fluorescence in pituitary cells from female rats. The histogram of black bars corresponds to the distribution of NF68-specific fluorescence in cultures of male rats. Mean specific fluorescence, SE and number of cells examined for each condition are indicated. Ranges separating nonexpressing (NE), weakly expressing (WE) and strongly expressing cells (SE) are also shown for reference.

TABLE 3. Percentages of Pituitary Cells Obtained From 60-Day-Old Female Rats at Different Phases of the Oestrous Cycle, Ranked According to the Expression Level of NF68 ages.

Expression level of NF68 protein	Phase of the oestrous cycle		
	Diestrus (n=3493)	Proestrus (n=4772)	Oestrus (n=3704)
SE	12.3%	8%	19.6%
WE	45.8%	18.5%	52.6%
NE	41.9%	73.5%	29.5%

Data pooled from three independent cultures of each condition. SE, Strongly expressing; WE, weakly expressing; NE, nonexpressing cells (see Fig. 3A for ranges). Pituitary cells were processed for immunofluorescence after one day in culture under control conditions. Significant differences were found between the three stages (P<0.0001 in all cases).

cells, small populations of paraneurons, including gut endocrine and thyroid parafollicular cells, as well as Sertoli and Leydig cells, are immunoreactive to neurofilaments (34). Moreover, adrenal chromaffin cells express neurofilaments under culture conditions (19). The expression of neurofilament proteins in the adenohypophysis has been a subject of controversy (3, 6, 8-10, 14). Nevertheless, as this study clearly demonstrates, a subset of anterior pituitary cells express neurofilaments and possibly other neuronal markers in normal cycling rats. This conclusion is supported by positive and negative immunofluorescence control experiments. Moreover, Western blot analysis of proteins isolated from rat adenohypophysis indicate that pituitary cells express a protein of similar molecular weight to that abundantly expressed in neurones (Fiordeliso, Hernández-Cruz and Zentella, unpublished data).

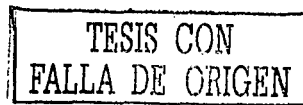
As for the possible meaning of neurofilament expression in these cells, it may support the notion that the pituitary (or part of it) is of neuro-ectodermal origin (4, 5). However, our data are inconsistent with this interpretation. In the case of pancreatic islet and adrenal chromaffin cells, whose neuro-ectodermal origin is more firmly established, neurofilaments are expressed in the embryonic pancreas and adrenal glands,

(if any) of the presence of a subgroup of pituitary cells expressing NF68 whose abundance is regulated by the hormonal status remains to be investigated.

Discussion

Expression of NF neuronal markers in anterior pituitary cells

Neurofilaments are heteropolymers composed of three distinct polypeptides of molecular weight 200, 160 and 68 kDa. They represent a class of intermediate filament proteins highly specific for neurones (32, 33). In addition to mature nerve



10 Oestrogen regulates neurofilament expression in anterior pituitary

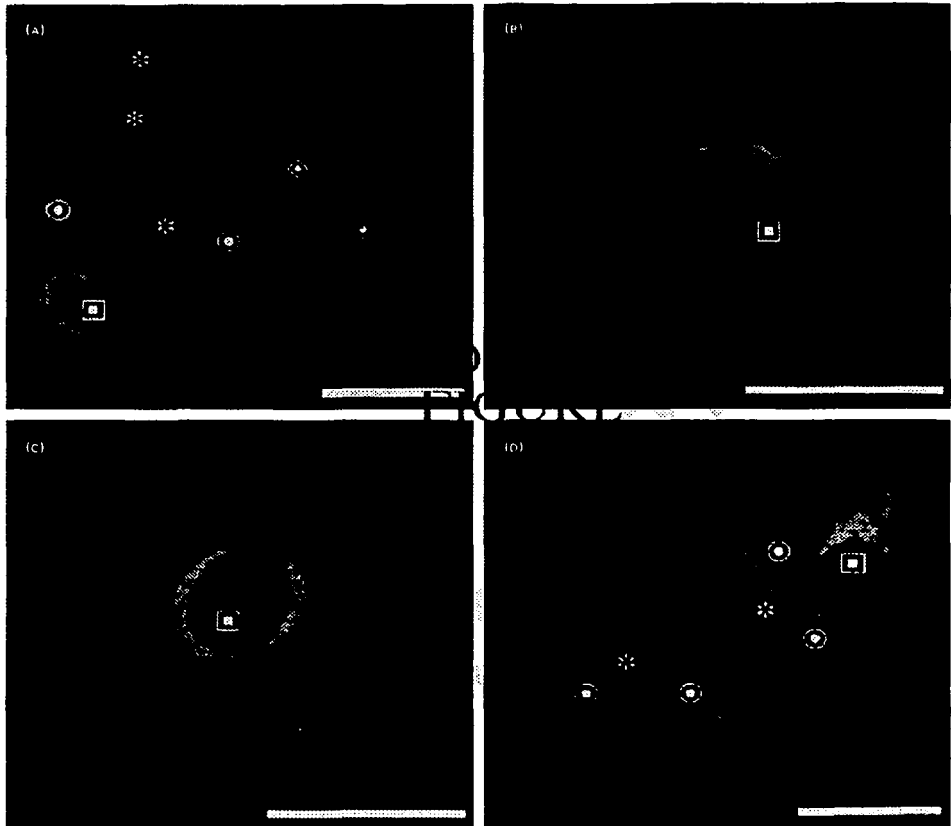


FIG 6. Identification of pituitary cell subtypes expressing NF68. Double-immunolabelling for NF68 and either growth hormone (GH), luteinizing hormone (LH), thyroid stimulating hormone (TSH) or prolactin was performed in pituitary cultures obtained from 60-day-old female rats after one day *in vitro*. Data from five independent cultures were pooled (see details in Methods section). Laser-scanning confocal images were acquired with excitation at 488 nm for imaging hormone staining and excitation at 647 nm for imaging NF68 staining. Emissions were collected with two separate photomultiplier channels. In each panel, the red colour corresponds to NF68 immunoreactivity and the green colour to immunoreactivity for a given pituitary hormone. (A) Staining for NF68 and GH. (B) Staining for NF68 and LH. (C) Staining for NF68 and TSH. (D) Staining for NF68 and prolactin. Each pituitary cell population displays a characteristic hormone-specific staining pattern that, in general, differs from the NF68 specific staining pattern. In (A) and (C), four cell types can be identified: Double negative cells (*), single hormone-positive cells (O), single NF68-positive cells (◇) and double positive cells (□). Scale bar = 20 μ m.

but not in the adult organs (35). In contrast, as show in this study, neurofilaments are virtually absent in the pituitary of newborn and young rats, and they begin to appear as the rats approach maturity. It is likely therefore, that neurofilament expression, rather than a remnant of embryological origin reflects an active function in pituitary cells on account of a developmental program linked to the advent of sexual maturity in the female organisms.

Oestrogen-dependent regulation of NF68 protein expression in pituitary cells

An unexpected finding of this study is the observation that the expression of a neuronal marker in the rat pituitary is regulated by oestrogen. This conclusion is supported by the changes in the level of expression of NF68 along the oestrous cycle, and in response to manipulations that either modify

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE 4. Percentages of Pituitary Cells Obtained From 60-Day-Old Control Male Rats and After Different Experimental Conditions: Sham Operation; 14 Days After Orchiectomy; Injection of Vehicle for 4 Days Beginning 14 Days After Orchiectomy; Treatment with 20 µg/100 g of 17 β-Oestradiol for 4 Days Beginning 14 days After Orchiectomy.

Expression level of NF68 protein	60 days male (n=382)	Sham operation (n=438)	Orchiectomy (n=636)	Orchiectomy + vehicle (n=834)	Orchiectomy + 17β-oestradiol (n=680)
SE	1.6%	0.9%	1.3%	1.6%	2.4%
WE	22.2%	74.9%	85.3%	77.5%	84.6%
NE	76.2%	24.2%	13.4%	20.9%	13%
*	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
**	P<0.0001	-	P=0.0025	P<0.0001	P=0.0004

Data are pooled from three independent cultures of each condition. Pituitary cells were processed for immunofluorescence after 1 day in culture under control conditions; P-values were obtained with the Kolmogorov-Smirnov test and are reported here at the 99% confidence interval. *P-values computed against data from 60-day-old female. **P-values computed against data from sham operation.

ovarian hormone concentrations or inhibit their actions. Our findings also indicate that the distribution of NF68 is sexually dimorphic, perhaps indicating a different physiological role of NF68-positive pituitary cells.

Unexpectedly, the expression of NF68 increased both in sham-operated and OVX rats. The simplest explanation would be that the stress associated with manipulation and surgery increases plasma concentrations of oestrogen. However, we have been unable to find studies to support this hypothesis in the literature. The only information we found that could be relevant is that, in stressed male rats, plasma concentrations of corticosterone and progesterone increase and testosterone and androstendione decreased, consistent with diminished enzymatic activity of the Leydig cells (36). Also, stressors have been reported to stimulate the release of ACTH and prolactin from the pituitary (37, 38). It is possible that the stimulation of corticotrophs and lactotrophs in sham-operated and OVX male rats may explain the small elevation of NF68 expression in cultures of pituitary cells.

Oestrogen plays various roles in the pituitary, including cellular proliferation and regulation of hormone synthesis. Moreover, oestrogen up-regulates its receptors in the pituitary gland (39). The mechanism by which oestrogen regulates such a variety of functions is not completely understood. It is known that oestrogen binds to intracellular receptors (ERs), causing them to undergo activation and dimerization. Subsequently, the oestrogen-receptor complex binds to an oestrogen response element (ERE) in target genes and modifies their transcription (40). There is also increasing evidence for a variety of nongenomic actions of oestrogens (41).

Numerous studies have documented the importance of gonadal steroids for sexual differentiation of neuroendocrine, behavioural and cognitive functions (42, 43). Moreover, oestrogen has gained recognition as a neural growth factor, with actions similar to those of the neurotrophin family of trophic peptides (44, 45). In part, this may be due to colocalization of oestrogen and neurotrophin receptors in target cells, resulting in differential and reciprocal transcriptional regulation of these receptors by their ligands (42). This mechanism has been proposed to explain oestrogen-induced increase in neurofilament gene expression in dorsal root ganglion neurones of adult female rats, which coexpress ER α and NGF receptors *trkA* (46).

Immunohistochemistry (47), *in situ* hybridization (48) and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (49) studies have shown that 60–70% of cells of the anterior pituitary lobe express ER α , both in male and female rats (50, 51). Neurotrophins and their receptors are also present in the pituitary, suggesting that they may exert an influence on the development and the function of the gland. In particular, *trkA* receptors are present in all anterior pituitary phenotypes (52), and approximately 30% of anterior pituitary cells show immunoreactivity to NGF itself (53). This suggests that some of these cells can be target of NGF action either by autocrine or paracrine pathways. At present, it is unknown if NGF or any other neurotrophins can regulate the expression of neurofilament in pituitary cells. Similarly, it remains to be determined whether oestrogen directly regulates neurofilament protein expression or indirectly regulates it by increasing the sensitivity of anterior pituitary cells to neurotrophins or other growth factors.

How do other reported actions of oestrogen in adenohypophysis compare to its effects on NF68 expression?

Pituitary cells, especially lactotrophs (54, 55) and gonadotrophs (56, 57), are directly regulated by oestrogen. Oestrogen induces transdifferentiation of somatolactotrophs into lactotrophs (58) and stimulates lactotroph proliferation (59). Oestrogen also induces the expression in the anterior pituitary of galanin (60), vasoactive intestinal peptide (61) and *c-fos* genes (62), and increases the number of positive cells to neurotensin (63). As demonstrated in the present study, neurofilament expression is dependent on oestrogen level, and regulated during the oestrous cycle, with the maximum expression at oestrus, moderate expression at diestrus and minimum expression at proestrus. Since, in the rat oestrogen levels peak approximately 8 h before the beginning of oestrus, this implies that pituitary cells synthesize and/or assemble neurofilaments with some delay in response to elevation of oestrogen levels, and that neurofilament expression declines slowly after oestrogen levels fall before oestrus. Also, as it can be inferred from our results of treatment with 17β-oestradiol, augmentation of neurofilament expression is sustained. The late and sustained effects of oestrogen in pituitary contrasts with their effects in uterus, where oestrogen induction of

- pituitary gland: an immunohistochemical study with monoclonal antibodies. *Brain Res* 1984; 13: 229-239.
- 9 Halliday WC, Asa SL, Kovacs K, Scheithauer BW. Intermediate filaments in the human pituitary gland: an immunohistochemical study. *Can J Neurol Sci* 1990; 17: 131-136.
- 10 Bäck N, Tynnälä M, Portier MM, Virtanen I, Soinila S. Distribution of neurofilament proteins and peripherin in the rat pituitary gland. *Neurosci Res* 1995; 22: 267-275.
- 11 Hernández-Cruz A, Escobar A, Jiménez N. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the rate of rise of trigger Ca^{2+} . *J Gen Physiol* 1997; 109: 147-167.
- 12 Friend K, Resnick E, Ang L, Shupnik M. Specific modulation of estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary throughout the estrous cycle and in response to steroid hormones. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 131: 147-155.
- 13 Donath J, Nishino Y. Effects of partial versus pure antiestrogens on ovulation and the pituitary-ovarian axis in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 66: 247-254.
- 14 Salinas E, Quintanar J. Neurofilaments in thyrotrophs of hypothyroid rats: an immunohistochemical study. *Endocrine Pathol* 2000; 11: 195-200.
- 15 Lewis C, Gillette-Ferguson I, Ferguson D. An indirect immunofluorescence procedure for staining the same cryosection with two mouse monoclonal primary antibodies. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1273-1278.
- 16 Quintanar J, Salinas E. Neurofilament expression in cultures rat adrenohypophysial cells. *Cell Physiol Biochem* 2001; 11: 27-32.
- 17 Tüder-Vidál A, Gourdjí D, Tougaard C. A cell culture approach to the study of anterior pituitary cells. *Int Rev Cytol* 1975; 41: 173-239.
- 18 Yang HY, Krüto V, Lieska N, Pappas GD. Immunomicroscopy of neurofilaments in chromaffin cells of the adult bovine adrenal gland. *J Comp Neurol* 1996; 371: 461-468.
- 19 Orpen BG, Furman N, Wong PY, Fleming AS. Hormonal influences on the duration of postpartum maternal responsiveness in the rat. *Physiol Behav* 1987; 40: 307-315.
- 20 Janeway JR. *Vertebrate Reproduction*. Chichester: John Wiley and Sons, 1988: 229-231.
- 21 Clarke R, Skarr TC, Bouker KB, Davis N, Lee YR, Welch JN, Loonessa F. Molecular and pharmacological aspects of antiestrogen resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 11: 71-84.
- 22 Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mouroux R, Ediger TR, Murrini PGV, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen J. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74: 279-285.
- 23 Burger HG. Selective oestrogen receptor modulators. *Horm Res Suppl* 2000; 3: 25-29.
- 24 Mohamad MK, Abdel-Rahman AA. Effects of long term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 307-314.
- 25 Simpson E, Rubin G, Cline C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endokr Relat Cancer* 1999; 6: 131-137.
- 26 Davidge S, Zhang Y, Stewart KA. Comparison of ovulatory models for estrogen studies. *Ann J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R904-R907.
- 27 Bruce RC. Disorders of the ovary and female reproductive tract. In: Wilson X, Foster X, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. London: WB Saunders, 1995: 733-798.
- 28 Childs GV, Lloyd J, Umhau G, Rougga D. Growth and secretory responses of enriched populations of corticotropes. *Endocrinology* 1989; 125: 2540-2549.
- 29 Childs GV. Cytological studies of multifunctional gonadotropes. *Mic Res Tech* 1997; 39: 114-130.
- 30 Carballo S, Gonzalez del Pozo X, Carballo-Perez E. Quantification of the cellular proliferation on freshly dispersed cells from rat anterior pituitaries after *in vivo* and *in vitro* labeling with bromodeoxyuridine. *Histochem J* 1992; 24: 137-143.
- 31 Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fuji T, Morii S. Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrous cycle, and circadian change. *Avic Record* 1993; 235: 11-20.
- 32 Julien J-P, Grosfeld F. Structure and expression of neurofilament genes. In: Burgoyne R, ed. *The Neuronal Cytoskeleton*. New York, NY: Wiley-Liss, 1991: 215-231.
- 33 Fracy AJM, van de Klundert JMH, Bloemendaal H. Intermediate filaments: regulation of gene expression and assembly. *Eur J Biochem* 1993; 214: 351-366.
- 34 Davidoff MS, Middendorff R, Puschi W, Müller D, Wichers S, Holstein AF, Seroli and Leydig cells of the human testis express neurofilament triplet proteins. *Histochem Cell Biol* 1999; 111: 173-187.
- 35 Escurat M, Djabali K, Huc C, Landon F, Bocourt C, Böttard C, Gros F, Portier MM. Origin of the beta cells of the islets of Langerhans is further questioned by the expression of neuronal intermediate filament proteins, peripherin and NF-L in the rat insulinoma RINSF cell line. *Dev Neurosci* 1991; 13: 424-432.
- 36 Pellegrini A, Cricco M, Materazzi G, Cesi M, Ricciardi P. Stress-induced morphohistochemical and functional changes in rat adrenal cortex, testis and major salivary glands. *Histochem J* 1998; 30: 695-701.
- 37 Pignatelli D, Magalhães MM, Magalhães MC. Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm Metab Res* 1998; 30: 464-474.
- 38 Almeida SA, Petrusci SQ, Anselmo-Franci JA, Rosa-e-Silva AA, Lamano-Carvalho TL. Decreased spermatogenic and androgenic testicular functions in adult rats: submitted to immobilization-induced stress from prepuberty. *Brac J Med Biol Res* 1998; 31: 1443-1448.
- 39 Shupnik MA, Gordon MS, Chin WW. Tissue specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 660-665.
- 40 Cullen KE, Klade MP, Seyfried MA. Interaction between transcription regulatory regions of prolactin chromatin. *Science* 1993; 261: 203-206.
- 41 Coleman KM, Smith CL. Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci* 2001; 6: 1379-1391.
- 42 MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; 211: 1294-1302.
- 43 Kawata M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res* 1995; 24: 1-46.
- 44 Toran-Allerand D. The estrogen/neurotrophin connection during neural development: is co-localization of estrogen receptors with the neurotrophins and their receptors biologically relevant? *Dev Neurosci* 1996; 18: 36-48.
- 45 Toran-Allerand D, Singh M, György S. Novel mechanism of estrogen action in the brain: new players in old story. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 97-121.
- 46 Scoville SA, Bufton SM, Liuzzi FJ. Estrogen regulates neurofilament gene expression in adult female rat dorsal root ganglion neurons. *Exp Neurol* 1997; 146: 596-599.
- 47 Sur M, Parikh I. Immunohistochemical localization of estrogen receptor in rat brain, pituitary and uterus with monoclonal antibodies. *J Steroid Biochem* 1986; 24: 497-503.
- 48 Pelletier G, Liao N, Follet N, Govindan MV. Distribution of estrogen receptors in the rat pituitary as studied by *in situ* hybridization. *Mol Cell Endocrinol* 1988; 56: 29-33.
- 49 Zafar M, Ezzat S, Ramyar L, Pan N, Smyth HS, Asa SL. Cell-specific expression of estrogen receptor in the human pituitary and its adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3621-3627.
- 50 Keefer DA, Stumpf WE, Petrusci P. Quantitative autoradiographic assessment of 3H-estradiol uptake in immunocytochemically characterized pituitary cells. *Cell Tissue Res* 1976; 166: 25-35.
- 51 Nishihara E, Nagayama Y, Satohsi I, Hishahiko H, Masami M, Shunichi Y, Takehiko K. Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry. *Endocrinology* 2000; 141: 615-620.
- 52 Missale C, Spano PF. Nerve growth factor in pituitary development and pituitary tumors. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19: 128-150.
- 53 Patterson JC, Childs GW. Nerve growth factor and its receptor in the anterior pituitary. *Endocrinology* 1994; 135: 1689-1696.
- 54 Lieberman ME, Maurer RA, Claude P, Gorski J. Prolactin synthesis in primary cultures of pituitary cells: regulation by estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 1982; 25: 277-294.
- 55 Murai I, Ben-Jonathan N. Acute stimulation of prolactin release by estradiol: mediation by the posterior pituitary. *Endocrinology* 1990; 126: 3179-3184.
- 56 Turgeon JL, Waring DW. Acute progesterone and 17 β -estradiol modulation of luteinizing hormone secretion by pituitaries of cycling rats superfused *in vitro*. *Endocrinology* 1981; 108: 413-419.
- 57 Shupnik MA, Charib SD, Chin WW. Divergent effects of estradiol on gonadotropin gene transcription in pituitary fragments. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 474-480.

12 Oestrogen regulates neurofilament expression in anterior pituitary

immediate early genes and activation of late genes associated with cell structure and metabolism are rapid and transient (64). It has been reported that prolonged treatment with oestrogen stimulates the expression of c-fos in lactotrophs and folliculo-stellate cells in the adenohypophysis (62). It is tempting to speculate that Fos may mediate both the increase in prolactin gene expression and the stimulation of neurofilament protein synthesis induced by oestrogen.

Are oestradiol effects on pituitary cells direct or indirect?

The apparent delayed and sustained increase of NF68 protein expression in the cells from the anterior pituitary suggest that genomic oestrogen actions are more likely than nongenomic actions (41). Furthermore, it raises the possibility that some of the oestrogenic effects are indirect, secondary to stimulation by factors released by the hypothalamus or the neurohypophysis that affect the NF68 gene by an ERE-independent mechanism. In our hands, anterior pituitary cells in primary culture exhibit a time-dependent loss of neurofilament expression. That is, after 6 days in culture, neurofilament expression declines to levels comparable to those of cells from male or immature female rats (data not shown). We were unable to prevent this loss by supplementing the culture medium with 17β -oestradiol (200 nM data not shown). Similarly, Allen *et al.* (62) reported that they could not demonstrate induction of c-fos by oestradiol in cultures of pituitary cells. These findings are consistent with indirect effects of oestradiol. Nevertheless, optimization of the culture conditions may reveal some direct effects of oestradiol (65). It has also been reported that direct effects of oestrogens on lactotrophs are augmented by altering hypothalamic-pituitary factors that affect these cells (66–68). It remains to be determined if oestradiol can directly regulate neurofilament expression in anterior pituitary cells.

Identification of pituitary cell populations expressing neurofilaments

In primary cultures of anterior pituitary cells from female rats aged 60 days of age, NF68-positive cells were found in proportions ranging from $11.7 \pm 2\%$ of somatotrophs to $33.1 \pm 8\%$ of thyrotrophs. In this regard, it has recently been reported that neurofilaments of high molecular weight (200 kDa) are present in 13% thyrotrophs in normal rats and that this expression increased to 75% of thyrotrophs in hypothyroid rats (14). Our results indicate that the expression of specific neuronal markers is not exclusive of a particular cell type in the adenohypophysis but that, most likely, all endocrine phenotypes contain a subset of neurofilament expressing cells. Recent work with gene knockout approaches has shown that, in nerve cells, neurofilament subunits play distinct roles in filament assembly and radial growth of axons, and that mutations of neurofilament genes are involved in neuronal death in mouse models (69). Nevertheless, the functional role of neurofilaments in non-neuronal cells has not been examined in detail. It has recently been suggested that the increased expression of neurofilaments in pituitary cells may affect the rate of secretion of TSH and of other hormones (16). Furthermore, sex differences in the expression of neuronal

markers in pituitary cells past puberty could include changes in hormone receptor numbers or function, in addition to changes in the secretion of hypothalamic or pituitary hormones, or both. Thus, the pituitary may be a target on which steroids act to produce sex differences. Further research is required in order to assess the possible functional significance (if any) of NF68 expression in this subset of pituitary cells under an oestrous cycle-regulated fashion.

In conclusion these results demonstrate that, NF68 are expressed in gonadotrophs thyrotrophs, lactotrophs and somatotrophs of the adult female rat, and that the level of expression depends on age and sex, and changes in response to endocrine manipulations, which either modify ovarian hormone concentrations or inhibit their actions by treatment with anti-hormones. Since NF68s are mainly expressed in pituitary cells from female rats, these findings indicate that the distribution of NF68 immunoreactivity in the rat anterior pituitary is sexually dimorphic, and they also suggest a different physiological role for a subset of pituitary NF68-positive cells in the female organism.

Acknowledgements

The authors are indebted to Drs Agustín Guerrero, Fernando López-Casillas, Luis Vaca, Marcia Hiriart and Alejandro Zentella, who provided valuable comments throughout this work. Dr José Luis Quintanar also made useful suggestions and provided access to unpublished work. We are indebted to Nicolás Jiménez for tissue culture, to Diana Millán for help in preparation of pituitary slices and to the staff of the Institute's Microscopy Unit. Primary antibodies against pituitary hormones and peptide hormones were supplied by Dr A.P. Parlow from the National Program of Pituitary Hormones of the NIH-NHDDK. Financial support for this study was provided by grants from the National Council of Science and Technology (CONACYT 25261 N & 34329N) and from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA IN204497 & IN217399). This work was conducted by T. Fiordelisio in partial fulfillment of her PhD thesis for which she was awarded a fellowship from CONACYT and Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEF). Some of the results in this study were previously published in abstract form.

Accepted 14 February 2002

References

- 1 Takor T, Pearce AG. Neuroectodermal origin of avian hypothalamo-hypophysal complex: the role of the ventral neural ridge. *J Embryol Exp Morph* 1975; 34: 311–325.
- 2 Eagleson G, Jenks B, Van Overbeke AP. The pituitary adrenocorticotropes originate from neural ridge tissue in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morph* 1986; 95: 1–14.
- 3 Ogawa A, Sugihara S, Nakanishi Y, Suzuki S, Sasaki A, Hirato J, Nakazato Y. Intermediate filament expression in non-neoplastic pituitary cells. *Virch Arch B Cell Pathol* 1990; 58: 331–340.
- 4 ElAnraoui A, Dubois PM. Experimental evidence for the early commitment of the presumptive adenohypophysis. *Neuroendocrinology* 1993; 58: 609–615.
- 5 Dubois PMEJ, Anraoui A. Embryology of the pituitary gland. *TEA* 1995; 6: 1–7.
- 6 Ogawa A, Sugihara S, Hasegawa M, Sasaki A, Nakazato Y, Kawada T, Ishiuchi S, Tamura M. Intermediate filament expression in pituitary adenomas. *Virch Arch B Cell Pathol* 1990; 58: 341–349.
- 7 Tooze J, Hollinshead M, Fuller SD, Tooze SA, Huttner WB. Morphological and biochemical evidence showing neuronal properties in AtT-20 cells and their growth cones. *Eur J Cell Biol* 1989; 49: 259–273.
- 8 Trojanowski JQ, Gordon D, Orosco M, Lee MY. The developmental expression of neurofilament and glial filament proteins in the human

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14 Oestrogen regulates neurofilament expression in anterior pituitary

- 58 Kineran RD, Faught WJ, Frawley FS. Steroids can modulate transdifferentiation of prolactin and growth hormone in bovine pituitary cultures. *Endocrinology* 1992; 130: 3289-3294.
- 59 Hashi A, Mizawa S, Chen S, Yamakawa K, Kato J, Arita J. Estradiol-induced diurnal changes in lactotroph proliferation and their hypothalamic regulation in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1996; 137: 3246-3252.
- 60 Shen E, Hardenburg JL, Meade EH, Arey BJ, Merchenthaler I, López J. Estradiol induces galanin gene expression in the pituitary of the mouse in a estrogen receptor alpha-dependent manner. *Endocrinology* 1999; 140: 2628-2631.
- 61 Lam KSL, Srivastava G, Lechan RM, Lee T, Reichlin S. Estrogen regulates the gene expression of vasoactive intestinal peptide in the anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 1990; 52: 417-421.
- 62 Allen DL, Mitzner NA, Uveges TE, Nephew KP, Khan S, Ben-Jonathan N. Cell-specific induction of c-fos expression in the pituitary gland by estrogen. *Endocrinology* 1997; 138: 2128-2135.
- 63 Bello AR, Hernandez C, Gonzalez M, Rojas R, Negrin I, Madero A, Sanchez-Chiado JE, Tramu G, Alonso R. Immunoreactive neurotensin in gonadotrophs and thyrotrophs is regulated by sex steroid hormones in the female rat. *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 785-794.
- 64 Rhode PR, Gorski J. Inhibitory effects of serum and stimulatory effects of estrogen on prolactin mRNA levels in C57BL rat pituitary tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 82: 1-9.
- 65 Khan SA, Nephew KP, Wang H. The jun protooncogene family in uterine growth and differentiation. In: Khan SA, Sances GM, eds. *Protooncogenes and Growth Factors in Steroid Hormone Induced Growth and Differentiation*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994: 105-123.
- 66 Jones EE, Nalton F. Estrogen effects on the tuberoinfundibular dopaminergic system in the female rat brain. *Brain Res* 1990; 518: 84-91.
- 67 Ben-Jonathan N, Laudon M, Camis PA. Novel aspects of posterior pituitary function: regulation of prolactin secretion. *Front Neuroendocrinol* 1991; 12: 231-277.
- 68 Schachter J, Ahmad N, Weiner R. Activation of anterior pituitary folliculo-stellate cells in the formation of estrogen-induced prolactin-secreting tumors. *Neuroendocrinology* 1988; 48: 569-576.
- 69 Julien JP. Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9: 554-560.