



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**REGULACIÓN POR ESTRADIOL DE LA EXPRESIÓN
DE NEUROFILAMENTOS EN LAS CÉLULAS
ADENOHIPOFISIARIAS DE RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

MARIANA VÁZQUEZ GARCÍA



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL**

**CO- DIRECTOR DE TESIS:
DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**

2008



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Vázquez
García
Mariana
56 68 51 16
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
09802655-5

2. Batos del tutor

Dra.
Tatiana
Fiordelisio
Coll

3. Datos del sinodal 1 (co-tutor)

Dr.
Arturo
Hernández
Cruz

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Marcia
Hiriart
Urdanivia

5. Datos del sinodal 3

Dra.
María Luisa
Fanjul
Peña

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Fredy Roberto
Cifuentes
Navarro

7. Datos del trabajo escrito

Regulación por estradiol de la expresión de neurofilamentos en las células
adenohipofisarias de rata
62 p.
2008

*A mi abuelito Manuel García Tovar †,
a mi mamá María Elena García Alazáñez
y
a Francisco Javier Gutiérrez Chávez*

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

A la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll por dirigir ésta tesis, los conocimientos y técnicas que he adquirido gracias a ella.

Al Dr. Arturo Hernández-Cruz por todo el apoyo otorgado en este trabajo y por permitirme estar en su laboratorio.

A los revisores de esta tesis: la Dra. Marcia Hiriart, la Dra. María Luisa Fanjul, el M. en C. Marco Antonio Martínez, el Dr. Fredy Cifuentes y el Dr. Adán Hernández.

Al técnico académico del laboratorio Q.F.B. Nicolás Jiménez por asesorarme en el desarrollo de los experimentos y por sus valiosas opiniones. A la técnica académica Biol. Diana Millán del laboratorio del Dr. Drucker-Colín por realizar los cortes histológicos. A la Dra. Claudia Rivera, jefe del bioterio del IFC por la ayuda en el manejo de los animales y las orquidectomizaciones realizadas. A la técnica académica Biol. Carmen Sánchez del laboratorio de la Dra. Hiriart por enseñarme la técnica de EHP.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Tatiana Fiordelasio Coll, sin su apoyo nunca se hubiera realizado este trabajo y le agradezco lo que me ha enseñado en todos los aspectos.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Tatiana Fiordelasio, Nicolás Jiménez, Pedro Segura, Claudia Sánchez, Luisa Durán, Omar Benavides, Adán Hernández, Tatiana Santander, Adán Lara, Daniel Díaz, Víctor por su inigualable compañía en el laboratorio.

A mis amigos Luz Angélica Rosas, Nelly Neri Zamarripa, Claudia Delgado, Rocío, Areli Huanosta, Zaira Velásquez, Daniel Lara, Homero Pérez, Ricardo Zúñiga, Gaby, Luis, Andrés, Sergio Barragán, Carlitos, Raquel, José Luis, Maritza, a Minerva Crespo, Naty, Félix, Candy, Irina.

A mi mamá, la señora María Elena García por criarme y tenerme paciencia, a mi padre, al Chamaco por el patrocinio de la impresión de este trabajo y a toda mi familia.

A Francisco Javier Gutiérrez Chávez por todo el apoyo a lo largo de este trabajo, comprensión, su amor y paciencia. La ayuda que me ha brindado en los tiempos difíciles y los momentos agradables que hemos compartido. A la señora María de Lourdes Chávez por criar a un hijo excelente y por darle tanta lata siempre. A la Frida y a la Durca por ser como son.

Gracias a todos aquellos que me han soportado y gracias por todo lo que me han enseñado, aunque no nos frecuentemos, los aprecio enormemente y valoro todos los momentos que hemos compartido.

ÍNDICE

Resumen.	2
Antecedentes.	3
1. Glándula hipófisis.	3
2. Neurofilamentos como marcador neuronal.	7
3. Neurofilamentos en la glándula hipófisis.	9
4. Estradiol.	15
4.1 Fisiología de los estrógenos.	16
5. Receptor a Estrógenos.	16
5.1. Distribución del receptor a estrógenos.	17
5.2. Receptor a estrógenos en hipófisis.	18
5.3. Mecanismo de acción del receptor a estrógenos.	18
5.4. Estructura del Receptor a Estrógenos.	21
5.5. Funciones de los estrógenos en hipófisis.	22
Planteamiento del problema.	25
Hipótesis y objetivos.	26
Materiales y métodos.	27
1. Cultivo primario de células adenohipofisarias.	27
2. Inmunofluorescencia.	30
3. Sistema de adquisición y análisis de imágenes.	31
Resultados.	34
Discusión.	50
Conclusiones.	56
Referencias.	57

RESUMEN

Se ha reportado que la adenohipófisis de la rata y ratón posee una subpoblación de células que expresan neurofilamentos de 68 kDa (NF68) y lo hacen en respuesta a los niveles circulantes de estrógenos (Fiordelisisio y Hernández-Cruz 2002).

La pregunta de este trabajo saber si el estradiol está ejerciendo sus acciones a través de sus receptores principales el tipo alfa ($RE\alpha$) y el beta ($RE\beta$) por lo que es necesario saber si existe alguna relación entre los NF68 y los RE.

El objetivo general de este trabajo es analizar la posible correlación en la expresión de los receptores a estrógenos tipo α o tipo β y el efecto del 17 β -estradiol sobre la expresión de NF68 en células adenohipofisiarias de rata en cultivo.

Para lograr el objetivo se realizaron cultivos primarios de células adenohipofisiarias de rata hembra, de macho, macho estrogenizado y de células de lóbulo intermedio, así mismo cultivos de células de hebra fueron suplementos con 200 nM de 17 β -estradiol. Posteriormente se realizó la localización de los receptores a estrógenos junto con la de NF68 por medio de la técnica de inmunofluorescencia.

Los resultados mostraron una correlación entre el marcador neuronal y el $RE\beta$, a diferencia del $RE\alpha$ que no muestran ninguna correlación. Los datos de este trabajo, confirman que las células del lóbulo intermedio de hembra presentan nula inmunoreactividad a NF68, y diferencias en cuanto a la expresión del $RE\beta$. En concordancia con los resultados del estudio de Fiordelisisio y Hernández-Cruz en 2002, se observó que la adenohipófisis de macho muestra pocas células positivas a NF68, en contraste con el macho orquidectomizado e inyectado con 17 β -estradiol que muestra gran cantidad de células positivas a NF68, estableciendo en esta última condición fisiológica una correlación con la expresión del $RE\beta$. La expresión de NF68 y $RE\beta$ en las células a lo largo de los días de cultivo decae con el tiempo, en primer lugar se pierden los NF68 y posteriormente el $RE\beta$. Cuando se suplementa el cultivo con 17 β -estradiol no se previene la pérdida de NF68, sin embargo sí se mantiene la expresión de $RE\beta$.

Se concluye que la expresión de neurofilamentos de 68 kDa correlaciona con el receptor a estrógenos tipo beta en células adenohipofisiarias. El estradiol es necesario para la expresión de NF68 en estas células, pero no es el único factor que se necesita para modificar dicha expresión.

ANTECEDENTES

1. Glándula hipófisis

La glándula hipófisis se encuentra protegida por la silla turca del hueso esfenoides o fosa hipofiseal del cráneo, bajo el cerebro. Se encuentra recubierta por la dura madre, una densa capa de tejido conectivo, y la parte superior está cubierta por el diafragma selar. Se divide en dos partes, lóbulo posterior o neurohipófisis y el lóbulo anterior o adenohipófisis (Moguilevsky y Sciaffini 1972)

El lóbulo posterior o neurohipófisis (NH), está dividido en 1) proceso infundibular o *pars nervosa* y 2) tallo infundibular. 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). La porción superior de esta formación se expande para cubrir la porción inferior del hipotálamo, dando lugar a la eminencia media (Moguilevsky y Sciaffini 1972, Griffin y Ojeda 1988) (Figura 1).

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. 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 innervado por las neuronas hipotalámicas, a través del lóbulo neural (Moguilevsky y Sciaffini 1972, Saland 2001).

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 diencéfalo y *pars distalis*, en la cual se encuentra la mayor parte del tejido

secretor hipofisiario (Figura 1). Las células de la *pars distalis* se pueden dividir en general en dos grandes categorías: células secretoras de hormonas proteicas y secretoras de hormona 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 está compuesto de células basófilas: tirotropos (secretan tirotropina, TSH) y gonadotropos (secretan hormona luteinizante y folículo estimulante, LH y/o FSH respectivamente) (Moguilevsky y Sciaffini 1972, Griffin y Ojeda 1988, Williams 1992, Yeung et al. 2006). La proporción de cada uno de estos tipos celulares puede variar en el adulto y sobre todo en las hembras hasta un 10 % dependiendo de la edad y la etapa del ciclo reproductivo, siendo en general: 50 % de somatotropos, 10-25 % de lactotropos, 10-20 % de corticotropos, 10 % de gonadotropos, 10 % de tirotropos y 4.3 % de células folículo-estrelladas (Yeung et al. 2006) (Tabla 1).

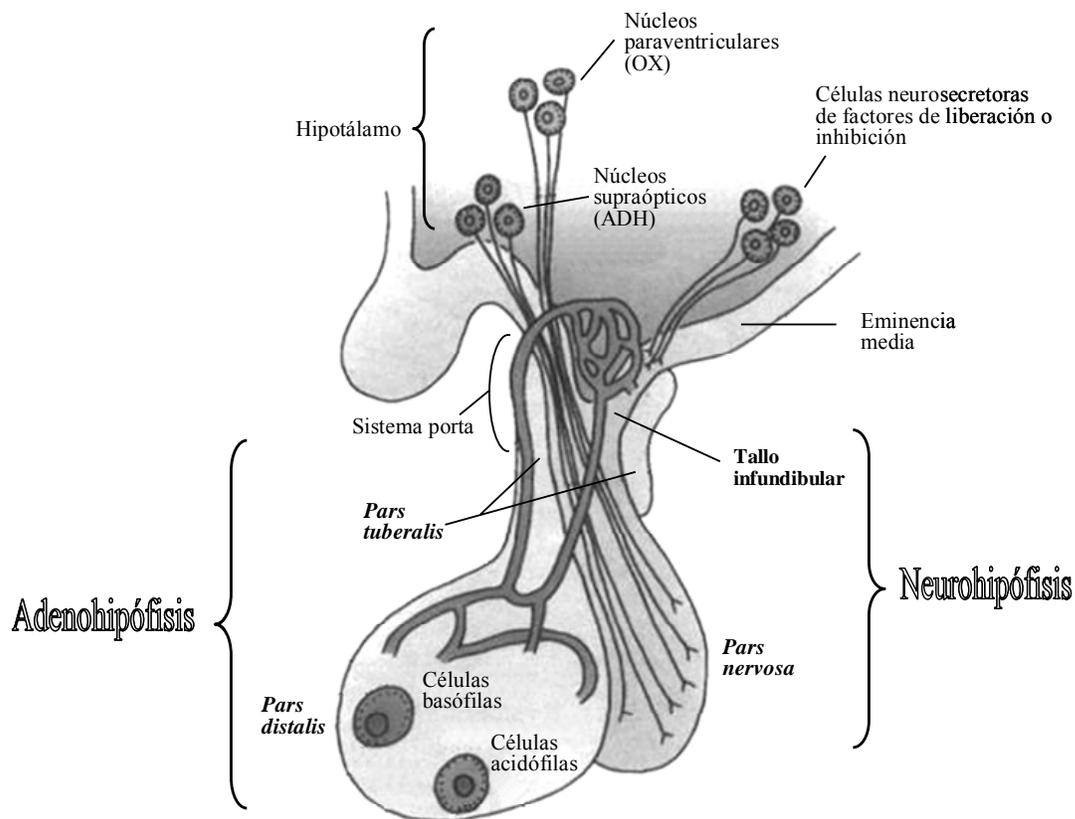


Figura 1. Esquema que muestra la división anatómica de la glándula hipofisiaria y su relación con el hipotálamo. (Modificado de Gartner y Hiatt 2002).

Tipo celular	Porcentaje en población de rata	Hormona	Función
Melanotropos		Melanotropina (MSH)	Regula la síntesis de melanina en melanocitos.
Corticotropos	10-20 %	Corticotropina (ACTH)	Regula el crecimiento y la secreción en la corteza adrenal.
Somatotropos	50 %	Somatotropina (GH)	Estimula el crecimiento y el desarrollo somático posnatal. Regula el metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas.
Lactotropos	10-25 %	Prolactina (PRL)	Relacionada con la actividad lactogénica, metabolismo lipídico y efectos sobre el sistema inmunológico.
Tirotropos	10 %	Tirotropina (TRH)	Regula el crecimiento y metabolismo de la glándula tiroidea.
Gonadotropos	10 %	Folículo Estimulante, Luteinizante (LH y FSH)	Relacionadas con los procesos reproductivos y de secreción de hormonas sexuales esteroideas.

Tabla 1. Tipos celulares adenohipofisarios, porcentaje del total de la población celular en rata y sus principales funciones.

El suministro de sangre a esta glándula está dado por el sistema porta hipofisario, que constituye una complicada red de vasos largos y cortos. La neurohipófisis posee una irrigación común (vasos arteriales-capilares-venas), 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 (Moguilevsky y Sciaffini 1972, Williams 1992) (Figura 1).

Según la organogénesis, 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 esenoideo del cráneo (Sheng y Westphal 1999). El lóbulo intermedio se origina a partir de la pared posterior de la bolsa de Rathke. En cuanto a la neurohipófisis, ésta se desarrolla a partir de las células de la cresta neural como una evaginación del piso del tercer ventrículo. El lumen de esta bolsa se cierra, los lados se fusionan para formar el infundíbulo mientras la porción superior de la bolsa forma un hueco en el piso del tercer ventrículo conocido como eminencia media (Sheng y Westphal 1999) (Figura 2).

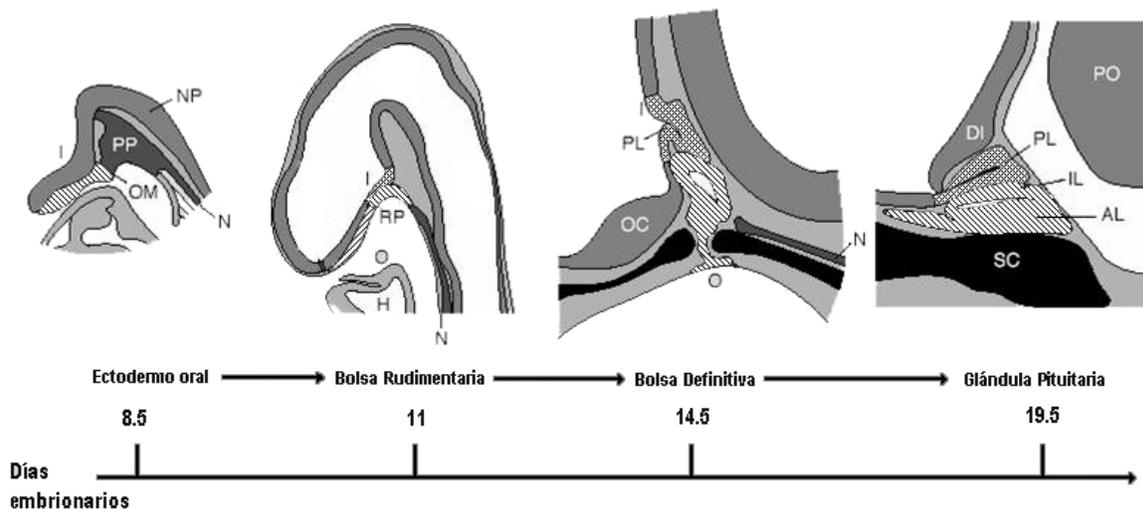


Figura 2. Esquema del desarrollo embriológico de la hipófisis de la rata. AL: lóbulo anterior; DI: diencéfalo; H: corazón; I: infundíbulo; IL: lóbulo intermedio; N: notocorda; NP: placa neural; O: cavidad oral; OM: membrana oral; PP: placa precordial; PL: lóbulo posterior; PO: puente; RP: bolsa de Rathke; SC: cartilago esenoideo. (Modificado de Sheng y Westphal 1999).

Acerca del origen embriológico de la glándula, algunos autores (Takor y Pears 1975; y Dubois et al. 1997) 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. Takor y Pears en 1975, trabajando con embriones de pollo sugirieron que los dos lóbulos de la hipófisis se originan a partir de la porción caudal de la placa neural ventral. En 1986, Eagleson y colaboradores mostraron que los corticotropos de la pituitaria de rana provienen de la placa neural ventral. Dubois y colaboradores en 1997 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.

Si bien hay autores que plantean un origen embrionario diferente para algunos tipos celulares adenohipofisiarios, 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.

2. Neurofilamentos como marcador neural

Varios autores (Ogawa et al. 1990; Halliday et al. 1990; Bäck et al. 1995) han empleado la expresión de filamentos intermedios (FI) para apoyar el posible origen embriológico neural de algunas células incluyendo las adenohipofisiarias. Los FI componen un sistema de filamentos intracelulares en la mayoría de los vertebrados. Tienen un diámetro de 10 nm, intermedios entre los microfilamentos (7 nm) y los microtúbulos (25 nm), y juegan un papel estructural manteniendo 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 de secreción (Senda et al. 1998).

Según sus propiedades inmunológicas y bioquímicas es posible distinguir 5 subclases de FI, que provienen de la expresión de 5 familias de genes: queratinas 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 54 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 53 kDa. Las proteínas fibrilares glias (GFAP) de 51 kDa, son características de las células gliales y, finalmente los neurofilamentos (NF) 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 (Alberts et al. 2002).

Las proteínas de NF-M y NF-H no son capaces por sí solas 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 entre sí para formar un tetrámero (protofilamento) y finalmente 4 protofilamentos se enrollan para formar un neurofilamento. El protofilamento, es la forma más pequeña y estable que puede haber en solución (Alberts et al. 2002) (Figura 3).

Durante la maduración neuronal, el número de neurofilamentos se va incrementando con relación al de microtúbulos y filamentos de actina, hasta convertirse en el filamento predominante del citoesqueleto en los axones mielinizados. Por medio de experimentos de *knockout* se ha mostrado que los NF determinan al calibre axonal y por lo tanto la velocidad de conducción de las señales eléctricas. Así mismo, los axones mielinizados de ratones desprovistos de NF-L y otros con interrupciones de NF-M y NF-H presentan potenciales de acción 50% más lentos que el control (Kriz et al. 2000). La deficiencia de NF-L también produce anomalías en la arborización dendrítica de las motoneuronas (Zhang et al. 2002) y alteraciones en el metabolismo (Dubois et al. 2005 a y b). En cuanto a las células endocrinas se ha probado por medio de experimentos electrofisiológicos en ratones carentes de NF-H alteraciones en la excitabilidad membranal sugiriendo que los NF modulan los canales iónicos de la membrana (Kriz et al. 2000).

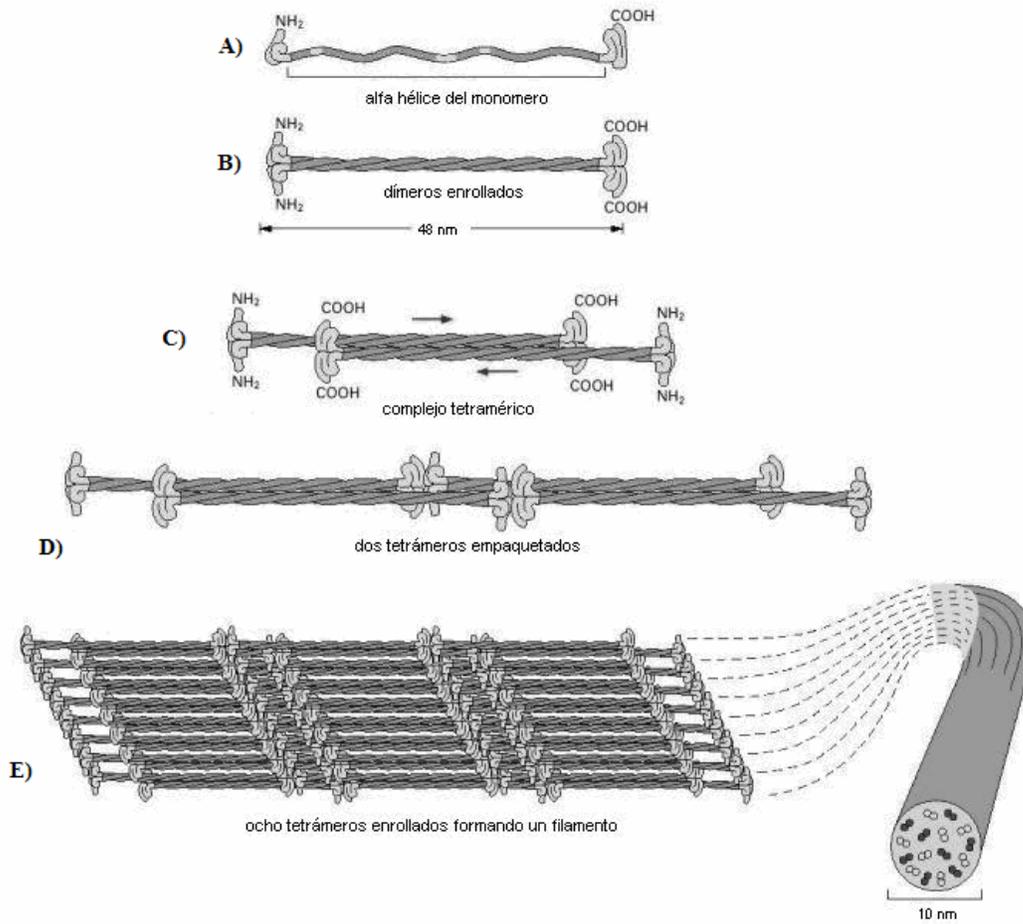


Figura 3. Modelo habitual de ensamblaje de un filamento intermedio. El monómero mostrado en (A) se empareja con otro monómero formando un dímero (B), de forma que la región central se alinea en paralelo y se empaqueta conjuntamente formando un sobreenrollamiento. Entonces, dos dímeros se alinean, lado contra lado, y forman un tetrámero antiparalelo de cuatro cadenas polipeptídicas (C). Dentro de cada tetrámero los dímeros están distanciados suficientemente uno con respecto al otro permitiendo la asociación con otro tetrámero (D). En el filamento intermedio final los tetrámeros están unidos formando un haz helicoidal (Tomado de: Alberts et al. 2002).

3. Neurofilamentos en la glándula hipófisis

La investigación de la expresión de marcadores neuronales en la hipófisis inicia con un trabajo de Ogawa y colaboradores quienes en 1990, realizaron un estudio sobre la expresión de filamentos intermedios en las células hipofisarias del humano de hembras y machos. De igual forma, utilizando inmunocitoquímica, Tooze y colaboradores en 1989 mostraron que la línea celular AtT-20 secretora de ACTH, derivada de un tumor de murino, expresa los tres polipéptidos que conforman los neurofilamentos. Las conclusiones del posible origen embrionario de la hipófisis han sido contradictorias: Halliday y colaboradores en 1990, utilizando pituitarias humanas y Bäck y colaboradores en 1995 con hipófisis de rata, describieron que los neurofilamentos únicamente están presentes en la neurohipófisis y no hay presencia de estos en el lóbulo anterior. 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.), la edad y el sexo de los animales.

Más recientemente los experimentos realizados por Fiordelisiso y Hernández-Cruz en 2002, muestran evidencias de la expresión de marcadores neuronales en la hipófisis de rata, tales como neurofilamentos de 200 (NF200) y 68 kDa (NF68) y proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2). En este estudio, por medio de la cuantificación de la intensidad de inmunofluorescencia se identificaron células positivas a NF68 en cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata hembra de 60 días de edad mostrando un patrón similar a los obtenidos con los marcadores NF200 y MAP-2.

En el mismo trabajo, la microscopia de fluorescencia mostró un continuo en la intensidad de marcaje de NF68 en células adenohipofisarias de rata hembra de 60 días de edad. La marca fue clasificada arbitrariamente en tres grupos: El primer grupo considera a las células con fluorescencia específica baja (menos de 25 uaf -unidades arbitrarias de fluorescencia-), este nivel fue similar a la fluorescencia del control negativo, las células CHO (ovario de hamster chino) que no expresan NF68, se clasificó como sin expresión (SE). Un segundo grupo de células, el cual muestra débil inmunoreactividad (26-100 uaf) se clasificó como células con baja

expresión (BE). Finalmente un tercer grupo que muestra una intensa inmunoreactividad a NF68 (101-250 uaf) fue nombrado células con expresión alta (AE), la intensidad de inmunotinción de este grupo fue similar al control positivo, las neuronas simpáticas de rata, las que poseen marcada expresión de NF68. Se encontró en las células de rata hembra de 60 días de edad los siguientes porcentajes: SE 51.3%, BE 38.6% y AE 10.1 % de acuerdo al nivel de marcaje para NF68.

Para descartar que la presencia de células positivas a NF68 en la adenohipófisis de rata adulta pudiera representar una población de células inmaduras, Fiordelisio y Hernández-Cruz decidieron explorar en etapas más tempranas, en neonatos, en los 10, 20 y 45 días de edad. Los resultados de este trabajo indican que la expresión de marcadores neuronales en las células adenohipofisiarias se incrementa gradualmente durante el desarrollo hasta alcanzar un nivel constante en la madurez sexual.

Por medio de doble inmunocitoquímica los autores identificaron las poblaciones de células que expresan NF68 en cultivos de células adenohipofisiarias de rata hembra. Las células positivas a NF68 corresponden en un 20.2 ± 3 % a lactotropos, en 12.6 ± 8 % a gonadotropos, en 11.7 ± 2 % a somatotropos y en 33.1 ± 8 % a tirotropos. Por lo tanto, los marcadores neuronales no son exclusivos de un tipo celular de la adenohipófisis, sino que existe un subgrupo dentro de cada población celular (Fiordelisio y Hernández-Cruz 2002) (Figura 4).

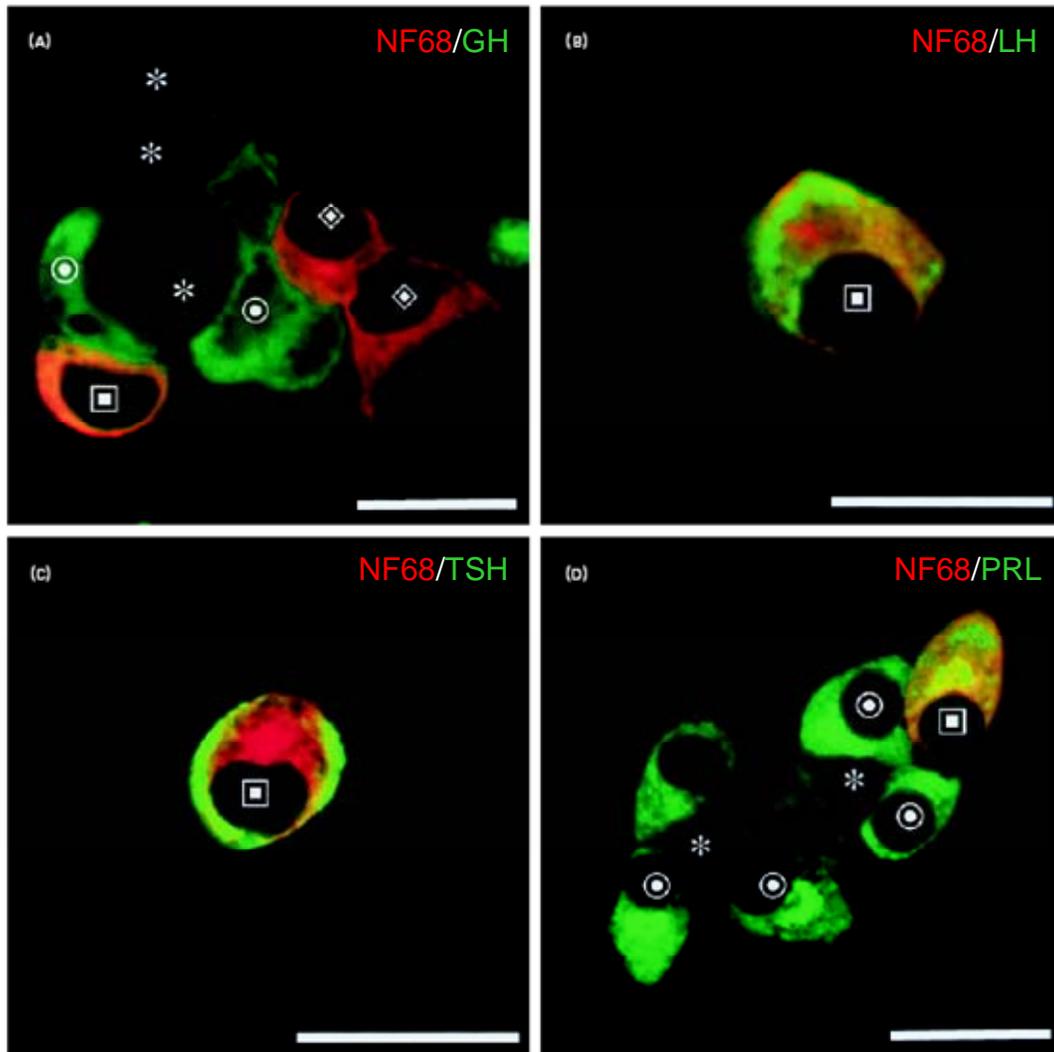


Figura 4. Identificación de los subtipos de células adenohipofisiarias que expresan NF68. La doble inmunotinción de NF68 y GH, LH, TSH o PRL, se realizó en células adenohipofisiarias de ratas hembra de 60 días de edad después de un día de cultivo. En cada cuadro se muestra en rojo la inmunotinción correspondiente a NF68 y en verde la correspondiente a la hormona adenohipofisiaria. **A:** Inmunotinción para NF68 y GH; **B:** NF68 y LH; **C:** NF68 y TSH; **D:** NF68 y PRL. Cuatro tipos celulares pueden ser identificados: dobles negativas (*), los positivos solo a la hormona (o), células positivas solo a NF68 (◇) y células dobles positivas (□). La barra indica 20 μm. (Tomado de Fiordeliso y Hernández-Cruz 2002).

En un trabajo posterior los mismos autores (Fiordeliso et al. 2006), realizaron una doble inmunofluorescencia para detectar NF68 junto con ACTH/MSH α , en células de cultivo primario. Los corticotropos y melanotropos (células productoras del precursor de proopiomelanocorticotropina -POMC-), que se pueden distinguir *in vitro* usando cultivos separados de lóbulo anterior y de lóbulo intermedio. Estos autores encontraron que las células positivas a los dos marcadores, NF68 y ACTH/MSH α están casi ausentes. Para confirmar este resultado se realizaron dobles inmunotinciones de NF68 y ACTH/MSH α en cortes por congelación de hipófisis de rata y ratón. En el lóbulo anterior se encontraron células positivas solo en los corticotropos y por otra parte células positivas a NF68, no se visualizó ningún ejemplo de doble inmunotinción, lo mismo ocurrió en el lóbulo intermedio de ambos roedores.

Con el objetivo de establecer si la expresión de marcadores neuronales está ligada a la secreción de hormonas sexuales al llegar la madurez sexual, estos autores analizaron la expresión de NF68 en células adenohipofisarias de machos de 60 días de edad y se encontraron sólo células con baja expresión, lo que los llevó a concluir que la expresión de NF68 en la adenohipófisis es sexualmente dimórfica y que las hormonas gonadales están involucradas en la regulación de dicha expresión (Fiordeliso y Hernández-Cruz 2002).

Finalmente, para probar si los niveles estrogénicos afectan la expresión de NF68, analizaron la inmunofluorescencia de NF68 a lo largo del ciclo estral (Tabla 2) y con diferentes manipulaciones quirúrgicas en donde se producen variaciones de las concentraciones plasmáticas de estrógenos. Se encontraron diferencias significativas entre las diferentes fases, encontrando el máximo nivel de expresión en estro y el mínimo en proestro. De la misma forma, se mostró un decremento en el nivel de expresión de NF68 con respecto a su control luego de la ovariectomía (OVX) y con el tratamiento de tamoxifén (antagonista del receptor a estrógeno). El tratamiento de 17 β -estradiol a un grupo de ratas OVX produce un incremento en los niveles de expresión de NF68 comparado con las ratas inyectadas solo con el vehículo. Estos resultados sugieren que la expresión de NF68 en las células adenohipofisarias de rata es afectada por los niveles plasmáticos de hormonas estrogénicas y por tanto, estos efectos podrían estar mediados por receptores a estrógenos.

Nivel de expresión de NF68	Diestro (n= 3493)	Proestro (n= 4772)	Estro (n=3704)
AE	12.30%	8%	19.60%
BE	45.80%	18.50%	52.60%
SE	41.90%	73.50%	29.50%

Tabla 2. Porcentajes de células adenohipofisarias obtenidas de rata hembra de 60 días de edad, en diferentes fases del ciclo estral, divididos según el nivel de expresión de NF68. Células con **AE**: alta expresión, **BE**: baja expresión y **SE**: sin expresión. (Tomado de Fiordelisiso y Hernández 2002).

Con el fin de entender el posible papel de las hormonas sexuales (testosterona y estrógenos) los autores orquidectomizaron a un grupo de machos de 60 días de edad, y, con respecto a las células de animales control (sin remoción de testículos), no encontraron diferencias significativas en la expresión de NF68; otro grupo de ratas macho orquidectomizados fueron inyectados con 17β -estradiol y, en comparación con las animales orquidectomizados e inyectados sólo con el vehículo, se observó un incremento significativo en la expresión de NF68. Estos resultados demuestran que la deficiencia de andrógenos por si sola no influye en la expresión de NF68 en células adenohipofisarias y que las células de macho tienen la capacidad de responder con un incremento en la expresión de NF68 al elevarse las concentraciones de estrógenos circulantes.

Por los resultados anteriores, se concluye que la regulación de la expresión de marcadores neuronales en la adenohipófisis de roedor depende de los niveles de estrógenos circulantes y es posible que la inmunoreactividad de NF68 esté ligada a la expresión del receptor a estrógenos, lo que podría sugerir que la falta de expresión de NF68 en el linaje POMC podría deberse a una baja expresión de dicho receptor (Fiordelisiso et al. 2006). Aunque, estudios por medio de hibridación *in situ* reportaron que el 35 % de los corticotropos expresan algún tipo de receptor a estrógenos (Mitchner et al. 1998).

4. Estradiol

Los estrógenos pertenecen al grupo de las hormonas esteroideas comprendiendo a las siguientes hormonas sexuales: estra-3,17- β -diol (17 β -estradiol), estrógeno natural con mayor actividad biológica en mamíferos, seguido por la estrona y el estra-3,16 α ,17 β -triol (estriol).

En hembras, el estradiol se sintetiza y se secreta principalmente por el folículo ovárico, la placenta y la corteza suprarrenal, y en menor cantidad por el tejido adiposo, músculo esquelético, piel, folículos pilosos y hueso. Por otra parte, la principal fuente de estradiol en machos es la aromatización de la testosterona en el tejido adiposo. El estradiol, como otros esteroides sexuales derivan del colesterol, ya sea de la dieta o de la síntesis *de novo*.

Los estrógenos secretados por el folículo ovárico derivan de la conversión de andrógenos a estrógenos. En las células de la teca interna, la LH estimula la producción de andrógenos a partir de colesterol, éstos difunden a las células de la granulosa, donde son capaces de producir progestinas. La FSH activa directamente el complejo enzimático aromatasas para catalizar la conversión de androstenediona a estriol y a estradiol (Griffin y Ojeda 1988).

Los estrógenos son esteroides con 18 carbonos, se caracterizan por la presencia de un anillo fenólico A. Por ser derivados lipídicos, estas hormonas son hidrofóbicas, de naturaleza liposoluble, por lo que necesitan un acarreador para su transporte a través del torrente sanguíneo, ya sea acarreadores de baja afinidad como albúmina, o de alta afinidad como la globulina unidora de testosterona (TeBG). Además de aumentar el tiempo de vida media de la hormona, los acarreadores sirven para regular las concentraciones circulantes (Griffin y Ojeda 1988)

La degradación de estrógenos ocurre en el hígado y los metabolitos resultantes son excretados por la orina o la bilis. Los metabolitos biliares pueden sufrir más transformaciones por acción de la flora intestinal siendo reabsorbidos en la circulación portal y de esta forma, contribuyen a mantener los niveles sanguíneos de estradiol (Griffin y Ojeda 1988).

4. 1. Fisiología de los estrógenos

Los estrógenos cumplen una función vital en la fisiología reproductiva tanto femenina como masculina, estimulando el crecimiento y diferenciación celular de los órganos reproductivos en particular el útero, vagina, ovario, glándulas mamarias, testículos, epidídimo y próstata. Los eventos inducidos por los esteroides son también responsables de las características sexuales secundarias, desarrollo del comportamiento sexual, nidación o fertilización, mantienen del embarazo y la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-ovario.

Los estrógenos no sólo tienen funciones reproductoras y sexuales, sino que afectan otros órganos incluyendo huesos, desarrollo y crecimiento de tumores y funciones cardiovasculares. En especial en el sistema nervioso central, los estrógenos han sido implicados en una gran variedad de funciones tales como al aprendizaje, memoria, conciencia, habilidades motoras finas, regulación de la temperatura, estado de ánimo, ansiedad y agresión (McEwen y Alves 1999, Bodo y Rissman 2006). Además, pueden actuar como antioxidantes con funciones neuroprotectoras (Behl et al. 1995). La disminución de los niveles de estrógenos también se encuentra relacionada con la aparición de síntomas de depresión y en la enfermedad de Alzheimer (Toran-Allerand et al. 1999).

5. Receptor a Estrógenos

Los efectos fisiológicos de los estrógenos son mediados por dos tipos de receptores, tipo α (RE α) o tipo β (RE β). Estos receptores pertenecen a la subfamilia de receptores esteroideos que a su vez se engloban en la superfamilia de receptores nucleares.

Hace más de 40 años se encontró por primera vez en el útero de la rata un receptor para la unión específica de estradiol, a este receptor con un peso molecular de 67 kDa se le denominó RE α (Jensen y Jacobsen 1962). Más tarde, usando hibridación *in situ* en ovario y próstata de rata, se identificó el segundo receptor RE β con un peso molecular de 54 kDa (Kuiper et al. 1996). Más recientemente, únicamente en células adenohipofisarias de rata se detectó una forma truncada del

RE α , el denominado Producto Trunco del Receptor a Estrógenos (por sus siglas en inglés TERP) con sus dos isoformas, primordialmente el TERP-1 (\approx 20 kDa de peso) y en menor proporción el TERP-2 (Friend et al. 1995, Tena-Sempere et al. 2001 a). Cabe mencionar que dichos receptores se codifican por distintos genes.

En lo que respecta a las afinidades de ambos receptores por el estradiol, presentan una constante de disociación (K_d) muy similar, siendo 0.1 nM y 0.4 nM para RE α y RE β respectivamente (Kuiper et al. 1997).

Además de los RE α , RE β y TERP, se han reportado variantes del receptor. Éstas variantes se deben principalmente al *splicing* alternativo, en donde el RNAm del receptor carece de uno o más exones codificantes o contienen bases insertadas en un exón. Dependiendo del sitio de inserción o deleción, las funciones específicas de RE se modifican, permanecen o se pierden (Shupnik 2002).

5.1. Distribución del receptor a estrógenos

El RE α es el más abundante, encontrándose predominantemente en el lóbulo anterior de hipófisis, útero, vagina, seno, testículo, hígado riñón, y el RE β en tiroides, ovario, próstata, piel, vejiga, pulmón, tracto gastrointestinal, cartílago, hueso (Pelletier 2000). Este receptor también se localiza en algunos tejidos del sistema nervioso central y del sistema inmune (Ciocca y Roing 1995).

Algunos órganos coexpresan ambos receptores, aunque hay diferencias específicas en el tejido; por ejemplo, el estroma de la próstata expresa en su mayoría RE α y el epitelio contiene RE β (Kuiper 1996). En el ovario el RE β se encuentra principalmente en las células de la granulosa de los folículos en desarrollo y el RE α en células del estroma (Shughrue et al. 1998). En el útero predomina RNAm de RE α sobre todo en las células estromales y epiteliales del endometrio, mientras que solo se vio una débil señal de hibridación para RE β en estas células (Shughrue et al. 1998).

5.2. Receptor a estrógenos en hipófisis

En la glándula pituitaria se expresan tanto el RE α como el RE β , el RNAm de RE α se ha localizado en el lóbulo anterior y el RNAm de RE β se expresa preponderantemente en el lóbulo intermedio con unas pocas células dispersas en el lóbulo anterior (Shughrue et al. 1998).

Estudios por medio de hibridación *in situ* en la glándula pituitaria anterior de rata hembra adulta revelaron que el número de células con expresión de RNAm de RE α es más alto que las que expresan RNAm de RE β . En contraste, en células adenohipofisiarias de rata hembra prepúber, el RNAm de RE β es el receptor más abundante (Wilson et al. 1998)

Por medio de hibridación *in situ* se observó que los lactotropos, corticotropos y células foliculo estrelladas expresan ambos tipos de receptores en cantidades similares. Sin embargo, el 26% de los gonadotropos muestran una alta expresión de RE α y solo el 17% presenta RE β , mientras que el lóbulo intermedio tiene un alto número de melanotropos con expresión de RE α (43%) en contraste con el RE β (23%) (Mitchner et al. 1998).

Además de las diferencias en la expresión de los receptores α y β según el tipo celular, los niveles de TERP-1 y de RE β varían durante el ciclo estral: en la mañana del proestro los niveles de RNAm de RE β decaen en un 40% comparado con los del metaestro, coincidiendo con un pico de expresión del TERP-1 (Schreihofner et al. 2000).

5.3. Mecanismo de acción del receptor a estrógenos

Los efectos biológicos del estradiol son mediados a través de al menos cuatro rutas: el señalamiento clásico dependiente de ligando, el independiente de la hormona como ligando, el independiente de elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y el señalamiento no genómico (Hall et al. 2001) (Figura 5).

En el mecanismo de acción clásico, la hormona difunde al interior de la célula donde se une a su receptor, la localización subcelular del RE es controversial, aunque hay un consenso que

en ausencia de ligando se encuentra principalmente en el núcleo y en menor cantidad en el citoplasma, y se incrementa en el núcleo en presencia de la hormona (Shupnik 2002). El RE unido a estradiol se activa induciendo un cambio conformacional que a su vez promueve la homodimerización, el complejo hormona-receptor se une a otro complejo parecido formando un dímero. Este complejo se acopla a las regiones reguladoras de ERE (secuencias específicas situadas en la región promotora de los genes) y recluta la maquinaria de transcripción con o sin la ayuda de cofactores (coactivadores, correpresores y cointegradores de la transcripción) (McKenna et al. 1999). De esta forma el estradiol provoca su respuesta celular.

Además de la activación mediada por la hormona es posible la modulación del RE por ligandos extracelulares en ausencia de estradiol. En este sentido se ha demostrado que los factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGF-1) activan al RE incrementando la expresión de sus genes blanco (Topalli y Etgen 2004). Asimismo, el factor de crecimiento neural (NGF) a través de su receptor de alta afinidad el TrkA junto con los estrógenos interactúan en el mantenimiento y funcionamiento de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Scolville et al. 1997, Liuizzi et al. 1999), igualmente, se ha reportado que el estradiol y el NGF sinérgicamente el estimulan el desarrollo de prolongaciones tipo neuritas en la línea celular derivada el feocromocitoma de rata (PC12) a través del receptor a estrógenos (Gollapudi y Oblenger 2001).

Aun no está claro el mecanismo por el cual las rutas de señalización del RE y de los factores de crecimiento convergen, sin embargo existen evidencias de que las modificaciones en el estado de fosforilación del RE sirven como un mecanismo independiente de la hormona como ligando. Otro equipo de trabajo también sugiere que los coactivadores pudieran servir como puntos de convergencia (Sanchez et al. 2007).

Las acciones genómicas del RE independientes de ERE se observan cuando el complejo estradiol-RE promueve la transcripción de genes por medio de elementos de respuesta alternativos a los ERE, tales como AP-1 (activador de la proteína 1). Se he reportado la asociación de AP-1 con factores de trascipción, tales como Fos/Jun, los cuales median la unión del RE activado al DNA, dando como resultado la regulación de la transcripción genética (Kushner et al. 2000)

5.4. Estructura del Receptor a Estrógenos

El receptor a estrógenos se divide estructuralmente y funcionalmente en seis dominios: A/B, C, D y E/F sobresaliendo cuatro funciones importantes: unión a ligando, dimerización, unión al DNA y activación de la transcripción (Figura 6).

El **dominio A/B** se encuentra localizado en el extremo amino terminal de la proteína. En esta región se presenta una función de activación de la transcripción genética (AF-1), además cuenta con varios sitios de fosforilación importantes para la activación del receptor, especialmente cuando el receptor es activado en ausencia de la hormona (Germain et al. 2006).

El **dominio C**, conocido como el dominio de unión al DNA (DBD, por sus siglas en inglés) se caracteriza por la presencia de nueve residuos de cisteínas, de los cuales ocho están coordinados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar los denominados dedos de zinc que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente a ERE (Freedman 1992). Este acople al DNA se determina por la composición de aminoácidos localizados entre estos dos dedos de zinc, secuencia conocida como la caja P (P-box). Los dominios DBD de $RE\alpha$ y $RE\beta$ presentan 97% de homología entre ellos.

En el **dominio E/F**, ubicada en la región del carboxilo terminal, se encuentra la secuencia de aminoácidos que permiten la unión del ligando (LBD, por sus siglas en inglés) de manera específica. Esta región también exhibe la función de activación de la transcripción 2 (AF-2), involucrada en la activación del receptor de forma independiente de ligando, igualmente se ha reportado su participación en la dimerización de los complejos RE-hormona, la fosforilación del receptor (Mueller-Farnow y Egner 1999) y la interacción con otras proteínas coactivadoras o correpressoras de la transcripción (McKenna 1999). El dominio LBD de cada uno de los receptores presenta 60% de homología entre ellos.

El **dominio D** sirve de bisagra entre DBD y LBD, con lo cual permite el cambio conformacional del receptor. Además alberga la secuencia de localización nuclear (Germain et al. 2006).

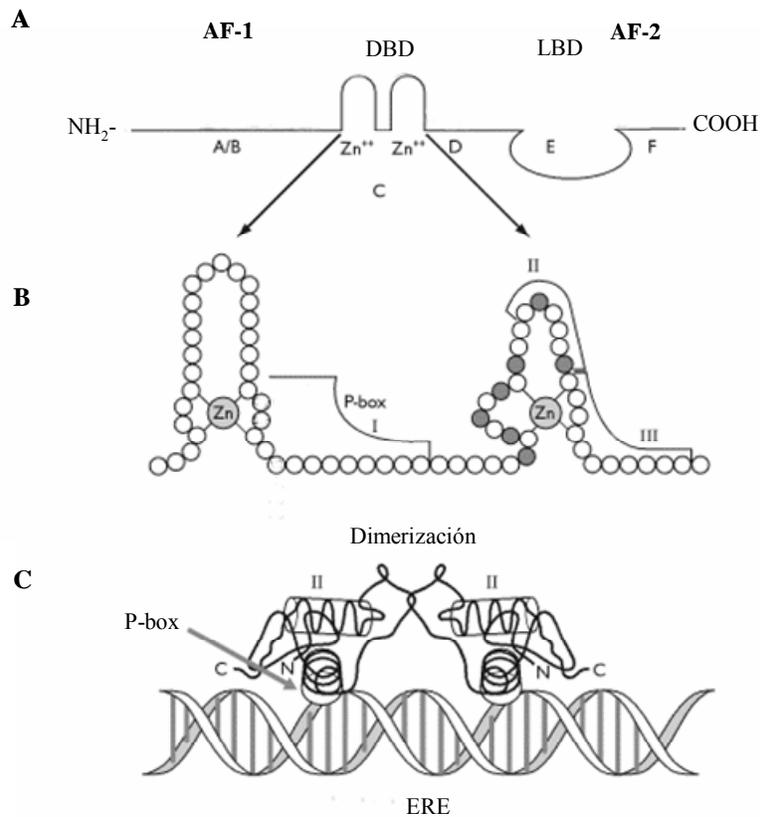


Figura 6. Esquema de la estructura del receptor a estrógenos. A: estructura general del receptor a hormonas esteroideas. B: estructura de los dedos de zinc, las regiones I, II y III indican las regiones helicoidales del DBD, la región I contiene a la P-box. C: Los receptores dimerizados y unidos a ERE. AF-1 o AF-2: función de activación de la transcripción genética; DBD: región de unión al DNA; LBD: región de unión a ligando; ERE: elementos de respuesta a estrógenos.

5.5. Funciones de los estrógenos en hipófisis

El estradiol regula la secreción hormonal en la adenohipófisis por un mecanismo indirecto, actuando en la liberación/inhibición de péptidos a nivel de la región de la eminencia media y también ejerciendo acciones directas a nivel de la glándula pituitaria. El estradiol regula la síntesis y secreción de PRL, gonadotropinas, receptor a progesterona y otros (Ciocca y Roig 1995).

En el macho la testosterona a través de un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel de hipotálamo e hipófisis inhibe la secreción de gonadotropina. En la hipófisis las acciones inhibitorias por parte de la testosterona son mediadas por la aromatización de la testosterona a estradiol (Bagatell et al. 1994).

En cuanto a la hembra, el estradiol afecta la secreción de gonadotropinas por medio de asas de retroalimentación positiva y negativa. Actúa a nivel del núcleo arcuato hipotalámico regulando la liberación de GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas) y en los gonadotropos inhibiendo o estimulando la secreción de LH y FSH inducida por GnRH. La retroalimentación negativa se presenta en la fase folicular y lútea del ciclo reproductivo, donde los niveles plasmáticos bajos de estradiol junto con la progesterona e inhibina del cuerpo lúteo reducen los niveles de FSH y LH, de esta manera, en ratas ovariectomizadas aumentan los niveles plasmáticos de estas hormonas, y se restauran a valores normales con la administración de estradiol. La retroalimentación positiva se manifiesta cuando al aumentar súbitamente la secreción de estradiol se estimula la producción de gonadotropinas, principalmente LH, causando la ovulación (Knobil 1998).

Los estrógenos actúan como factores mitogénicos en lactotropos y gonadotropos, por lo que favorece el desarrollo tanto de hiperplasia como de tumores (Ciocca y Roig 1995). Asimismo, se detectó la expresión de RE α en la mayoría de los prolactinomas humanos (del 70 al 100% de los casos) y en menor número la presencia de RE β (60% de los casos) (Melmed 2003).

El estradiol interviene en la regulación de los ciclos reproductivos de los mamíferos, el menstrual en primates y el estral en el resto de las especies. Por su parte, la rata se caracteriza por tener ciclos poliéstricos, es decir que el ciclo estral se repite durante todo el año con una periodicidad de 4 a 5 días y se encuentra dividido en las siguientes fases:

Proestro. Esta fase anuncia el próximo celo, se caracteriza por el aumento progresivo de los niveles de estradiol secretados por las células del folículo en desarrollo bajo el estímulo de las gonadotropinas hipofisarias. Hacia la tarde del proestro hay un incremento en los niveles de estradiol, lo que provoca un aumento pronunciado de la secreción de LH (llamado oleada

preovulatoria de LH), y un aumento un poco menor de FSH. A nivel de citología vaginal se identifica por una predominancia de células epiteliales nucleadas y pocas células epiteliales escamosas cornificadas. Su duración es de 12 a 14 hr (Tabla 3).

Estro. Este periodo se caracteriza por el celo, la ovulación y la cópula. Los niveles de estradiol disminuyen. La mucosa vaginal presenta gran cantidad de células epiteliales escamosas cornificadas. Su duración es de 25 a 27 hr

Metaestro (Diestro 1). Después de la ovulación, el folículo se luteiniza bajo la acción de la LH, la cual estimula la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo y conjuntamente se presentan nuevos folículos pequeños que comienzan a secretar estradiol. Su duración es de 6 a 8hr.

Diestro (Diestro 2). Se caracteriza por la secreción de progesterona, si no hay fecundación se presenta la regresión de los cuerpos lúteos, mientras tanto los folículos siguen aumentando las concentraciones plasmáticas de estradiol. En la citología vaginal predominan linfocitos, y en menor cantidad células epiteliales nucleadas o células epiteliales escamosas cornificadas. Las muestras obtenidas por frotis vaginal entre diestro 1 y diestro 2 son indistinguibles. Su duración es de 55 a 57 hr.

Fase del ciclo estral	Cambios en los ovarios	Tipos de células en los frotis vaginales	Concentración plasmática de estradiol (pg/ml)
Proestro	Rápido crecimiento folicular	Células epiteliales nucleadas	40-50
Estro	Ovulación	Cornificadas	7
Metaestro	Formación de Cuerpos lúteos	Cornificadas y leucocitos	15-20
Diestro	Cuerpos lúteos formados	Leucocitos y células epiteliales nucleadas	15-20

Tabla 3. Cambios en los ovarios e histología vaginal durante el ciclo estral en ratas. Los datos de concentración plasmática de estradiol se tomaron de Smith et al. 1975.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya que la expresión de NF68 en las células adenohipofisarias de rata se modifica en función de las concentraciones plasmáticas de estrógenos circulantes y el hecho de que un subgrupo particular dentro de cada tipo celular exprese dicho marcador, sugiere que la expresión de NF68 es regulada diferencialmente por los estrógenos por lo que es necesario saber de que manera están actuando y el primer abordaje a este problema es saber si el estradiol está ejerciendo sus acciones a través de sus receptores principales el tipo alfa y beta, ya que la expresión de NF68 podría estar relacionada con las diferencias en la expresión estos receptores por lo que es necesario saber si existe alguna relación entre los NF68 y los RE.

HIPÓTESIS

El estradiol regula de manera directa la expresión de neurofilamentos de 68kDa, existiendo una correlación entre la expresión de alguno de los receptores estrogénicos y el NF68 en células adenohipofisiarias de rata en cultivo.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es analizar la posible correlación entre la expresión de los receptores a estrógenos y el efecto del estradiol sobre la expresión de neurofilamentos de 68 kDa en células adenohipofisiarias de rata en cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si existe alguna correlación en la expresión de los receptores de estrógenos tipo alfa y tipo beta y la expresión de NF68 en cultivos de células adenohipofisiarias de rata hembra.
2. Detectar la expresión de NF68 junto con el receptor a estrógenos en las células del lóbulo intermedio de rata hembra.
3. Determinar si existe alguna correlación entre la expresión del receptor de estrógenos y la expresión de NF68 en cultivos de células adenohipofisiarias de rata macho y si esta correlación se altera con el tratamiento estrogénico.
4. Determinar si el tratamiento de células en cultivo con 17 β -Estradiol modifica la expresión de NF68 y del receptor a estrógenos en función del tiempo en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo primario de células adenohipofisarias

Todos los estudios con animales se realizaron bajo un protocolo institucionalmente aceptado similar a la Guía de USPHS (United States Public Health Service) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Se utilizaron ratas hembra y macho de la cepa Wistar de 60 días de edad, cuando han alcanzado su madurez sexual, los animales se mantuvieron en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas en condiciones de alimentación. Por medio de un frotis vaginal se eligieron ratas hembra en fase estro del ciclo estral (Tabla 3).

El día del experimento los animales se decapitaron bajo anestesia con éter y las glándulas hipofisarias de ratas hembras y macho de diferentes condiciones experimentales, se disectaron bajo condiciones asépticas. Las células obtenidas de cada animal se sembraron separadamente. Se hicieron tres cultivos por separado para cada condición experimental empleando una rata por cultivo.

En condiciones de esterilidad se extrajeron las glándulas pituitarias apartando el lóbulo intermedio (neuro-intermedio) para el caso de cultivo de células adenohipofisarias, y se utilizó el lóbulo neuro-intermedio para el cultivo de células del lóbulo intermedio, para ambos cultivos se sigue el mismo procedimiento. El tejido se colocó en una caja petri con solución DMEM-lavados, el cual consistió de DMEM, (Dulbecco's Modified Eagle Media, GIBCO BRL; Rockville MD) con 0.75 mg/ml de Albúmina Sérica Bovina (BSA fracción V, GIBCO BRL) y 1/100ml de antibióticos y antimicóticos (10,000U penicilina GIBCO BRL, 10,000 mg/ml estreptomicina GIBCO BRL).

Una vez extraído el tejido, se cortó en pedazos pequeños colocándolo en DMEM-lavados frío, se retiró este medio, se agregó DMEM con 2.5 mg/ml de tripsina (Worthington Biochem Co.; Lakewood NJ., USA), se incubó por 20 minutos a 37°C, y posteriormente se adicionó 0.1mg/ml de colagenasa (Worthington) por 5 minutos a la misma temperatura. Con ayuda de una

pipeta centelleada, siliconizada y pulida al fuego se disoció el tejido mecánicamente. Las células se centrifugaron a 1300 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos y el botón se lavó dos veces más con la solución DMEM-lavados.

Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo DMEM suplementado con 2% de Suero Fetal Bovino (Gibco BRL), 10% de Suero de Caballo (Gibco), 10,000U penicilina GIBCO BRL, 10,000 mg/ml estreptomicina GIBCO BRL y 5 mg/ml de insulina (Sigma) y se colocaron en una caja Petri de plástico estéril por 45 minutos con el fin de disminuir la cantidad de fibroblastos y células contaminantes, las cuales se adhirieron al plástico. Transcurrido el tiempo, se tomaron las células no adheridas que son células adenohipofisiarias.

Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio redondo del número 1 (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ., USA) previamente tratados con 100 $\mu\text{g/ml}$ poly-L-lisina (Sigma) y colocados en una caja de cultivo de 12 pozos (Costar; Cambridge, Mass., USA). Después de 30 minutos se agregó 1 ml de medio de cultivo y las células se mantuvieron a una temperatura de 37 °C en una atmósfera humedecida y con 95% de aire y 5% CO₂. En los cultivos mantenidos por largo tiempo (12 días) se cambió el medio de cultivo rutinariamente tres veces por semana.

Cabe mencionar que la concentración de estradiol en el suero de caballo y fetal bovino es de aproximadamente $6.8 \times 10^{-11}\text{M}$ (Perfil Bioquímico, GIBCO BRL; México) la cual da una concentración final en el medio de cultivo de $8.0 \times 10^{-12}\text{M}$. A este respecto cabe mencionar que Amara y Danniels en 1983 reportaron que la concentración efectiva para producir cambios en el crecimiento, proliferación y secreción al menos de lactotropos y somatotropos es de aproximadamente $5 \times 10^{-11}\text{M}$.

Un día después de haber hecho el cultivo y/o 4, 9 y 12 días después las células fueron fijadas por 30 minutos con para-fomaldehído al 4% en PBS al 0.1 M.

Cultivo de células adenohipofisarias suplementado con estradiol

A los cultivos primarios de rata se les adicionó 200 nM de 17 β -estradiol; 1, 3, 5 (10)-estratriene 3,17 β -diol (Sigma) diluido en DMSO (Sigma).

Gonadectomía y terapia de sustitución de estrógenos

Con el fin de eliminar el posible efecto inhibitorio de la testosterona sobre que la acción del estradiol en los machos, un grupo de 6 ratas macho de 60 días de edad fue orquidectomizado bilateralmente. Este procedimiento fue realizado por la Dra. Claudia Verónica Rivera Cerecedo, jefe del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

El procedimiento quirúrgico se realizó bajo condiciones asépticas y anestesia general con Clorhidrato de Ketamina de 50 a 100 mg/kg (Cheminova, NJ., USA) e Hidrocloruro de Xilazina 0.2 a 0.3 mg/kg (Bayer, Clayton, USA.) por vía intramuscular. Después de la recuperación de la anestesia, los animales se mantuvieron en jaulas aisladas administrándoles Fluorfenicol 10mg/kg (Nuflor, Sering Plaug; Kenilworth, NJ., USA) por vía oral durante cinco días y fueron examinados periódicamente para detectar una posible infección. Las ratas fueron mantenidas bajo un régimen de 12 horas luz–oscuridad y alimentadas *ad libitum*.

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), administrandolo subcutáneamente, diariamente a las 11:00 horas durante 4 días consecutivos a un grupo de 3 ratas con 5 días posteriores a la orquidectomía (20 μ g/100 g de peso; aproximadamente 0.2 ml de aceite de ajonjolí inyectado por rata). Para el experimento control se inyectaron 3 ratas orquidectomizadas con la misma cantidad de aceite.

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

2. Inmunofluorescencia

Las células previamente fijadas se bloquearon y permeabilizaron por 30 minutos con la solución que contiene 0.2% BSA (w/v) y 0.1% (v/v) Triton X 100 (Sigma) en buffer fosfatos 0.1 M (PBS).

Transcurrido el tiempo se agregó el anticuerpo primario monoclonal anti-NF68 (monoclonal anti-NF68 kDa; IgG clona NR4, DAKO, Carpintería, Calif., USA) diluido a una concentración de 1:100 en la solución de bloqueo y permeabilización. Se incubó en una caja húmeda a 4°C toda la noche.

Al día siguiente todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente, se lavó tres veces el anticuerpo primario con PBS y se dejó 2 horas con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con isocinato tetrametil rodamina (TRITC; Zymed, Laboratories Inc., San Francisco, Calif., USA) se diluyó en la solución de bloqueo y permeabilización a una concentración de 1:100. Por último, después de lavados con PBS, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con Medio de Montaje para fluorescencia (Dako), que contiene 15 mM de NaN_3 . Los controles se realizaron con cultivos colocando sólo el anticuerpo primario o solo el secundario y no se mostró fluorescencia arriba de la basal (autofluorescencia) determinada al observar un cubreobjetos con células adenohipofisarias sin haber sido expuestas al tratamiento para inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia doble

Para la inmunofluorescencia doble, se siguió el mismo procedimiento de bloqueo y permeabilización antes explicado, se colocó el anticuerpo primario anti-NF68 toda la noche en refrigeración con la solución de bloqueo y permeabilización. Al día siguiente, después de tres lavados con PBS, las células fueron incubadas con el primer anticuerpo secundario, la fracción $\text{F(ab}')_2$ conjugada con Cy5 de cabra anti-ratón (Fracción $\text{F(ab}')_2$ de cabra anti-IgG H+L de ratón; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa., USA) por 2 horas a temperatura ambiente en dilución 1:20. Después de los lavados con PBS, las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 6

horas con el anticuerpo primario anti-RE α (IgG policlonal anti-RE α ; Santa Cruz Biotechnology, California, USA) o anti-RE β (IgG policlonal anti-RE β ; Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:100 y finalmente por 2 horas con el segundo anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a isocinato de fluoresceína (anti-conejo conjugado con FITC, Zymed), con el objetivo de separar las longitudes de onda de los dos fluoróforos, por último se montó con solución de montaje (Dako).

Fue necesario realizar varios controles negativos para lograr dobles inmunotinciones confiables. El primer control negativo de los anticuerpos primarios se realizó por medio de inmunoabsorción, se pre-incubó por 2 h al anticuerpo primario anti-RE β o anti-RE α en presencia de un exceso de su péptido específico (100 μ g/ml; proporcionado por el Dr. Parlow, NHPP-NIH), posteriormente en las muestras se hizo reaccionar el anticuerpo pre-incubado y el secundario correspondiente. El segundo control, se realizó adicionando únicamente el anticuerpo primario o el secundario. En ninguno de los dos casos descritos se detectó inmunoreactividad. Los controles negativos para los anticuerpos secundarios se realizaron incubando las muestras primero con el anticuerpo primario anti-NF68 de ratón, después con la fracción F(ab')₂ acoplado a CY- 5 de cabra anti- IgG de ratón y finalmente se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC. Este control resultó negativo para la fluorescencia de FITC y positivo para Cy-5.

3. Sistema de adquisición y análisis de imágenes

Los cultivos se revisaron por medio de microscopia de epifluorescencia digital usando un microscopio invertido Nikon Diaphot equipado con una fuente de iluminación de lámpara de mercurio de 100W y filtros apropiados (TRITC: excitación 510-560 nm, emisión 590 nm, Nikon, Japan; Cy5: excitación 647 nm, emisión 680 nm/DF32, Chroma Technology Corp., Rockingham Vt., USA y FITC: excitación 480 nm, emisión 522 nm/DF32, Chroma Technology Corp.), así como un espejo dicróico: 580 nm y filtro barrera: 590 nm.

Se utilizó un objetivo 63X de inmersión en aceite (Plan Apo, NA 1.4; Nikon, Japan). Las imágenes se adquirieron con una cámara digital CCD enfriada de alta sensibilidad y linealidad (Sen Sys 0401E, Roper Scientific, Tucson, Ariz., USA). La iluminación se limitó al tiempo de

exposición por medio de un obturador electrónico Uniblitz controlado por la computadora (Vincent Associates, Rochester, NY., USA).

Las imágenes se adquirieron con el programa Image-Pro Express 2.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, Md., USA) y se guardaron en formato TIFF (resolución de 8 o 12 bits). Las medidas de fluorescencia específica de cada marcador, se obtuvieron con ayuda del programa Image-J (National Institutes of Health, USA), marcando una región irregular alrededor del citoplasma de cada una de las células adenohipofisarias del campo, que fueron distinguidas de los fibroblastos y otras células contaminantes. Por último, se midió un área circular, libre de células, en 20 campos diferentes y se hizo un promedio para obtener la fluorescencia de fondo. La fluorescencia de fondo se restó de las intensidades de fluorescencia de todas las células, dando una fluorescencia corregida para cada célula (fluorescencia específica).

Así mismo para obtener las medidas de fluorescencia específica en la inmunocitoquímica doble, con el programa Image-J se marcó el área de fluorescencia para un marcador y se empalmó con su correspondiente foto del otro marcador, con el fin de obtener la misma medición para marcadores distintos y comparar su expresión.

Los valores de fluorescencia para diferenciar entre células positivas y negativas para cada marcador se obtuvieron realizando en cada experimento un control en el cual se tomó como negativo la fluorescencia de las células incubadas con el anticuerpo secundario, sin el primario.

Los resultados se analizaron con ayuda del programa Origin 6.0 Professional (Microcal; Northampton Ma., USA). Los datos obtenidos de la inmunofluorescencia sencilla se representaron en un histograma de frecuencia, en donde se mostró la Frecuencia Normalizada con respecto al número de células en relación con la Fluorescencia Específica. Por otra parte, con las mediciones simultáneas de los dos marcadores se hizo una prueba de correlación entre las variables Fluorescencia Específica de NF68 y la Fluorescencia Específica del RE tipo beta y/o alfa, asimismo se obtuvieron los porcentajes de cada grupo de células por medio del programa Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Co.; Redmond WA).

Los experimentos se realizaron tres veces por separado y de cada uno se fotografió al menos 50 campos, dando en promedio 800 células analizadas. En las figuras se muestran ejemplos representativos.

RESULTADOS

Con el fin de determinar la posible correlación en la expresión de los RE α y RE β y la expresión de NF68, se realizó una doble inmunofluorescencia en cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata hembra en estro y se cuantificó la fluorescencia para cada marcador en cada célula. En la figura 6 a y b se muestran fotografías de las células analizadas. Las células positivas a RE α o RE β se observan en verde y las células positivas a NF68 en rojo. Los valores numéricos de la fluorescencia específica se graficaron uno contra otro y se obtuvieron las gráficas de correlación que muestran la relación entre los niveles de expresión de RE α o RE β y NF68 (Figura 7 A y B).

En la figura 7A, se muestra la correlación entre la expresión de RE α y NF68, como claramente se observa, existen células positivas y negativas al receptor que son positivas o negativas a NF68, siendo el índice de correlación lineal entre estos dos marcadores muy bajo ($R = 0.01$). En contraste en la figura 7B se observa que la mayoría de las células que expresa NF68 también expresa RE β obteniendo un coeficiente de correlación de 0.82, lo que indica una correlación entre estos marcadores.

Para hacer un análisis más detallado de la relación entre estos dos marcadores, se consideró el valor de expresión positivo y negativo para ambos y se pueden distinguir cuatro grupos de células, células doble positivas (+RE/+NF68), positivas solo a RE (+RE/-NF68), positivas solo a NF68 (-RE/+NF68) y doble negativas (-RE/-NF68). Este criterio se utilizó para todas las gráficas de correlación presentadas y se obtuvieron los porcentajes de cada grupo en cada condición.

En la gráfica de barras de la Figura 8 se resume el conteo de células obtenidas para cada cuadrante y se observa que en el caso de la relación RE α y NF68, la mayoría de las células son positivas solo a RE α (65.8 % +RE α /-NF68) y en menor cantidad se observan doble positivas (29.4 % +RE α /+NF68), existiendo también células positivas solo a NF68 (2.1 %) y células

dobles negativas (2.1 %). Esto quiere decir que puede haber células positivas a NF68 que lo sean o no a RE α y viceversa.

En la figura 7B se observa la gráfica de correlación entre la fluorescencia específica de RE β y la de NF68 de células adenohipofisarias de rata hembra, como se resume en la Figura 8, aunque predominan las células doble negativas (47.6 % -RE β /-NF) las células positivas a NF68 lo son también a RE β (23.1 % +RE α /+NF68), casi en igual proporción que las células sólo positivas a RE β (27.1 %) y un escaso número de células son sólo positivas a NF68 (2.2 %). Indicando con ello que las células positivas a NF68 son mayoritariamente positivas a RE β .

Si bien es cierto que las células adenohipofisarias que expresan NF68 expresan ambos receptores a estrógenos, sólo en el caso de la expresión de RE β se observa que entre mayor es la expresión de NF68 mayor es la expresión también para el receptor y que el porcentaje de células que son positivas únicamente al receptor lo hace con baja expresión.

Existe pues una correlación directa entre la expresión de RE β y NF68, a diferencia de la expresión de RE α y NF68 en donde no existe correlación significativa.

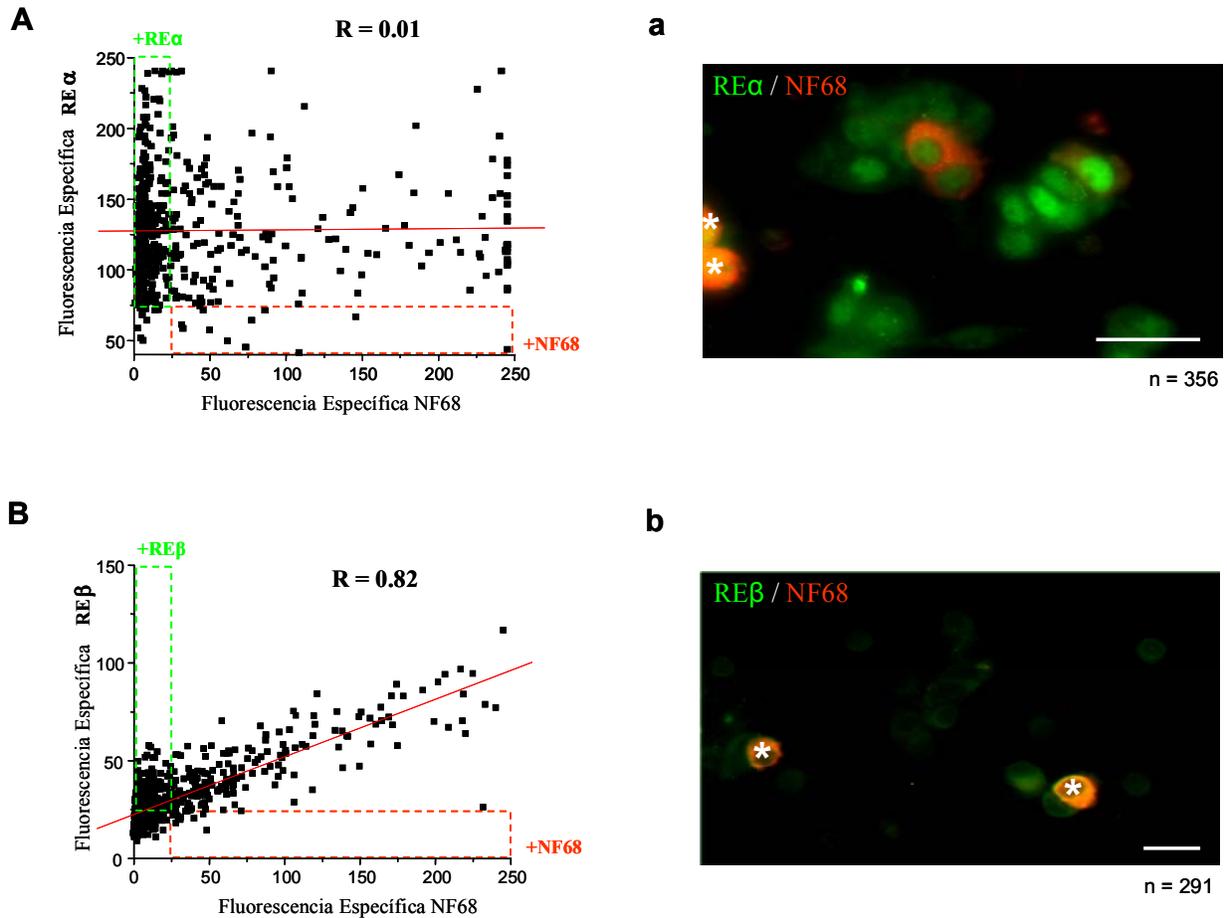


Figura 7. Expresión de RE y NF68 en células adenohipofisiarias de rata hembra. **A:** Gráfica de correlación entre la fluorescencia específica de RE α y NF68. **B:** Gráfica de correlación entre la fluorescencia específica RE β y NF68. **a** y **b:** Ejemplos de las imágenes de la doble inmunofluorescencia de las células analizadas en A y B respectivamente. En verde se muestra la inmunotinción correspondiente a RE, en rojo la correspondiente al NF68; los asteriscos marcan células doble positivas. Las regiones delimitadas en los rectángulos punteados corresponden a células sólo positivas a NF68 (rojo) o a RE α o RE β (verde), el cuadro pequeño en el origen corresponde a células sin expresión de NF68 y RE α o RE β (doble negativas), y el área grande afuera de los rectángulos verde y rojo corresponde a las células que expresan ambos NF68 y RE α o RE β (células doble positivas). La línea roja continua representa el ajuste lineal de los datos. Se observa el coeficiente de correlación (R) y el número de células analizadas (n). La barra indica 20 μ m.

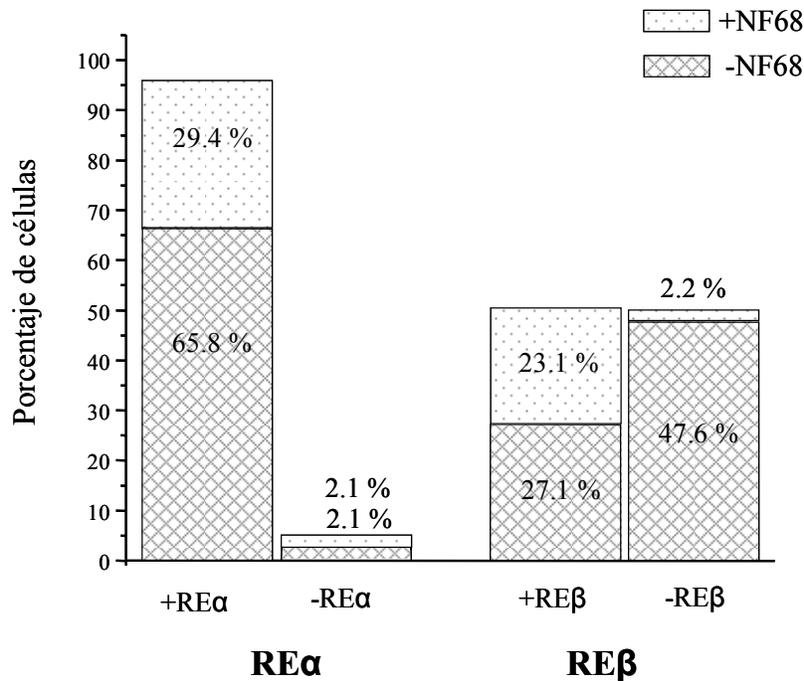


Figura 8. Gráfica de barras de los porcentajes de las células adenohipofisarias de rata hembra +RE/+NF68 y +RE/-NF68, -RE/+NF68 y -RE/-NF68, ya sea al receptor tipo α o β . Se muestran los porcentajes de células positivas a RE (barra izquierda) o negativas a RE (barra derecha) tipo α o β , y cada barra se divide en los porcentajes de las células negativas o positivas a NF68.

Se decidió explorar la correlación entre el RE β y NF68 en otro tipo de células adenohipofisarias, por lo que se realizó la doble inmunotinción de estos marcadores en cultivo de células obtenidas de lóbulo intermedio (Figura 9 b y b'). Este experimento es interesante, ya que Fiordeliso y colaboradores (2006) reportaron la nula inmunoreactividad a NF68 en células de este lóbulo.

En la Figura 9A se muestran el lóbulo intermedio en donde aparecen casi exclusivamente células positivas a RE β (9.7 % -RE β /-NF68, +RE β /-NF68 89.5 %, 0% -RE β /+NF68 y 0.7 % +RE β /+NF68), cuando se grafican los valores correspondientes se obtiene un bajo coeficiente de correlación ($R = 0.08$).

Estos resultados confirman la pobre o nula expresión de NF68 en las células del lóbulo intermedio de hembra en cultivo primario y se identificó en cambio la presencia de RE β , sin existir una correlación entre ellos. Este resultado sugiere que la presencia de RE β es una condición necesaria pero no suficiente para la expresión de NF68.

Lóbulo Intermedio

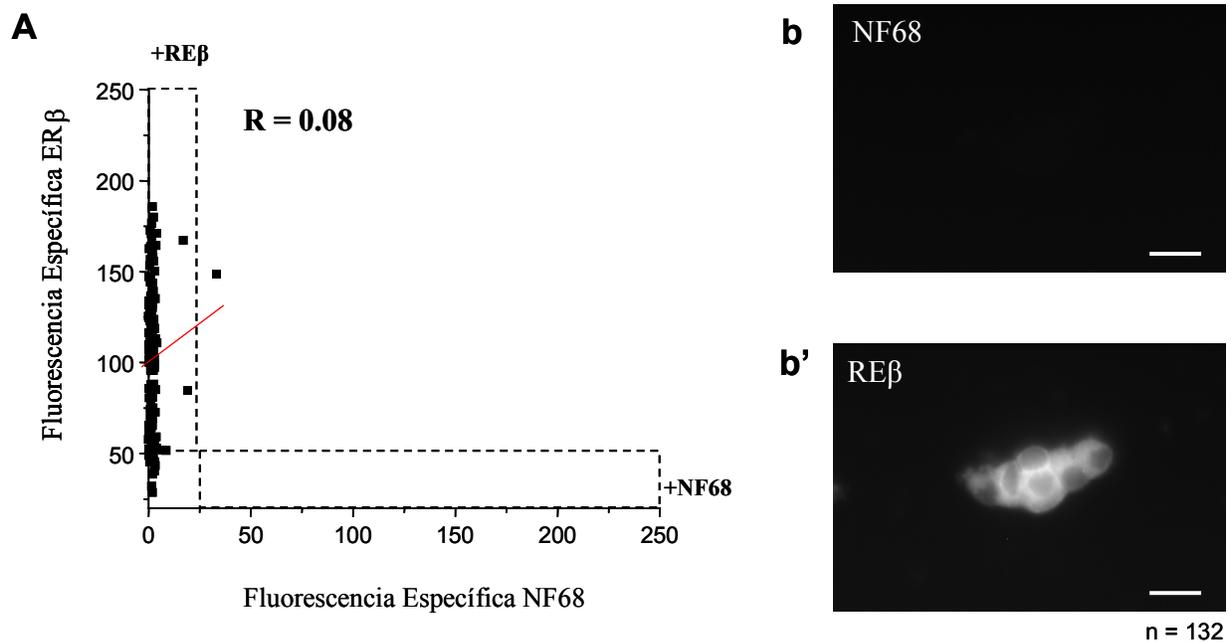


Figura 9. Expresión de RE β y NF68 en células del lóbulo intermedio de rata hembra. **A:** Gráfica de correlación entre la fluorescencia específica de NF68 y RE β . A la derecha se muestran imágenes representativas de los campos de células analizadas, **b:** inmunotinción contra NF68 y **b':** inmunotinción contra RE β . Las regiones delimitadas en los rectángulos punteados corresponden a células sólo positivas a NF68 o RE β , el cuadro pequeño en el origen corresponde a células sin expresión de NF68 y RE β (doble negativas), y el área grande afuera de los rectángulos corresponde a las células que expresan ambos NF68 y RE β (células doble positivas). La línea roja continua representa el ajuste lineal de los datos. Se observa el coeficiente de correlación (R) y el número de células analizadas (n). La barra indica 20 μ m.

Dado que en las células del lóbulo anterior de la glándula hipofisiaria de la hembra en estro se encontró una correlación entre la expresión de RE β y NF68 y que la expresión de NF68 se había reportado como sexualmente dimórfica, se decidió explorar como era dicha relación en el macho adulto, en donde los niveles de estrógenos circulantes son más bajos comparados con los de la hembra. Por tal motivo, en cultivos de células adenohipofisiarias de rata macho se realizó una doble inmunofluorescencia para ambos marcadores (Figura 10 A y a).

Los resultados de la Figura 10A muestran que al igual que en el lóbulo intermedio, las células de macho en su mayoría son positivas a RE β en diferente intensidad de inmunofluorescencia y la mayor parte son negativas a NF68 (8.4 % -RE β /-NF68, 90.8 % +RE β /-NF68, 0 % -RE β /+NF68 y 0.8 % +RE β /+NF68) (Figura 11). Cuando se calculó la correlación esta dio un valor bajo de 0.02.

Es decir, que en ambos casos (las células de LI y células adenohipofisiarias de rata macho), existen células positivas al RE β pero no positivas a NF68. Esto contrasta con la hembra en la cual las células adenohipofisiarias positivas a NF68 son en un alto porcentaje positivas al RE β .

Dado que se había reportado que en los machos castrados tratados con estradiol aumenta la expresión de NF68 (Fiordeliso et al. 2002), el siguiente paso de este estudio fue determinar si al manipular las concentraciones estrogénicas en machos cambia la relación entre RE β y NF68 y si con este tratamiento aumenta la correlación entre ambos marcadores. Para ello se realizaron cultivos primarios de células adenohipofisiarias de ratas macho orquidectomizados tratados con 17 β -estradiol y posteriormente una doble inmunocitoquímica para ambos marcadores (Figura 10 B y b).

Las células de macho orquidectomizado tratado con 17 β -Estradiol (Figura 10b) muestran un patrón de inmunomarcaje diferente a las células del orquidectomizado tratado con el vehículo (datos no mostrados) y al macho intacto (Figura 10a). En las células obtenidas de los machos tratados existe una marca muy fuerte en el núcleo celular.

Al realizar la comparación de la expresión (Figura 10 A y B), se observa que a diferencia del macho control y el tratado con el vehículo, en el macho tratado con estradiol aparecen células positivas a NF68 y como en la hembra, estas células en su mayoría son también positivas para el RE β (21.6 % +RE β /+NF68 y 0.4 % -RE β /+NF), se observan además muchas células únicamente positivas al receptor (64.3 % +RE β /-NF68) y algunas doble negativas (13.7 % -RE β /-NF) (Figura 11). Con el tratamiento con estradiol el coeficiente de correlación sube de R = 0.02 a 0.57.

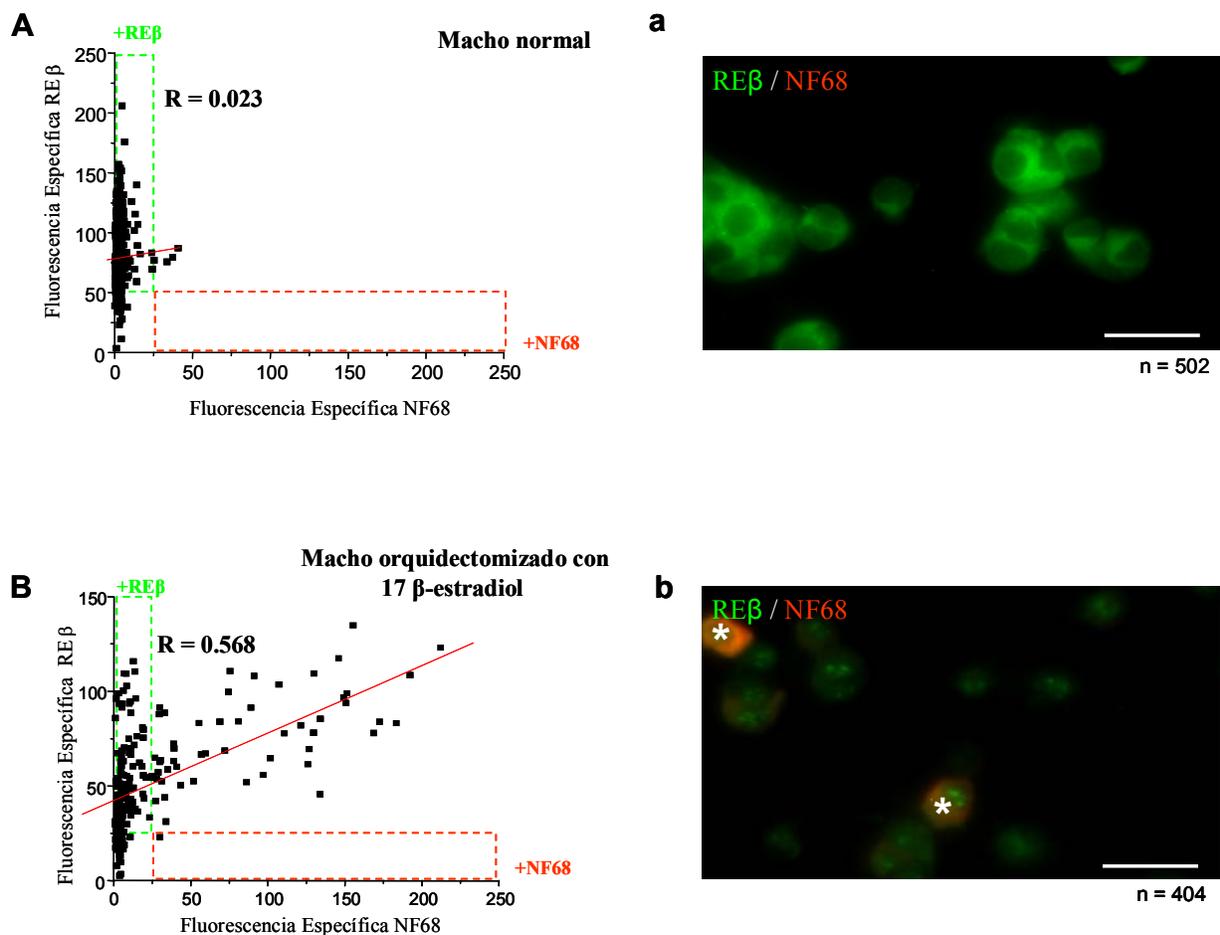


Figura 10. Expresión de RE β y NF68 en células adenohipofisarias de macho intacto y macho orquidectomizado tratado con estrógenos. **A:** Gráfica de correlación entre la fluorescencia específica de RE β y NF68 en células adenohipofisarias de rata macho intacto. **B:** Gráfica de correlación entre la fluorescencia específica de RE β y NF68 en células de macho orquidectomizado tratado con 17 β - estradiol, 20 μ g/100 g de peso. **a y b:** Ejemplos de las imágenes de doble inmunofluorescencia de las células que se analizaron en A y B respectivamente. Se muestra en verde la inmunotinción correspondiente a RE y en rojo la correspondiente al NF68; los asteriscos marcan células doble positivas. Las regiones delimitadas en los rectángulos punteados corresponden a células sólo positivas a NF68 (rojo) o a RE β (verde), el cuadro pequeño en el origen corresponde a células sin expresión de NF68 y RE β (doble negativas), y el área grande afuera de los rectángulos verde y rojo corresponde a las células que expresan ambos NF68 y RE β (células doble positivas). La línea roja continua representa el ajuste lineal de los datos. Se observa el coeficiente de correlación (R) y el número de células analizadas (n). La barra indica 20 μ m.

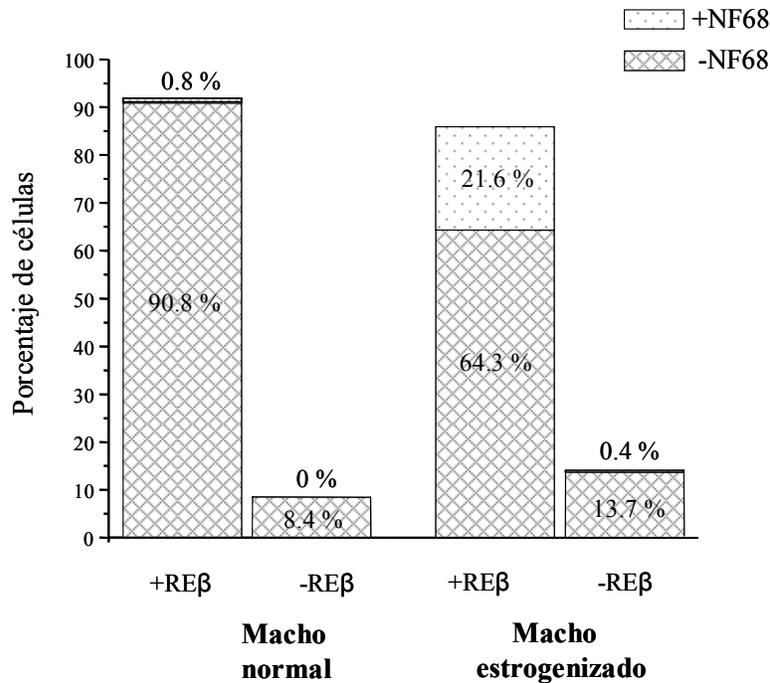


Figura 11. Gráfica de barras de los porcentajes de las células adenohipofisarias de rata macho normal y macho castrado con tratamiento de estrógenos, +REβ/+NF68 y +REβ/-NF68, -REβ/+NF68 y -REβ/-NF68. Se muestran los porcentajes de células positivas a REβ (barra izquierda) o negativas a REβ (barra derecha) del macho normal o macho estrogenizado, y cada barra se divide en los porcentajes de las células negativas o positivas a NF68.

Como se observa en los resultados anteriores y por los experimentos previos de Fiordelisiso y Hernández Cruz (2002 y 2006) en los cuales se concluye que la expresión de NF68 en adenohipófisis es dependiente de las hormonas estrogénicas, se puede pensar que la expresión de NF68 que presentan las células adenohipofisarias de rata se afecte directamente por el estradiol a través del REβ. Para comprobarlo inicialmente se realizó una inmunocitoquímica simple de NF68 en células adenohipofisarias en cultivo suplementado con 200 nM de 17 β- Estradiol durante 6 días consecutivos.

En la Figura 12 se observa la distribución de fluorescencia de NF68 en células adenohipofisarias de rata hembra. La expresión decae paulatinamente a partir de los primeros días de cultivo, aumentando las células poco positivas o sin expresión y disminuyendo las células

con alta expresión (más de 100 uaf), con lo cual la fluorescencia específica media en el primer día de cultivo de ser de 58.6 ± 4.1 (media y error estándar, Figura 12A), se redujo a 17.8 ± 0.6 a los 6 días de cultivo (Figura 12B) y a 14.8 ± 0.8 al día 12 de cultivo (Figura 12C). La adición de 200 nM de 17 β - estradiol de estradiol al medio de cultivo no modificó ni previno la pérdida de la expresión de NF68, ya que la fluorescencia específica media fue de 10.2 ± 0.8 (Figura 12D). Es decir, que en cultivo las células adenohipofisarias van perdiendo gradualmente la expresión de NF68, y el estradiol por si solo no es capaz de mantener la expresión del marcador neuronal.

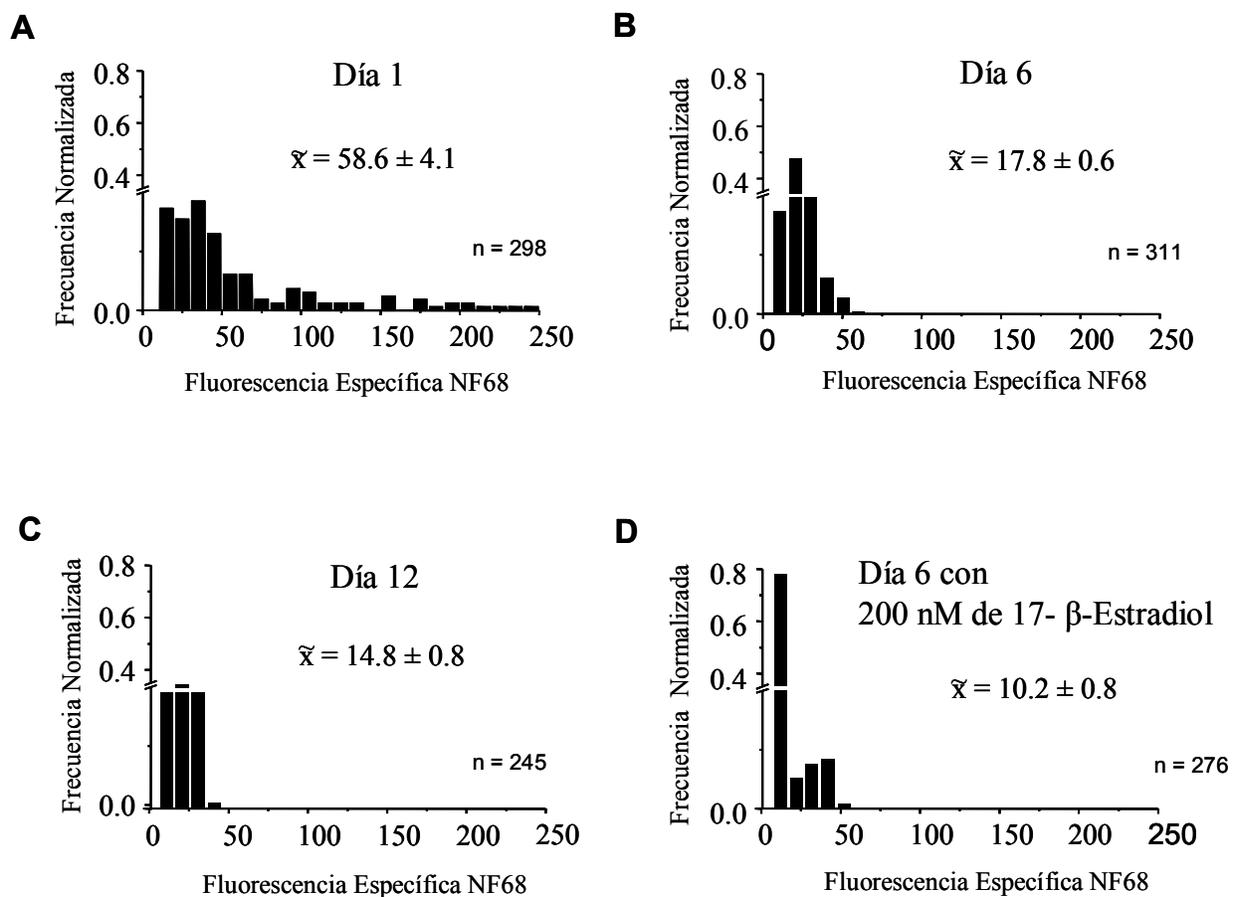


Figura 11. Histogramas de frecuencia que muestran la distribución de la fluorescencia específica de NF68 en células adenohipofisarias de rata hembra a lo largo de los días de cultivo. **A:** 1 día en cultivo, **B:** 6 días, **C:** 12 días, y **D:** 6 días con 200 nM de 17 β -estradiol. Se muestra en cada gráfica la media, el error estándar y el número de células analizadas.

Dado que se existe correlación entre la expresión del RE β y NF68, se analizó simultáneamente la expresión de ambos marcadores a lo largo de los días de cultivo para evaluar si una posible pérdida en la expresión del receptor pudiera explicar la falta de acción del estradiol en mantener la expresión de NF68 en cultivo.

Como se puede observar en las gráficas de la Figura 13 y Figura 14, la expresión de NF68 se pierde en el día 9, mientras que la expresión de RE β se pierde hasta el día 12. Para el día 4 de cultivo (Figura 13B), la cantidad de células doble positivas (+RE β /+NF68) disminuye de 45.1 % a 18.8 % y se incrementan las células sólo positivas a RE β (45.1 %), pero la expresión del receptor, es decir el total de células positivas al receptor (+RE β /+NF68 más +RE β /-NF68) disminuye de 86.6 % en el día 1 a 63.9 % en el día 4 de cultivo. En el día 9 (Figura 13C) se encuentran en su mayoría células sólo positivas a RE β (80.3 %) y en menor cantidad células doble positivas (6.2 %). Finalmente al día 12 (Figura 13D), las células son mayoritariamente negativas para ambos marcadores (78.3 % -RE β /-NF68) y las positivas al receptor (+RE β /-NF68 más +RE β /+NF68) disminuyeron de 86.5 a 21.7 %. En cuanto al coeficiente de correlación, al primer día se muestra un valor alto de 0.66 que va disminuyendo gradualmente hasta llegar a 0.42 en el día 12.

Estos resultados muestran que la expresión de NF68 decae más rápidamente con el tiempo de cultivo que el RE β . Sin embargo, la expresión del receptor de estrógenos también disminuye paulatinamente. Esto indicaría que el efecto del estradiol a través de este receptor se podría ver menguado antes de que la propia expresión del receptor disminuya.

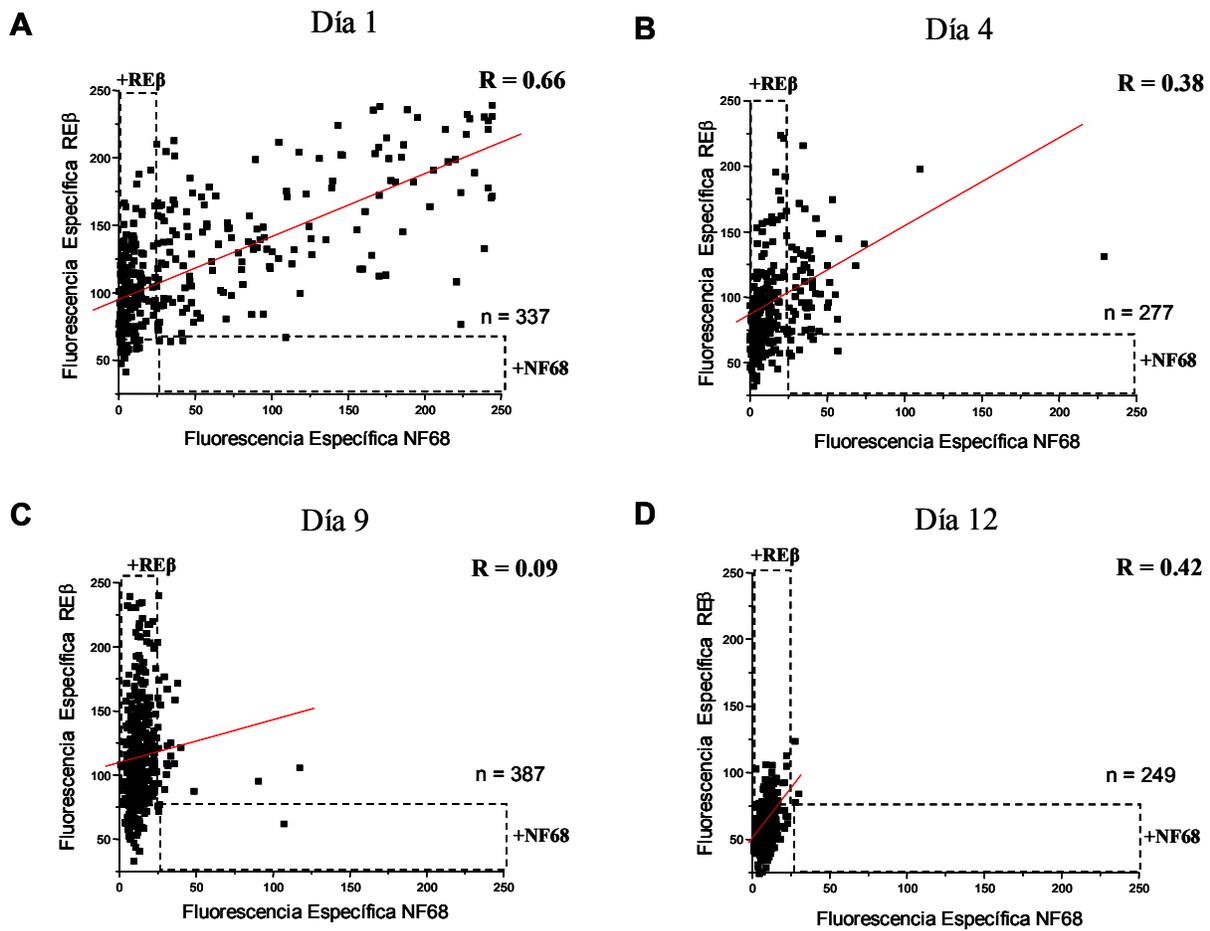


Figura 12. Gráficas de correlación de la expresión de RE β y NF68 a lo largo de los días de cultivo en células adenohipofisarias de rata hembra en estro. **A:** 1 día de cultivo, **B:** 4 días de cultivo, **C:** 9 días de cultivo y **D:** 12 días de cultivo. Las regiones delimitadas en los rectángulos punteados corresponden a células sólo positivas a NF68 o a RE β , el cuadro pequeño en el origen corresponde a células sin expresión de NF68 y RE β (doble negativas), y el área grande afuera de los rectángulos corresponde a las células que expresan ambos NF68 y RE β (células doble positivas). La línea roja continua representa el ajuste lineal de los datos. Se observa el coeficiente de correlación (R) y el número de células analizadas (n).

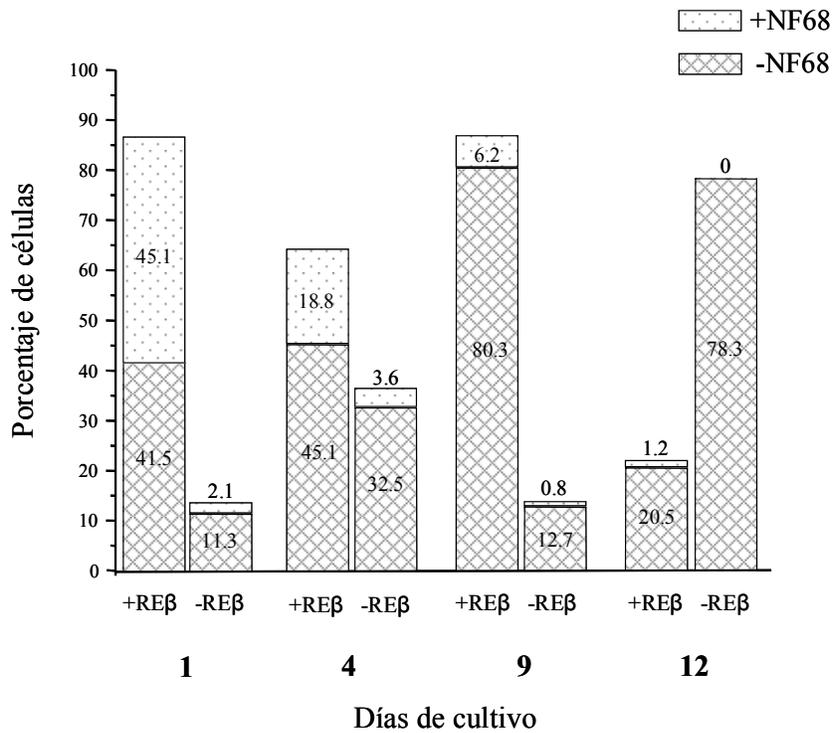


Figura 14. Gráfica de barras de los porcentajes de las células adenohipofisarias de rata hembra +REβ/+NF68 y +REβ/-NF68, -REβ/+NF68 y -REβ/-NF68 en los días de cultivo 1, 4, 9 y 12. Se muestran los porcentajes de células positivas a REβ (barra izquierda) o negativas a REβ (barra derecha) del macho normal o macho estrogenizado, y cada barra se divide en los porcentajes de las células negativas o positivas a NF68.

Finalmente, con el objeto de estudiar el efecto del estradiol sobre la expresión de REβ y NF68 se cultivaron células adenohipofisarias a lo largo del tiempo de cultivo, suplementado desde el primer día de cultivo con 200 nM de 17 β-Estradiol y se realizó una inmunocitoquímica doble.

En la Figura 15 y 16, se muestra la gráfica de expresión entre REβ y NF68. En el primer día de cultivo (Figura 15A), se observa que el 27.3 % de las células son positivas a NF68 y a REβ y que el total de células que expresan el receptor estrogénico (+REβ/+NF68 más +REβ/-NF68) es del 91.6 %; a los 4 días en cultivo, la población de células positivas a NF68 desaparece y la población de células +REβ/-NF se incrementa a un 90.5 % notándose que a este tiempo la

expresión del receptor estrogénico se mantiene estable. Finalmente, a diferencia de los datos obtenidos en los cultivos sin estradiol, al día 9 y 12 el porcentaje de células positivas al receptor (+RE β /+NF68 más +RE β /-NF68) se mantiene constante de 48.5 a 51.35 %. En contraste, el porcentaje de las células positivas a NF68 (+RE β /+NF68 más -RE β /+NF68) disminuye desde el día 4 con 1.2 %, pasando por el día 9 con 2.3 % y terminando al día 12 con 4.3 % (Figura 16).

Los resultados anteriores confirman que el estradiol no es capaz de mantener la expresión de NF68, en contraste con RE β que sí se mantiene su expresión en células adenohipofisarias en cultivo.

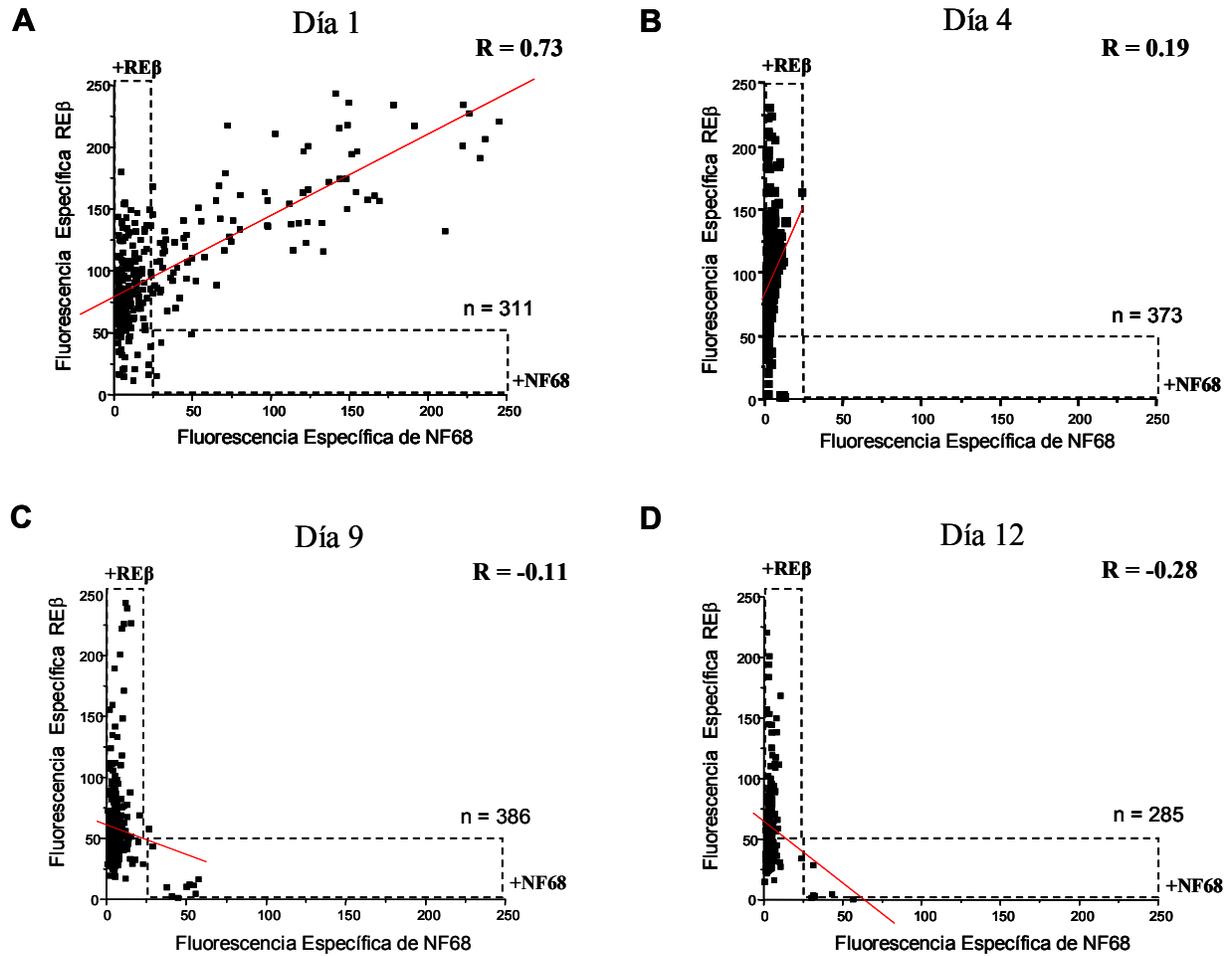


Figura 15. Gráficas de correlación de la expresión de RE β y NF68 con el tiempo de cultivo adicionado con 200 nM 17 β - Estradiol. a) 1 día de cultivo, b) 3 días de cultivo, c) 9 días de cultivo y d) 12 días de cultivo. Las regiones delimitadas en los rectángulos punteados corresponden a células sólo positivas a NF68 o a RE β , el cuadro pequeño en el origen corresponde a células sin expresión de NF68 y RE β (doble negativas), y el área grande afuera de los rectángulos corresponde a las células que expresan ambos NF68 y RE β (células doble positivas). La línea roja continua representa el ajuste lineal de los datos. Se observa el coeficiente de correlación (R) y el número de células analizadas (n).

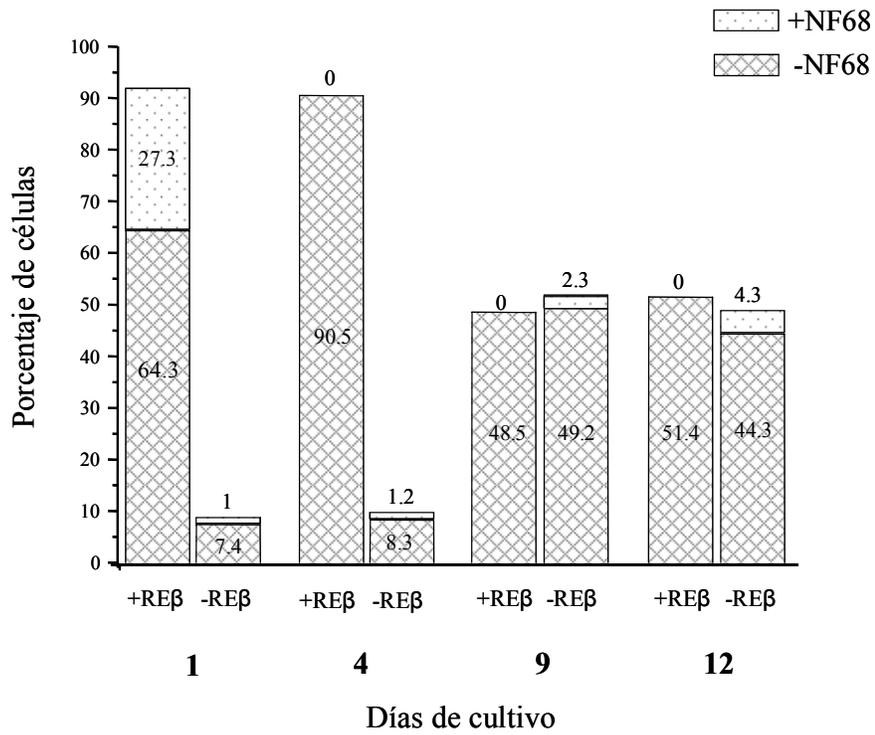


Figura 16. Gráfica de barras de los porcentajes de las células adenohipofisarias de rata hembra +REβ/+NF68 y +REβ/-NF68, -REβ/+NF68 y -REβ/-NF68 en los días de cultivo 1, 4, 9 y 12 suplementado con 200 nM de 17β-Estradiol. Se muestran los porcentajes de células positivas a REβ (barra izquierda) o negativas a REβ (barra derecha) del macho normal o macho estrogenizado, y cada barra se divide en los porcentajes de las células negativas o positivas a NF68.

DISCUSIÓN

1. La expresión de NF68 parece estar correlacionada con el receptor de estrógenos tipo beta que con el alfa

Si bien los dos receptores de estrógenos aquí estudiados tienen la misma afinidad para estradiol y activan a los mismos elementos de respuesta, difieren en los dominios de activación de transcripción genética, lo que sugiere distintos papeles fisiológicos (Gustafsson y Nilsson 2000, Shupnik 2002, Koehler et al. 2005). Este hecho se reafirma al estudiar la distribución específica en cada tejido que da como consecuencia un repertorio de funciones biológicas distintas para cada receptor.

En estudios con ratones *knockout*, con depleción del gen para la proteína de RE α (RE α KO) o RE β (RE β KO) han tratado de dilucidar el funcionamiento de cada uno de los receptores (Curtis et al. 2000). En estos estudios, se observó que en ambos sexos los ratones homocigotos RE α KO son infértiles, la hembra tiene un tejido uterino inmaduro y no es capaz de ovular y, el macho presenta un conteo de espermatozoides bajo, comportamiento sexual anormal, así como degeneración en el epitelio seminífero. En cambio, los ratones RE β KO son capaces de reproducirse aunque con una fertilidad reducida y sus camadas son pequeñas comparadas con el control (Korach 1994, Curtis et al. 2000, Hewitt y Korach 2003). Por otra parte, el fenotipo el doble *knockout* de RE (RE $\alpha\beta$ KO) es parecido al RE α KO (Couse et al. 1999) lo que indica que los cambios producidos por la falta del receptor tipo alfa son dominantes. Por lo anterior se sugiere que el RE α es indispensable para la reproducción en tanto que el RE β juega un papel fisiológico también importante, pero diferente.

Con base en su distribución, se ha propuesto que el RE β juega un papel neuroendócrino, ya que es el principal RE ampliamente distribuido en el cerebro, en áreas como corteza cerebral, hipocampo, núcleo olfativo anterior, cerebelo, sustancia negra, entre otros (Shughrue y Merchenthaler 2001). Estas regiones incluyen importantes fuentes de inervación dopaminérgica y serotoninérgica que son reguladas por estradiol (Koch 1998). Igualmente reportes muestran evidencias de la expresión de RE β en algunas subpoblaciones neuropeptidérgicas, tales como

porciones de los núcleos paraventricular y supraóptico productores de oxitocina, vasopresina, PRL de 23kDa, CRH (hormona liberadora de corticotropina), entre otros, que son conocidas por ser componentes en la interacción entre el sistema endocrino y nervioso (Bodo y Rissman 2006).

El hecho de que la expresión del marcador neuronal NF68 muestre un alto grado de correlación con la expresión del receptor estrogénico tipo β en células adenohipofisarias de rata hembra refuerza la idea planteada por otros autores del posible papel neuroendocrino que tiene este receptor y abre la posibilidad de explorar las características en cuanto al control de la expresión genética que podría tener en especial en las células hipofisarias.

2. El lóbulo intermedio expresa RE β pero carece de NF68

La falta de expresión de NF68 en el lóbulo intermedio de la hipófisis se reportó en los estudios de Fiordeliso y colaboradores en 2006, en los cuales encontraron que las células hipofisarias del linaje POMC no expresan NF68. En estos estudios se sugieren que la inmunoreactividad de NF68 está ligada a la expresión del receptor a estrógenos, y que la falta de expresión de NF68 en el linaje POMC podría deberse a una menor expresión del receptor a estrógenos.

Los reportes acerca de la distribución del RE β en el lóbulo intermedio de glándula pituitaria de rata son divergentes. En un trabajo no observa expresión de RE (Pelletier et al. 2000), mientras que en los de Shughrue et al. y Wilson et al. en 1998 concuerdan en que el RNAm de RE α es la isoforma predominante en el lóbulo anterior y difieren en la localización principal de RE β , el primero afirma que es en lóbulo intermedio y el segundo que en el lóbulo anterior. Por último el estudio del grupo encabezado por Mitchner et al. en 1998 reportó que el 43% de los melanotropos expresan el RNAm de RE α y sólo el 23% expresa el RE β . Un año después los mismos autores detectaron la proteína de RE β encontrándola distribuida en los dos lóbulos, resaltando que el 50% de células positivas a RE β en el lóbulo anterior (Mitchner et al 1999). Todos los trabajos concuerdan en que las células del lóbulo anterior e intermedio expresan ambos receptores, pero difieren en la cantidad de expresión. Basándose en los estudios del equipo

de Mitchner se apoya la hipótesis de que la falta de expresión de NF68 en el linaje POMC se debe a la pobre expresión del receptor a estrógenos tipo β .

En este estudio encontramos por medio de técnicas de inmunofluorescencia una importante expresión del receptor tipo alfa en la mayoría (95%) de las células hipofisarias y en un menor grado (50%) la expresión del receptor tipo beta. Las diferencias en cuanto a la expresión de estos receptores en los diferentes estudios en este podrían deberse a la fase del ciclo reproductor en la cual se encuentran las ratas hembra. En nuestro estudio escogimos trabajar con ratas hembras en estro ya que anteriormente se demostró que es la fase del ciclo en la cual se encuentra el mayor número de células positivas a NF68.

Sin embargo, en este estudio encontramos que aunque cerca del 89% de las células del lóbulo intermedio expresan RE β no expresan NF68. Este hecho estaría sugiriendo que en estas células faltan otras señales, cofactores u otros elementos que hacen que ellas no expresen el marcador neuronal.

Cabe destacar que las células del lóbulo intermedio en la rata hembra no están sometidas periódicamente a las elevaciones de la concentración de estradiol como las del lóbulo anterior.

3. El tratamiento con estradiol aumenta la expresión de NF68 en la células adenohipofisarias de rata macho castrado.

Se sabe que las células adenohipofisarias de macho expresan el RNAm y la proteína de los dos receptores a estrógenos, el RE α está ampliamente distribuido en el lóbulo anterior y en menor cantidad el RE β principalmente en el 67% de los gonadotropos (Nishihara et al. 2000). Además, el patrón de expresión cambia durante el desarrollo, siendo los niveles de RNAm de RE α mayores que los de RE β en todas las etapas con excepción de la pre-pubertad (30 días de edad; Tena-Sempere et al. 2001 b, Nishihara et al. 2000).

A primera vista los reportes de que la expresión de RE β es mayor en etapas inmaduras (Nishihara et al. 2000) señalarían una contradicción con los trabajos de Fiordeliso y Hernández-

Cruz, donde se sugiere que la expresión de NF68 es mediada por hormonas estrogénicas a través de sus receptores y estos RE tendrían que correlacionarse también con los NF68 aumentando en el desarrollo. Sin embargo, cabe la posibilidad de que estas células sí sean capaces de expresar el marcador neuronal cuando son expuestas a estradiol o bien con la simple remoción de la testosterona circulante en los machos castrados.

Cuando en este estudio se castraron a machos sexualmente maduros, no se observaron diferencias significativas en la expresión de NF68 y RE β (datos no mostrados), indicando que la simple remoción de la fuente principal de testosterona no produce un cambio significativo en la expresión de estos marcadores. En cambio, en el macho que fue tratado con estradiol para aumentar la expresión de NF68, se observó que al parecer la expresión de este marcador neuronal aumenta en las células con expresión de RE β y no en las que carecen de éste receptor ya que como se muestra en la Figura 10 y 11 las células positivas a RE β (mayor de 25 uaf) del macho castrado y estrogenizado no sólo expresan el RE β como el macho normal sino que además esas células ahora expresan también NF68.

El hecho de que las células adenohipofisarias de macho expresen el RE β y que además tengan la potencialidad de expresar NF68, indica que esta expresión no sólo depende de la presencia local de estradiol cuya principal fuente en el macho es la aromatización local de testosterona, sino que requiere de niveles altos de la hormona circulantes, como en el caso de la hembra y en las manipulaciones de este trabajo donde los niveles circulantes de estradiol se elevan por la inyección de 17 β -estradiol.

4. Regulación del RE por el estradiol

Algunas de las diferencias observadas en la expresión de NF68 *in vivo* e *in vitro* se podrían deber no sólo a la concentración de estradiol a la que están expuestas las células, sino también a que los estrógenos pueden modular la expresión de sus propios receptores a través de la autorregulación de su ruta de señalamiento. Se ha reportado en varios trabajos, el incremento de los niveles de RNAm de TERP en respuesta a estrógenos (Mitchner et al. 1998, Friend et al

1995). Este receptor truncado ha sido propuesto como el intermediario entre la modulación de los estrógenos y los RE ya que es capaz de regular la actividad del dominio de activación de la transcripción del RE α y β . El RNAm de TERP cambia durante las diferentes etapas de desarrollo de la glándula pituitaria en ambos sexos. En etapas inmaduras, el TERP presenta una baja expresión, alcanza un nivel máximo en la vida adulta y el tratamiento con estrógenos incrementa dicha expresión en machos prepúberes (Tena-Sempere et al. 2001 a) y en adultos (Schreihofner et al. 2000 y Mitchner et al. 1998). De esta manera se piensa que la proporción entre los niveles de expresión de TERP y los receptores α y β podrían modular las respuestas transcripcionales reguladas por estrógenos en la glándula pituitaria.

Existen otras evidencias que sugieren que no solamente el TERP es regulado por estrógenos, sino también el RE β . El mismo grupo que no había observado variaciones de RE β *in vivo* (Mitchner et al. 1998) reporta en células GH₃, un línea celular de lactosomatotopos de rata, que los niveles de RNAm de TERP-1 y RE β aumentan por estrógenos de manera dependiente de la dosis y del tiempo (Mitchner et al. 1999). En otro trabajo se mostró que los niveles de TERP-1 y de RE β varían durante las fases del ciclo estral, en la mañana del proestro los niveles de RNAm de RE β decaen en un 40% comparado con los niveles del metaestro, y coinciden con un pico de expresión del TERP-1 (Schreihofner et al. 2000).

Estas diferencias en la expresión del receptor de estrógenos y su regulación por estradiol podrían ayudarnos a entender el retraso de unas 8 a 10 horas que se da en la expresión de NF68 (Fiordelisio y Hernández Cruz 2002) con respecto al pico de estradiol en el ciclo estral de la rata, ya que cuando este pico se produce, los niveles de RE β son bajos y se elevan posteriormente, produciéndose entonces un aumento en la expresión de NF68.

5. Pérdida de expresión de NF68 a lo largo del tiempo de cultivo

En los experimentos ilustrados en las figuras 13 y 15, se observó la pérdida de expresión de NF68 a lo largo del tiempo de cultivo, indicando que el mantenimiento de los neurofilamentos depende de factores que no se encuentran en el medio de cultivo. El análisis de la expresión de

NF68 y de RE β mostró una pérdida paulatina en la expresión de ambos y la presencia de 17 β -estradiol en el medio de cultivo es capaz de mantener la expresión de RE β pero no así de NF68. Estos resultados indican que el estradiol es necesario pero no suficiente para modificar la expresión NF68, al menos en cultivo. Podrían existir al menos dos posibilidades que explicaran esta pérdida de expresión de NF68 aún en presencia del receptor de estrógenos:

1.- Existe evidencia de acciones mitogénicas del estradiol en la glándula pituitaria son ejercidas por el incremento de la producción de factores de crecimiento locales, los que promueven la proliferación y diferenciación de los lactotrofos (Candolfi et al. 2006) y que comparten vías de segundos mensajeros con el estradiol, como la proteína cinasa A (PKA) y MAPK, que a su vez se ha reportado que miembros de esta familia enzimática participan en la fosforilación de NF (Yamakawa y Arita 2004).

2.- Finalmente, otra opción sería que el estradiol actuara 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 del ganglio dorsal en ratas hembras, en donde se coexpresan los receptores de RE y de TrkA para NGF (Scoville et al. 1997) resultando en la regulación diferencial y recíproca de la transcripción de los receptores por ambos ligandos. En este sentido, se sabe que un porcentaje alto de células adenohipofisarias 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 (Missale y Spano 1998) y cerca del 30% del lóbulo anterior muestra inmunoreactividad a NGF. Estos datos sugieren que algunas de estas células pueden ser blanco del estradiol y a su vez del NGF ya sea autócrina o parácrinamente y que la conjunción de estos dos elementos regulen la expresión de NF68. Futuros experimentos empleando NGF o el anticuerpo anti-NGF podrían ser utilizados para revelar esta incógnita.

CONCLUSIONES

La expresión de neurofilamentos parece estar relacionada con el receptor a estrógenos tipo beta ya que:

- Existe una correlación directa entre la expresión de RE β y NF68, a diferencia de la expresión de RE α y NF68 en donde no existe correlación significativa.
- Sólo en el caso de la expresión de RE β se observa que entre mayor es la expresión de NF68 mayor es la expresión también para el receptor

La presencia de RE β es una condición necesaria pero no suficiente para la expresión de NF68 ya que:

- Las células del lóbulo intermedio de hembra y las células adenohipofisarias de macho normal expresan el RE β en gran cantidad y pobre expresión de NF68.

La expresión del RE β y de NF68 se modifica en función de los niveles circulantes de 17 β -estradiol:

- La expresión de NF68 en las células adenohipofisarias de rata macho orquidectomizado e inyectado con 17 β -estradiol correlaciona con el RE β .

La presencia de estradiol es necesaria para la expresión de NF68 aunque no es el único factor que se necesita para modificar o mantener ésta expresión:

- La expresión de NF68 y el RE β disminuye con el tiempo de cultivo.
- La expresión de RE β se mantiene con la adición de 17 β - estradiol, pero no la expresión de NF68.

REFERENCIAS

Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts M, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 2000. Garland Science. Cuarta edición. EU. Capítulo 16 Citoesqueletum.

Amara JF, Dannies PS. 17 beta-Estradiol has a biphasic effect on gh cell growth. *Endocrinology*. 1983;112:1141-3

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.

Bagatell CJ, Dahl KD, Bremner WJ. The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estradiol. *J Androl*. 1994;15:15-21

Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 216: 473-482.

Bodo C, Rissman EF. New roles for estrogen receptor beta in behavior and neuroendocrinology. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2006; 27:217-232.

Candolfi M., Zaldivar V, Jaita G, Seilicovich A. Anterior pituitary cell renewal during the estrous cycle. *Front Horm Res*. 2006; 35:9-21. Review.

Ciocca DR, Roig LM. Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocr Rev*. 1995; 16:35-62.

Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*. 1999; 17:2328-2331.

Curtis HS, Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res*. 2000; 2:345-352.

Dubois PM, elAmraoui A, Heritier AG. Development and differentiation of the pituitary cell. *Microsc Res Tech*. 1997; 15:98-113. Review.

Dubois M, Lalonde R, Julián JP, Strazielle C. Mice with the deleted neurofilament of low-molecular-weight (*Nefl*) gene: 1.Effects on regional brain metabolism. *J Neuroscience Research*. 2005; 80:741-750. (a)

Dubois M, Lalonde R, Julián JP, Strazielle C. Mice with the deleted neurofilament of low-molecular-weight (*Nefl*) gene: 2.Effects on motor functions and spatial orientation. *J Neuroscience Research*. 2005; 80:751-758. (b)

Eagleson GW, Jenks BG, Van Overbeeke AP. The pituitary adrenocorticotropes originate from neural ridge tissue in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morph*. 1986; 95:1-14.

Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*. 2007; 148:3236-3245.

Fiordeliso T, Hernández-Cruz A. Oestrogen regulates neurofilament expression in a subset of anterior pituitary cell of adult female rat. *J Neuroendocrinol*. 2002; 14:411-424.

Fiordeliso T, Millan-Aldaco D, Hernandez-Cruz. Cell of propiomelanocortin lineage from rodent anterior pituitary lack sexually dimorphic expression of neurofilaments. *Neuroendocrinology*. 2006; 83:360-370.

Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev*. 1992; 13:129-145.

Friend KE, Ang LW, Shupnik MA. Estrogen regulates the expression of several different estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:4367-71.

Gartner L y Hiatt J. Texto Atlas de Histología. 2002. Mc-Graw-Hill Interamericana. pp 291.

Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of the nuclear receptors. *Pharmacol Rev*. 2006; 58: 685-704.

Griffin JE, Ojeda SR. Textbook of Endocrine Physiology. 1988. Oxford University Press. Capítulos 6, 7, 8 y 9.

Gollapudi L, Oblinger MM. Estrogen effects on neurite outgrowth and cytoskeletal gene expression in ERalpha-transfected PC12 cell lines. *Exp Neurol*. 2001; 171:308-16.

Gustafsson JA, Nilsson S. Estrogen receptor transcription and transactivation basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res*. 2000; 2:360-366.

Hall JM, Couse JF y Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 36869-36872.

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.

Hewitt SC, Korach KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptor alpha y beta in reproductive tissues. *Reproduction*. 2003;125:143-149.

- Jensen EV, Jacobsen HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec Prog Horm Res.* 1962;18: 387–414.
- Knobil E, Hotchkiss J. 1998. The physiology of the reproduction. Editado por Knobil E. y Neil J. Raven Pres. Capítulo 46.
- Koch M. Sensorimotor gating changes across the estrous cycle in female rats. *Physiol Behav.* 1998; 64:625-628.
- Kriz J, Zhu Q, Julien JP, Padjen AL. Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain Research.* 2000; 885:32-34.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:5925-30.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997;138: 863-70.
- Koch M. Sensorimotor gating changes across the estrous cycle in female rats. *Physiol Behav.* 1998; 64:625-8.
- Koehler KF, Helguero LA, Haldosén LA, Warner M, Gustafsson JA. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev.* 2005; 26:465-78. Review.
- Korach KS. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science.* 1994; 266:1524-1527.
- Kushner PJ, Agart DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiao AK, Uht RM, Webb P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 74:311-317. Review.
- Liuzzi FJ, Scoville SA, Bufton SM. Effects of short-term estrogen replacement on trkA mRNA levels in axotomized dorsal root ganglion neurons. *Exp Neurol.* 1999;159:433-40.
- Manavathi B, Kumar R. Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin. *J Cell Physiol.* 2006; 207: 594-604. Review.
- McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev.* 1999; 20:279-307. Review.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 1999;20:321-44. Review.
- Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest.* 2003; 112:1603-1618.

Missale C, Spano P. Nerve growth factor in pituitary development and pituitary tumors. *Front Neuroendocrinol.* 1998;19:128-150. Review.

Mitchner NA, Garlick C, Ben-Jonathan. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology.* 1998. 139: 3976-3983.

Mitchner NA, Garlick C, Steinmetz RW, Ben-Jonathan N. Differential regulation and action of estrogen receptors alpha and beta in GH3 cells. *Endocrinology.* 1999;140:2651-8.

Moguilevsky JA, Sciaffini O. Hipófisis. 1972. López librerías editores. Capítulos 1,2 y 3.

Mueller-Fahrnow A, Egner U. Ligand-binding domain of estrogen receptors. *Curr Opin Biotechnol.* 1999;10:550-6. Review.

Nishihara E, Nagayama Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, Yamashita S, Koji T. Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor alpha and beta in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry. *Endocrinology.* 2000;141:615-20.

Ogawa A, Sugihara S, Hasegawa M, Nakazato Y, Kawada T, Ishiuchi S, Tamura M. Intermediate filament expression in pituitary adenomas. *Virchows Archiv B Cell Pathol.* 1990; 58:341-349.

Pelletier G. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol.* 2000;15:1261-70.

Pelletier G, Labrie C, Labrie F. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol.* 2000;165:359-370.

Saland LC. The mammalian pituitary intermediate lobe: An update on innervations and regulation. *Brain Res Bull.* 2001; 54:587-593. Review.

Sanchez M, Sauvé K, Picard N, Tremblay A. The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem.* 2007; 282:4830-4840.

Schreihof DA, Stoler MH, Shupnik MA. Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ER alpha protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology.* 2000;141:2174-2184.

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.

Senda T, Yamashita K, Okabe Toshio, Sugimoto N, Matsuda M. Intergranular bridges in the anterior pituitary cell and their possible involvement in Ca²⁺-induced granule-granule fusion. *Cell tissue Res.* 1998; 292: 513-519.

Sheng HZ, Westphal H. Early steps in pituitary organogenesis. *Trends Genet.* 1999;15:236 -240.

Shughrue PJ, Lane MV, Scrimo PJ, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids*. 1998; 63:498-504.

Shughrue PJ, Merchenthaler I. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 2001;436:64-81.

Shupnik MA. Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis. *J Neuroendocrinol*. 2002;14:85-94. Review.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*. 1975; 96:219-226.

Takor TT, Pearse AG. Neuroectodermal origin of avian hypothalamo-hypophyseal complex: the role of the ventral neural ridge. *J Embryo Exp Morphol*. 1975; 34:311-325.

Tena-Sempere M, Barreiro ML, González LC, Pinilla L, Aguilar E. Differential neonatal imprinting and regulation by estrogen of estrogen receptor subtypes alpha and beta and of the truncated estrogen receptor product (TERP-1) mRNA expression in the male rat pituitary. *Neuroendocrinology*. 2001;74:347-58. (a)

Tena-Sempere M, González LC, Pinilla L, Huhtaniemi I, Aguilar E. Neonatal imprinting and regulation of estrogen receptor alpha and beta mRNA expression by estrogen in the pituitary and hypothalamus of the male rat. *Neuroendocrinology*. 2001;73:12-25. (b)

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.

Topalli I, Etgen AM. Insulin-like growth factor-1 receptor and estrogen receptor crosstalk mediates hormone-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Research*. 2004; 1030:116-124.

Toran-Allerand CD, Sing M, Setalo G Jr. Novel Mechanism of Estrogen Action in the Brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol*. 1999. 20: 97-121. Review.

Wilson ME, Price RH Jr, Handa RJ. Estrogen receptor beta messenger ribonucleic acid expression in the pituitary gland. *Endocrinology*. 1998;139:5151-5156.

Thorner MO, Vance ML, Horvath E, Kovacs. The anterior pituitary. Capítulo 6. En: Williams JP, Foster. Textbook of Endocrinology. 1992. 8 edición.

Yamakawa K and Arita J. Cross talk between the estrogen receptor-, protein kinase A- and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling pathways in the regulation of proliferation in primary culture. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 88:123-130.

Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH. Cells of anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38: 1441-1449. Review.

Zhang Z, Casey DM, Julián JP, Xu Z. Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit L. *J Comparative Neurol.* 2002; 450:144-152.