

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

"RESPUESTA SECRETORA A LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS POR
LA HIPOFISIS ANTERIOR AISLADA DE RATAS MACHO DURANTE EL DESARROLLO
POSTNATAL: DE LA ETAPA INFANTIL A LA ADULTA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G O

PRESENTA

JAVIER BELLO PINEDA

ASESORA DE TESIS: MARIA EUGENIA MENDOZA GARRIDO

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICO ESTE TRABAJO CON CARIÑO

A MI MADRE:

POR TODO SU AMOR Y APOYO INCONDICIONAL

A MI PADRE:

POR TODO LO QUE ME HA ENSEÑADO DE LA
VIDA .

A MIS HERMANOS:

DE LOS QUE SIEMPRE HE TENIDO EL APOYO
Y EL MEJOR DE LOS CONSEJOS

A MIS SOBRINOS:

POR TODOS LOS MOMENTOS GRATOS QUE
SIEMPRE COMPARTIMOS

A MIS AMIGOS:

A QUIENES RECURRO SIEMPRE EN BUSCA DE
SU SONRISA Y APOYO

A TODOS MIS MAESTROS:

POR QUE SIEMPRE HAN SIDO EL MAS
HONESTO EJEMPLO A SEGUIR

AGRADEZCO DE MANERA MUY ESPECIAL A LA DRA. MARIA EUGENIA MENDOZA GARRIDO, MI ASESORA, POR TODAS SUS ENSEÑANZAS, SU APOYO Y COMPRESION EN LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO PERO PRINCIPALMENTE POR SER UNA DE LAS PERSONAS MAS HUMANA, JUSTA Y ADMIRABLE QUE CONOZCO.

AGRADEZCO EN GRAN MANERA A LA DRA. MARTA C. ROMANO PARDO POR TODO LO QUE HE APRENDIDO DE ELLA Y POR SU GRAN APOYO A LO LARGO DE MI ESTANCIA EN SU LABORATORIO, SU EJEMPLO SIEMPRE SERA ALGO MUY VALIOSO PARA MI.

AGRADEZCO A TODOS MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO POR SU CORDIALIDAD, AYUDA Y TODOS LOS MOMENTOS QUE HEMOS PASADO: JORGE, PATRICIA, DOLORES, CAROLINA, ARMANDO, JESUS, RICARDO, MANUEL, MARTHA, CLAUDIA, CARMEN Y ZEIDE.

AGRADEZCO A MIS GRANDES AMIGOS Y COMPAÑEROS DE LA CARRERA: JORGE HERRERA, ALEJANDRO ZARATE, JORGE MORALES Y GUSTAVO GUZMAN, POR QUE HEMOS COMPARTIDO TANTOS SUEÑOS, PENAS Y ALEGRIAS.

AGRADEZCO A MIS AMIGOS :CRISTY MORENO Y ALEJANDRO AGUILAR POR QUE SE QUE EN ELLOS SIEMPRE TENGO UNA MANO Y UNA SONRISA SINCERA.

AGRADEZCO AL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA, BIOFISICA Y NEUROCIENCIAS DEL CINVESTAV IPN, POR TODO EL APOYO PARA LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.

AGRADEZCO A LA UNIDAD DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DEL CINVESTAV IPN, POR SU COLABORACION AL TOMAR LAS FOTOGRAFIAS QUE SE PRESENTAN EN ESTA TESIS.

AGRADEZCO AL DR. JOSUE GARZA, POR LA DONACION DE LA HORMONA GnRH Y EL 2₀ ANTICUERPO INDISPENSABLES EN ESTE TRABAJO.

AGRADEZCO AL DR. VICTOR TSUTSUMI POR SU AYUDA EN EL ANALISIS DE LOS CORTES HISTOLOGICOS Y A LA SRA. BIFANO POR SU AYUDA EN LA PREPARACION DE LOS MISMOS.

AGRADEZCO A MIS SINODALES POR SUS CONSEJOS Y EXPERIENCIA.

INDICE

Pag.

INTRODUCCION

La Hipófisis.....	1
Hormonas liberadoras de hormonas hipofisarias.....	5
Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH).....	7
Las Gonadotropinas.....	10
Interacción hipotálamo -hipófisis-testículo.....	11
Durante el Desarrollo postnatal.....	11
Objetivo.....	15

METODOLOGIA

Obtención de la hipófisis.....	16
Incubación de la hipófisis.....	16
Radioinmunoanálisis (RIA).....	19
Análisis de Proteínas Totales.....	20
Análisis Estadístico.....	20

RESULTADOS

Análisis de resultados.....	22
-----------------------------	----

DISCUSION

Discusión y conclusiones.....	43
Conclusiones.....	50

BIBLIOGRAFIA

Citas de autores.....	52
-----------------------	----

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

La hipófisis.

La hipófisis ha sido denominada "glándula maestra" debido a la gran cantidad de hormonas que secreta y la multitud de procesos en que éstas se encuentran involucradas. Se localiza en la base del cerebro, dentro de la cavidad osea del hueso esfenoides denominada silla turca (Fig.1). Consiste en dos subdivisiones mayores, el lóbulo anterior (adenohipófisis) y el lóbulo posterior (neurohipófisis), y en el caso de los roedores se encuentran separadas por la hipófisis intermedia. Estos lóbulos provienen de distintos procesos embrionarios. El lóbulo posterior que se constituye de tejido nervioso y está conectado directamente con el hipotálamo, se deriva del piso del diencéfalo por evaginación, mientras el lóbulo anterior se deriva de una invaginación del Estomodeo (futura orofaringe Fig.2) (Harris y Donovan, 66). Este último no contiene fibras nerviosas y de hecho no se encuentra en contacto neuronal directo con el encéfalo, se conecta con él a través del sistema vascular portal hipotálamo-hipofisiario, por el cual circula el aporte sanguíneo para la hipófisis previo a su paso por el hipotálamo. De este modo la sangre previamente ha bañado y captado los productos provenientes de la eminencia media, una región rica en

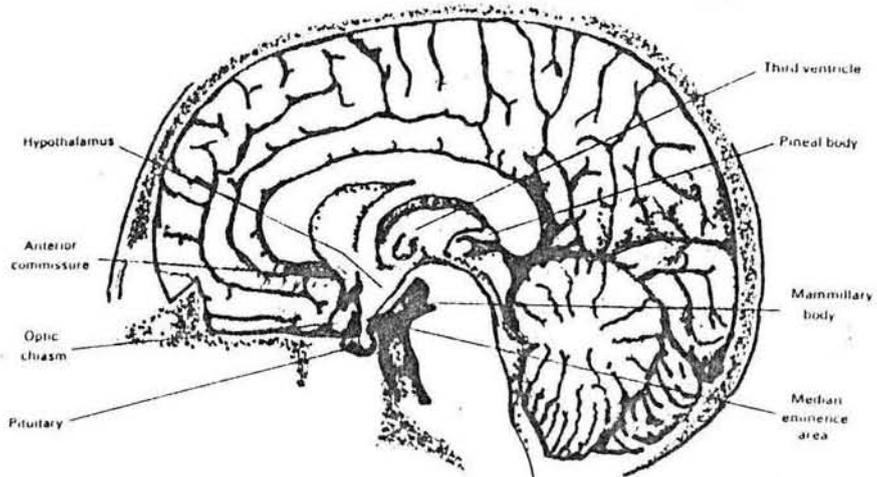


Figura 1. Vista lateral del cerebro mostrando las relaciones de la glándula hipofísis y el hipotálamo.

terminales nerviosas del hipotálamo (Harris y Donovan, 66).

La hipofísis anterior se divide en tres secciones denominadas: pars distalis, pars tubularis y pars intermedia.

El pars distalis ocupa la mayor parte de la glándula y se

encuentra muy cerca a los capilares fenestrados del plexo secundario del sistema portal hipofisiario. El *pars intermedia* separa el *pars distalis* de la hipófisis posterior. El *pars tubularis* se sitúa dorsalmente a los anteriores (Fig.3) La anterohipófisis se compone por distintos tipos celulares, clasificados de acuerdo a sus características de tinción histoquímica, determinada por su afinidad a los colorantes, de este modo las células pueden ser acidófilas, basófilas o cromóforas (Lentz 71). Las células productoras de tirotropina (TSH) que estimula la liberación de hormonas tiroideas, se localizan en el *pars distalis*, son células basófilas que presentan gránulos de secreción pequeños de 120-200 nm; las gonadotropas productoras de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), también son células basófilas localizadas en el *pars distalis* y se observan con gránulos de secreción de 200-250 nm, estas hormonas, juegan un papel muy importante en los procesos reproductivos y de regulación gonadal; las células productoras de corticotropina (ACTH), uno de los mediadores principales en la respuesta al stress al actuar sobre las adrenales estimulando la producción de glucocorticoides, se localizan en el *pars distalis* y *pars intermedia*, son altamente basófilas con gránulos de 100-200 nm; los melanótopos productores de melanotropina (MSH), se localizan en el *pars distalis* y lóbulo intermedio, son basófilos débiles con gránulos de 200-300 nm, la melanotropina juega un papel primordial en la reacción de oscurecimiento de

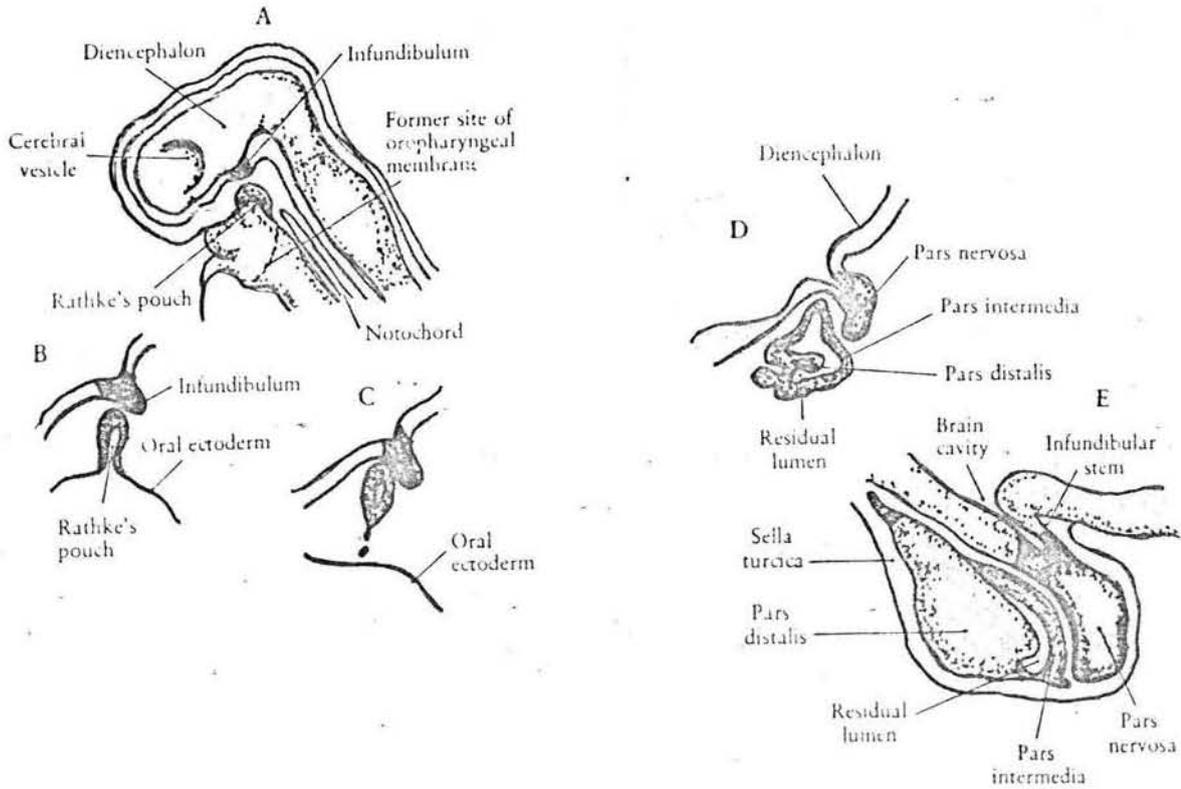


Figura 2. Se observa el proceso embriológico en el desarrollo de la hipófisis.

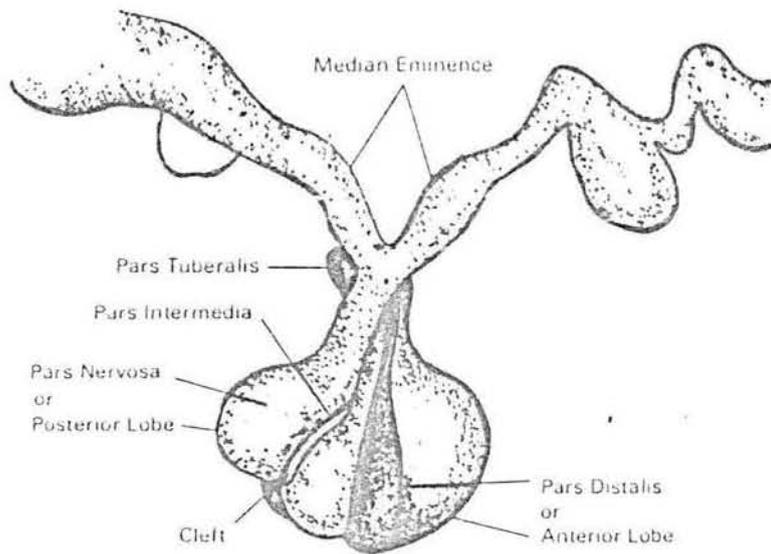


Figura 3. Se observa la hipófisis y sus estructuras componentes.

la piel; la somatotropina u hormona del crecimiento (GH), se produce por células acidófilas del *pars distalis* que presentan gránulos de 300-400 nm; la prolactina (PRL), que tiene un papel importante en respuesta al stress pero principalmente en la producción de leche durante la lactancia es producida por células acidófilas del *pars distalis*, con gránulos de 300-400 nm; El *pars distalis* posee hasta un 35% de células acidófilas conteniendo GH y PRL y entre 10-15% de células basófilas que contienen LH, FSH, TSH y ACTH, las células restantes son células cromóforas, correspondientes a células folículoestelares (Tixier- Vidal, 75).

La síntesis de estas hormonas peptídicas, ocurre en los ribosomas, son transportadas a través del retículo endoplásmico rugoso y concentradas en el complejo de Golgi donde posteriormente se engloban en gránulos de secreción para después ser liberadas por exocitosis bajo la acción de las hormonas liberadoras (Fink, 88).

Hormonas liberadoras de hormonas hipofisarias.

Las señales para que las hormonas hipofisarias sean exocitadas provienen del hipotálamo y son las denominadas hormonas liberadoras. Estas hormonas liberadoras son producidas en varias regiones del hipotálamo, el cual se localiza por debajo del tercer ventrículo y se encuentra íntimamente ligado a la hipófisis a través de la eminencia

media situada en la región más rostral (Fig.3). El hipotálamo es una estructura del diencéfalo o segunda división del encéfalo embionario . El hipotálamo esta compuesto por el *tuber cinereum*, el infundíbulo, la región mamilar y la hipófisis posterior (Krieger y Hughes, 80) (Fig.3).

Las hormonas liberadoras producidas en el hipotálamo, controlan la secreción de hormonas por las células de la hipófisis anterior (Krieger y Hughes, 80): la hormona liberadora de tirotropina (TRH) actúa sobre las células productoras de TSH y PRL estimulando su secreción; la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) estimula la producción y liberación de LH y FSH; la hormona liberadora de corticotropina (CRH) estimula la producción y liberación de ACTH. Algunas células hipofisiarias son reguladas a través del hipotálamo por señales estimulatorias e inhibitorias. Este es el caso de las células somatótropas y lactótropas. Las células somatotropas están reguladas por la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GRH) y la hormona inhibitoria de la liberación de hormona de crecimiento (GIH, somatostatina), y los lactótropos están reguladas por el factor liberador de prolactina (PRF) y el factor inhibidor de la liberación de prolactina (PIF) que junto con la dopamina inhiben la secreción tónica de la hormona (Negro-Vilar, 88).

Las hormonas liberadoras son sintetizadas en los somas neuronales y transportadas por los axones a las terminales nerviosas hipotalámicas donde se liberan a señales

específicas. Estas neuronas son centros de integración, donde reciben señales para la secreción hormonal a partir de neuronas aminérgicas, colinérgicas y peptidérgicas provenientes de varios sitios superiores del cerebro. La regulación de la secreción de estas neuronas se puede dar a varios niveles, en primer término a nivel del cuerpo neuronal; por señales neuroquímicas, como pueden ser neurotransmisores y neuromoduladores, que determinan la producción de las hormonas. Posteriormente las aferencias sinápticas provenientes de la red neuronal determinan el momento de la secreción de estas hormonas, que ya liberadas pasan via los capilares fenestrados hacia el sistema portal que las lleva hasta la hipófisis anterior. Las hormonas se unen a receptores específicos de membrana de las células hipófisiarias, provocando la liberación o inhibición de la secreción de estas células a la circulación general (Negro-Vilar, 88).

Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

La GnRH es un decapeptido cuya estructura ha sido identificada y corresponde a la siguiente secuencia de amino ácidos: GLN-HIS-TRP-SER-TYR-GLY-LEU-ARG-PRO-GLY. Esta hormona actúa sobre las gonadotropas, estimulando la liberación de LH y FSH, a través de su unión con receptores específicos. Se conoce que ambas gonadotropinas son producidas por el mismo tipo de célula aunque algunas gonadotropas producen solo una

de las dos (Conn, 86).

La modulación de la producción y liberación de GnRH se atribuye a distintos sistemas de neurotransmisores tales como noradrenalina , dopamina , serotonina , acetilcolina , neuropéptido Y , ácido gamma amino butírico , prostaglandina E2 , ácido 12 hidroxieicosatetraenoico, leucotrieno C4 , hormona liberadora de corticotropina , oxitocina , péptidos opioides endógenos , prolactina , y la misma GnRH. Todos estos actúan ya sea estimulando o disminuyendo la liberación de GnRH (Negro-Vilar, 88). Los esteroides gonadales regulan la actividad de las diferentes redes neuronales que participan en el control de la secreción de la GnRH. En el caso de la neurona secretora de GnRH no se le ha podido identificar receptores a los esteroides sexuales por lo que estos llevan a cabo su regulación a través de las aferencias neuronales (Langub, 91, Lehman, 93). La participación de los esteroides sexuales en la secreción de la GnRH es muy prominente. Es bien conocido que de castrar al animal adulto, se observa un incremento en los niveles séricos de gonadotropinas debido a un aumento hipotalámico de la GnRH. Estos niveles elevados de gonadotropinas pueden ser normalizados por esteroides gonadales, suero antiGnRH o lesión hipotalámica (Swerdloff, 71; Kamberi, 72; Ketelslegers, 78; Junier, 92).

En cuanto a la participación de la GnRH sobre la hipófisis se sabe que esta regula el número de receptores a sí misma en las células gonadotropas y por lo tanto la capacidad

de respuesta hipofisiaria a su estímulo (Fink, 88). En ratas adultas la inyección de GnRH exógena incrementa la concentración de receptores a GnRH de modo dosis-dependiente (Duncan, 83).

En relación al modo de acción de la GnRH sobre la liberación de gonadotropinas se conoce que es un proceso calcio-dependiente (Hopkins y Walker ,78) que se ha propuesto como sigue; una vez que la GnRH alcanza los receptores de membrana localizados en las gonadotropas, estimula una rápida hidrólisis de los fosfoinosítidos debido a la activación de la fosfolipasa C (PLC) mediada por proteínas G (Gp-GTP) insensibles a la toxina pertussis. La rápida formación de inositol trifosfato (IP-3) provoca un incremento en la liberación de Ca^{++} interno del retículo endoplásmico (Berridge, 84) , lo cual en el caso de las gonadotropas lleva a una brusca liberación de LH (Catt, 89). También se ha planteado que la fuente de este Ca^{++} intracelular es un almacén de Ca^{++} asociado a la membrana plasmática (Jacobs, 88) denominado calciosoma (Volpe, 88). Además la elevación intracelular de Ca^{++} y el diacil glicerol (DG) formado por la hidrólisis del fosfatidil inositol, activan la traslocación de la proteincinasa C (PKC) del citoplasma a la membrana. La PKC activada fosforila substratos protéicos que a su vez activan la secreción y participan en la expresión de los genes de las gonadotropinas (Hirota, 85). Al mismo tiempo se observa una entrada masiva de Ca^{++} extracelular a través de canales

voltaje dependientes originándose un aumento prolongado de calcio en el citoplasma y una liberación continua de LH (Catt, 83). A la PKC también se la relaciona con la apertura de estos canales dependientes del voltaje (Naor, 90). En este proceso también se observa un aumento del ácido araquidónico (AA) y su producto el ácido eicosatetranoico (Naor, 90). El hecho de que varios segundos mensajeros estén envueltos en este proceso (IP_3 , Ca^{++} , DG, AA, HETE) hace al modo de acción de la GnRH muy particular (Conn, 79 y 86), pues difiere del esquema observado en otra serie de péptidos, por esto la GnRH sigue siendo tema de gran interés (Naor, 90).

Las gonadotropinas.

Las gonadotropinas LH y FSH, son glucoproteínas complejas, formadas por dos subunidades; α y β , la subunidad α , es común para la LH y FSH y también para TSH y la gonadotropina coriónica humana (hCG), pero la subunidad β difiere en cada una de las hormonas anteriores, confiriéndoles su especificidad biológica. Una vez que las gonadotropas secretan la LH y FSH, éstas hormonas viajan por la circulación general y actúan a nivel de ovario, en el caso de las hembras, y en testículo, en el caso de los machos. En estos últimos la LH estimula la producción de testosterona por las células de Leydig y la FSH actúa junto con la testosterona en las células de Sertoli sobre la espermatogénesis (Negro-

Vilar, 88).

Interacción hipotálamo - hipófisis - testículo.

El eje hipotálamo - hipófisis - gónadas ha sido bien establecido y las hormonas que intervienen en éste se han estudiado ampliamente (Fink, 88).

Durante el desarrollo postnatal.

El desarrollo postnatal de la rata macho se divide en etapa neonatal, del nacimiento a los 7 días de edad; infantil, del día 8 al 21; juvenil, del día 22 al 35, puberal que inicia hacia el día 36 y termina hacia el día 55 de edad cuando el animal alcanza la etapa adulta (Ojeda 88).

Varios estudios en ratas y otros roedores han confirmado que la hipofisectomía o el tratamiento con sueros anti-GnRH, nulifican la maduración de los testículos de manera permanente si se lleva a cabo en etapas tempranas de desarrollo posnatal (Bercu, 77, 82; Voguel, 83). También la neutralización de la LH y la FSH endógenas resulta en una disfunción de las células de Sertoli y una malformación de las mismas (Chemes, 79), por lo que se ha podido establecer que la presencia de las gonadotropinas hipofisiarias tienen un efecto trófico necesario para que los testículos puedan madurar (Lalau, 90). Se ha demostrado que el eje hipotálamo-hipófisis-

gónadas se encuentra bien establecido desde el nacimiento, ya que a esta edad la castración eleva los niveles séricos de gonadotropinas y la administración de andrógenos los disminuye a la normalidad (Goldman, 71; Swerdloff, 71; Negro-Vilar, 88; Grady, 86; Lalau, 90).

En ratas castradas de distintas edades se observa un aumento marcado en la GnRH hipotalámica que se ve reflejado en un incremento considerable en el número de receptores a la misma a nivel hipofisiario (Duncan, 83), aunque se ha planteado la duda si los sitios de unión a GnRH a nivel hipofisiario son siempre receptores funcionales ó receptores de reserva (Ojeda, 85). Como es bien conocido para algunos ligandos no se requiere una gran cantidad de receptores para obtener una respuesta máxima, lo que explica que no exista una relación directa entre la magnitud del estímulo con la GnRH y la respuesta de la hipófisis a la misma. Además, puede ser más importante la cantidad de gonadotropinas disponible para su liberación dentro de los gonadotropos que la cantidad de receptores activados en la respuesta secretora de la hipófisis a la GnRH (Fink, 88).

Existe evidencia de la presencia de GnRH en el hipotálamo fetal desde los 12 días de gestación y posiblemente a esta edad tal hormona ya ejerza sus efectos sobre la hipófisis (Chiappa, 77; Aubert, 85).

El contenido hipotalámico de GnRH se incrementa desde el nacimiento hasta la etapa juvenil de una manera constante

(Araki, 75; Ojeda, 88). Así también el contenido de receptores hipofisiarios a GnRH aumenta hasta la etapa adulta alcanzando un máximo hacia el día 15 de edad, que coincide con una mayor proporción de gonadotropas en la hipófisis (Ojeda, 77; Duncan, 83). Por otra parte ha sido documentado que la GnRH aumenta la sensibilidad de la anterohipófisis a sí misma, ya que al ser estimuladas con GnRH, las hipófisis respondieron siempre de una manera más marcada al segundo o tercer estímulo que al primero (Fink, 88).

Durante la etapa infantil, el patrón de secreción de GnRH es en descargas discontinuas que se ve reflejado en una secreción similar de LH y FSH (Ojeda, 88).

Durante el desarrollo postnatal de la rata existen variaciones en los niveles séricos de LH y FSH. En el macho tanto los niveles de LH y FSH se mantienen en niveles bajos durante todo el período prepuberl con algunas pequeñas variaciones y se elevan en el período puberal, mientras que en la hembra los patrones de secreción de LH muestran un pico entre los días 10-20 de edad y un aumento muy marcado de FSH hacia el día 17 (Döhler y Wuttke, 75).

La secreción de FSH se ve regulada por un factor distinto a los que pueden regular a la LH, como es la inhibina, un péptido gonadal que actúa para disminuir la secreción exclusivamente de FSH (Ojeda, 88). En los machos ésta es funcional en los primeros días de vida y va dejando de serlo con el crecimiento, mientras en la hembra el sistema

dependiente de inhibina se desarrolla hacia los 20 días de edad y continúa hasta la edad adulta (Becú-Villalobos, 90).

En relación con las hormonas esteroides, estas varían durante el desarrollo postnatal modulando los niveles de gonadotropinas. La progesterona se mantiene en niveles bajos durante las dos primeras semanas de vida y se incrementa posteriormente, siendo siempre mayores los niveles en hembras que en machos. Por otra parte, los niveles de testosterona se mantienen siempre bajos en las hembras mientras en los machos se incrementan desde el nacimiento hasta el día 19, y después declinan durante el periodo juvenil, para elevarse nuevamente en la etapa puberal (Döhler y Wuttke, 75). En la rata macho el desarrollo puberal ocurre entre los 36-55 días de vida, en este período la testosterona aumenta al doble y la maduración espermática se completa. Aparentemente en esta edad la testosterona deprime en menor escala la secreción de LH y FSH ya que estas se mantienen estables mientras la testosterona aumenta. Esto también se observa en las ratas adultas castradas, en las que se requieren mayores concentraciones de testosterona, que en prepúberes, para prevenir el incremento agudo de gonadotropinas, mostrando una menor sensibilidad a la testosterona conforme el animal alcanza su madurez (Matsumoto, 86).

De acuerdo a la información mencionada anteriormente, durante el desarrollo las variaciones en el contenido hipotalámico de la GnRH no permiten establecer una relación

directa de ella con las fluctuaciones séricas de las gonadotropinas presentes en toda esta etapa, por lo que en el presente trabajo se pretende determinar si durante los diferentes períodos del desarrollo postnatal las células gonadotropas hipofisiarias presentan cambios en la sensibilidad a la GnRH, por lo que nos interesó estudiar la respuesta a distintas dosis de GnRH por la adenohipófisis de ratas macho "in vitro", durante distintas etapas del desarrollo postnatal y así poder observar el efecto de la GnRH de manera particular.

Objetivo.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la respuesta a la GnRH por adenohipófisis de ratas macho en diferentes etapas de su desarrollo postnatal (infantil, juvenil, puber y adulto) y así observar si existen cambios en la sensibilidad a la GnRH en estas etapas. Esto nos ayudará a comprender las variaciones tan importantes que han sido anteriormente descritas.

METODOLOGIA

Obtención de las hipófisis.

Se utilizaron ratas macho de la raza Wistar las cuales se encontraban en diferentes etapas del desarrollo postnatal: etapa infantil, 14 días ;juvenil, 23 días; puberal, 45 días y adultos 90 días, procedentes del bioterio del CINVESTAV, sin régimen de luz oscuridad especial y con agua y alimento "*ad libitum*".

Las ratas previamente anestesiadas con cloroformo fueron sacrificadas por decapitación. La hipófisis se obtuvo eliminando el tejido meníngeo y removiendo cuidadosamente el cerebro y tejido conectivo que la circunda. Posteriormente, se separó la hipófisis posterior e intermedia y la hipófisis anterior fué partida a la mitad y trasladada a 1 ml de medio de incubación, que consistió en medio 199 con sales de Hanks (GIBCO, USA) adicionado con 10 nM de HEPES (Acido N-2-Hidroxietilpiperazina- N'-2-etanosulfónico, SIGMA, USA), a una temperatura de 37°C, gaseado con una mezcla 95% oxígeno y 5% bióxido de carbono a un pH de 7.4 (Fig. 4).

Incubación de las hipófisis.

El sistema donde se realizó la incubación de las glándulas estaba constituido por una jeringa de plástico de

3ml, con un orificio en la parte inferior donde se insertó una aguja 25 G 5/8 através de la cual se pasaba una mezcla gaseosa de 95% oxígeno y 5% dióxido de carbono. Para mantener en el sistema la temperatura constante de 37°C se utilizó un baño térmico o "baño Maria". Al final de la incubación la hipófisis se trasladó a un tubo con 1 ml de Na OH al 0.05 N para su posterior análisis de proteínas totales. El medio de la secreción basal y estimulada fueron congelados así como también el tejido, hasta su posterior análisis cuantitativo de LH el primero y proteínas el segundo (Fig. 4).

Posteriormente al período de estabilización de 30 minutos, el medio fué deshechado y substituido por 1 ml de medio fresco en las mismas condiciones. Se incubaron las hipófisis por un segundo período de 30 minutos. Una vez transcurrido este, se tomó una alicuota de 500 μ l, la cual fué considerada la concentración "basal". El volumen extraído fué substituido por medio 199 fresco en las mismas condiciones, agregando además 20 μ l de GnRH a las tres distintas concentraciones. Las hipófisis se dejaron incubar durante 60 minutos, en las mismas condiciones previamente descritas, transcurrido el tiempo se colectó el medio, el cual fué considerado la concentración "estimulada".

El diseño experimental fué el siguiente:

En cada experimento se utilizaron hipófisis divididas en 3 grupos determinados por la concentración de GnRH que recibieron. Las concentraciones usadas fueron:

Grupo 1: $10^{-7}M$ Grupo 2: $10^{-9}M$ Grupo 3: $10^{-11}M$

De esta manera, de cada glándula se obtuvo la secreción basal y estimulada.

La GnRH utilizada es un preparado de 0.1 mg/ml llamado Relefact de los laboratorios Hoechst, AG (Alemania) de uso clínico.

Utilizando este sistema de incubación no era posible distinguir entre las concentraciones basales y las estimuladas dada la gran cantidad de hormona en el medio de incubación por lo que surgió la necesidad de modificar el diseño experimental.

El diseño experimental previamente descrito fué sustituido por un segundo diseño al cual corresponden los resultados que se presentan en este trabajo y consistió en lo siguiente:

Posteriormente al período de estabilización, el medio se deshechó y substituyó por 1 ml de medio 199 en las mismas condiciones a las de la estabilización, las glándulas se dejaron reposar 30 minutos más y se deshechó nuevamente el medio, se incubaron las glándulas durante 20 minutos en las mismas condiciones descritas y se recolectó el medio, el cual fué considerado la secreción "basal". Las glándulas se incubaron posteriormente en tres períodos de 20 minutos cada uno, en estos casos, el medio contenía GnRH en las tres distintas concentraciones mencionadas en la primer metodología. Al término de cada período, el medio fué

colectado y substituido por medio fresco mas la GnRH (Fig.5).

El tejido fué recolectado en 1 ml de Na OH al 0.5 N, y del mismo modo que las muestras del medio, congelado hasta su posterior análisis.

La incubación de las glándulas, fué realizado, al igual que en la primer metodología, en jeringas de 3 ml, pero para el gaseado se usaron agujas de menor salida, del tipo odontológico 271 0 J03, que permitió un gaseado más fino sin provocar agitación del tejido.

Radioinmunoanálisis RIA

Al medio se le cuantificó la concentración de LH con la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo (RIA), que se basa en la competencia entre hormona marcada y hormona fría por un anticuerpo específico y la posterior precipitación del agregado utilizando un segundo anticuerpo contra gammaglobulinas de tipo y su posterior cuantificación radioactiva. El primer anticuerpo fue un anticuerpo policlonal de conejo, específico para LH de rata. Se utilizaron los paquetes que dona el Instituto Nacional de Artritis, Diabetes y Enfermedades Digestivo y Renales (NIADDK) de los Institutos Nacionales de salud (NIH) de EEUU. El segundo anticuerpo contra inmunoglobulinas de conejo que se obtiene a partir del borrego, fué donado gentilmente por el Dr. Garza Flores del Instituto Nacional de la Nutrición. Para obtener el ligando

marcado con I^{125} se utilizó la técnica de cloramina T, separando la hormona del yodo mediante una columna de sephadex G100. Para llevar a cabo la cuantificación radioactiva se usó un contador de radiaciones gamma Packar, U.S.A. Para determinar las concentraciones a partir de las c.p.m. se usó el método de la transformada logit-log que consiste en linearizar la curva dosis-respuesta, calculando el porcentaje de unión y transformandola a logit Y y expresando la concentración de la dosis como su logaritmo decimal que se designa como X, posteriormente se interpolan los datos de las muestras desconocidas a los valores de la curva (Bedolla, 84).

Análisis de proteínas totales.

Las muestras de tejido en la solución de NaOH 0.5N fueron homogenizadas manualmente con un minimortero. El contenido protéico de las muestras homogenizadas se determinó a través de la técnica colorimétrica de Bradford (1976), utilizando como estandar de proteína a la albúmina de suero bovino (Sigma, USA) diluida en la solución de NaOH 0.5N. Para su análisis se utilizó un espectrofotómetro de masas modelo DU-65 BECKMAN U.S.A. a 595 nM de absorbancia.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de los distintos grupos se analizaron

mediante la prueba estadística de Wilcoxon y la prueba de ANOVA simple y Bonferroni para la comparación entre las distintas concentraciones y edades, utilizando un programa computarizado INSTAT.

Cortes histológicos.

Se hicieron cortes histológicos semifinos de la hipófisis de animales de 23 y 45 días, después de haber sido tratadas bajo las mismas condiciones experimentales que las glándulas del presente estudio, para observar así posibles irregularidades bajo microscopía óptica. Los cortes fueron preparados con la técnica de hematoxilina-eosina y posteriormente montados para ser fotografiados en la unidad de microscopía del CINVESTAV con luz directa y contraste de fases.

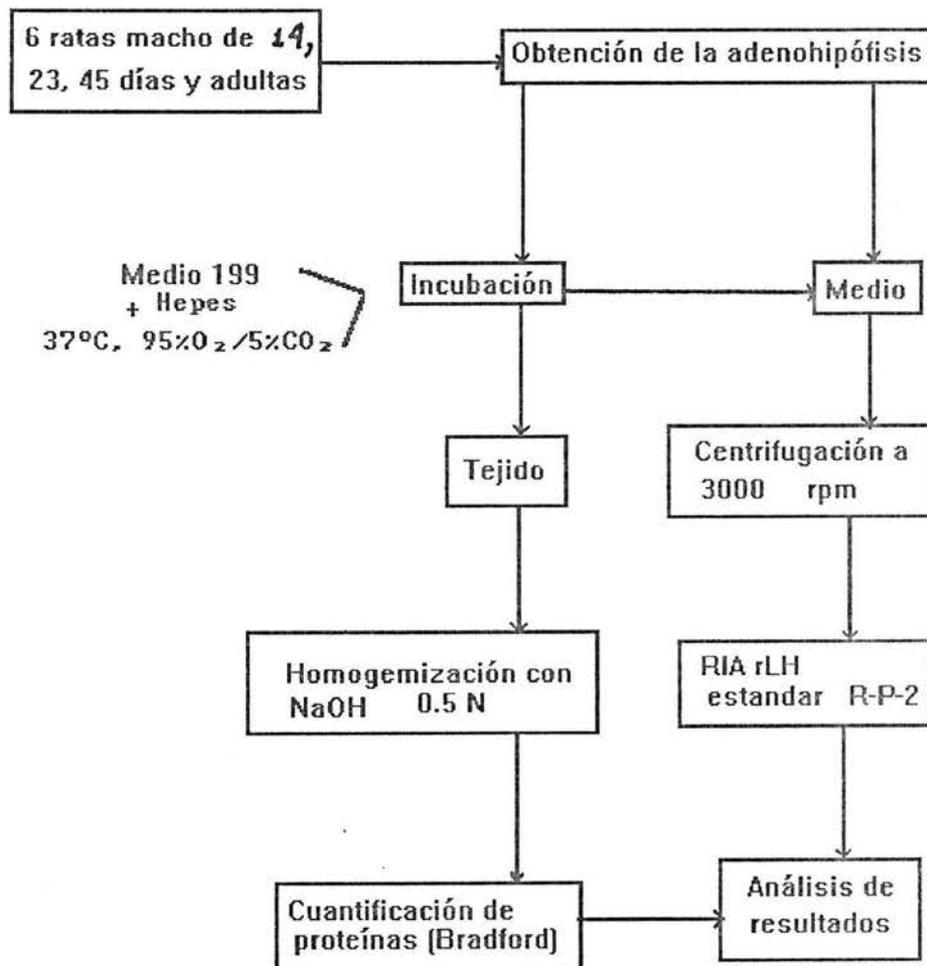


Figura 4. En este diagrama se resumen los pasos seguidos desde la obtención de las hipófisis hasta el posterior análisis de contenidos de LH y proteínas para las distintas edades estudiadas.

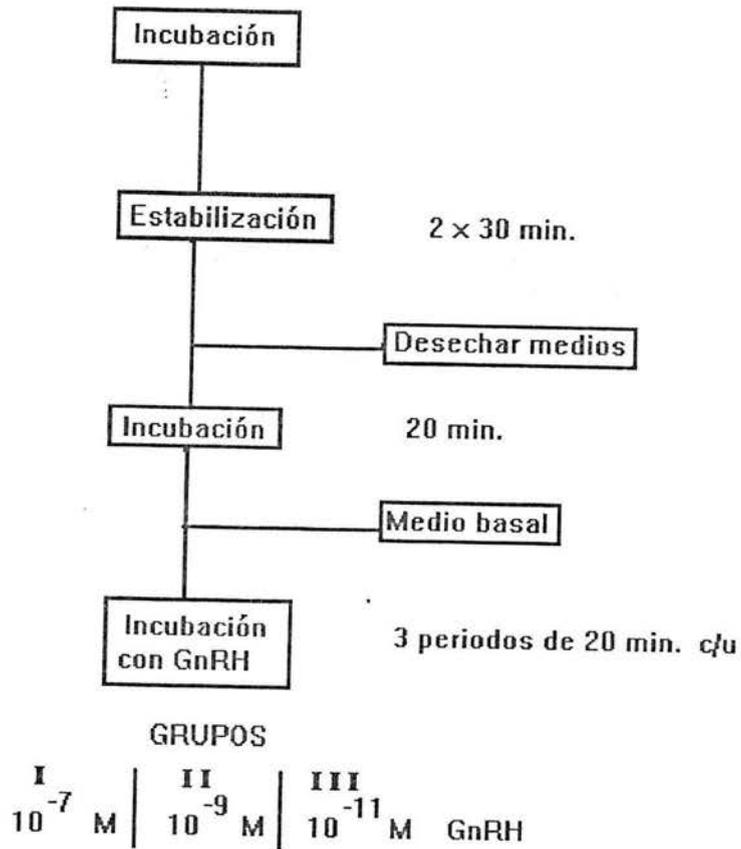


Figura 5. Se muestran los periodos de incubación así como las tres distintas dosis a que las glándulas fueron sometidas.

RESULTADOS

Análisis de resultados.

Al comparar la secreción basal de LH de las hipófisis después de ser extraída y depositada para su incubación se observó que esta era muy variable durante los primeros minutos y se iba estabilizando después de una hora. De acuerdo a lo anterior se decidió dejar un período de estabilización de 1 hora antes de iniciar la fase experimental; En una primera instancia después de la estabilización se dió un tiempo de 20 minutos para tomar la muestra de la secreción basal seguido de 1 hora de incubación con diferentes dosis de GnRH y obtener la secreción estimulada de LH. Con este esquema se observó que la concentración de LH era muy elevada, debido a la acumulación de la hormona en el medio en un período tan largo pero no daba información del comportamiento en el tiempo de la secreción estimulada. Por lo anterior se decidió dividir el período de 60 minutos de estimulación con GnRH en tres períodos de 20 minutos cada uno. Al final de cada uno de los periodos se tomaron los medios y se substituyeron con medio nuevo agregado con GnRH (Fig.5).El esquema experimental final permitió analizar la respuesta de las hipófisis con respecto al tiempo y a la concentración del estímulo.

Al analizarse las concentraciones de LH en los medios obtenidos de las incubaciones de las hipófisis extraídas de los animales de diferentes edades, se observaron diferencias en la secreción de LH tanto en respuesta a las diferentes concentraciones de GnRH usadas, como en la temporalidad de la respuesta. Para conocer si estas diferencias eran significativamente diferentes se analizaron los resultados obtenidos con la prueba estadística de Wilcoxon. En la figura 6 se muestran las concentraciones de LH secretadas al medio por las hipófisis de animales de 14 días, se observó que respondieron de una manera extremadamente significativa desde los 20 minutos de incubación con la dosis de $10^{-7}M$ y esta respuesta se mantiene a los 40 y 60 minutos de incubación, una respuesta similar se observó con la concentración de $10^{-9}M$ pero la diferencia con respecto a la basal fué menor que con la concentración de $10^{-7}M$. Con la concentración de $10^{-11}M$ las hipófisis no respondieron significativamente a ninguno de los tiempos estudiados.

Con las hipófisis de 23 días, figura 7, se observó una respuesta muy significativa con respecto a la basal, tanto con la concentración de $10^{-7}M$ y $10^{-9}M$ de GnRH, desde los 20 minutos, alcanzando niveles altos y manteniéndolos durante los 40 y 60 minutos. Con la concentración de $10^{-11}M$ no se observó respuesta significativa a ningún tiempo.

Con las hipófisis de 45 días, figura 8, se observó un comportamiento similar a las de 23 días, en donde las

hipófisis respondieron de manera muy significativa para las dos concentraciones más elevadas de GnRH pero no con la concentración de 10^{-11} M. La diferencia con las hipófisis de 14 y 23 días, es que en las de 45 días la respuesta a GnRH es gradual, alcanzando su respuesta máxima hasta los 60 minutos mientras en las edades anteriores desde los 20 minutos se alcanza una respuesta muy significativa que se mantiene en los tiempos subsecuentes.

Por su parte en las hipófisis de adultos (3 meses), figura 9, la diferencia de las estimuladas con 10^{-7} M y su basal es muy significativa desde los primeros 20 minutos, pero con la concentración de 10^{-9} M no se observa diferencia significativa sino hasta los 60 minutos de estimulación. Para la concentración de 10^{-11} M no existe diferencia estadística significativa, en esta edad la respuesta a GnRH es gradual al igual que a los 45 días, alcanzando su máximo a los 60 minutos, siendo muy significativa con la concentración de 10^{-7} M.

Al comparar las concentraciones basales secretadas por las glándulas de las tres edades, se observan diferencias significativas entre las diferentes edades, pues se observa que estas concentraciones aumentan conforme aumenta la edad.

La figura 10 muestra el incremento con respecto a la basal ante el estímulo con la GnRH durante el tiempo total de incubación, al valor obtenido en cada tiempo de incubación se le resta su basal y se sumaron los valores de los tres

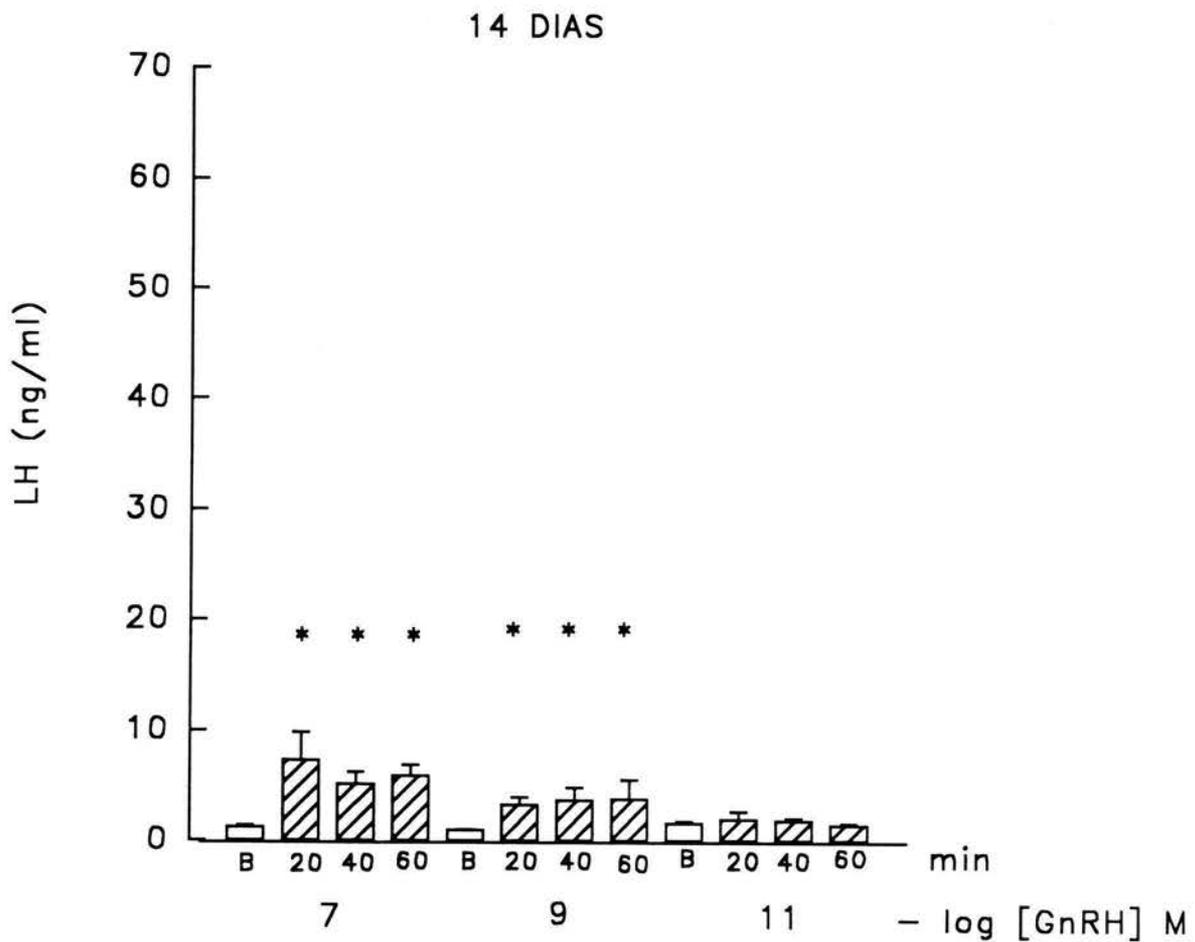


Figura 6. Secreción basal y estimulada ante tres distintas dosis de GnRH, por hipófisis de ratas de 14 días de edad. Se observa una respuesta dosis-dependiente, la cual es significativa con respecto a su basal desde los 20 min para las concentraciones de $10^{-7}M$ y $10^{-9}M$, pero no existe diferencia significativa para $10^{-11}M$. Significancia * $p < 0.05$.

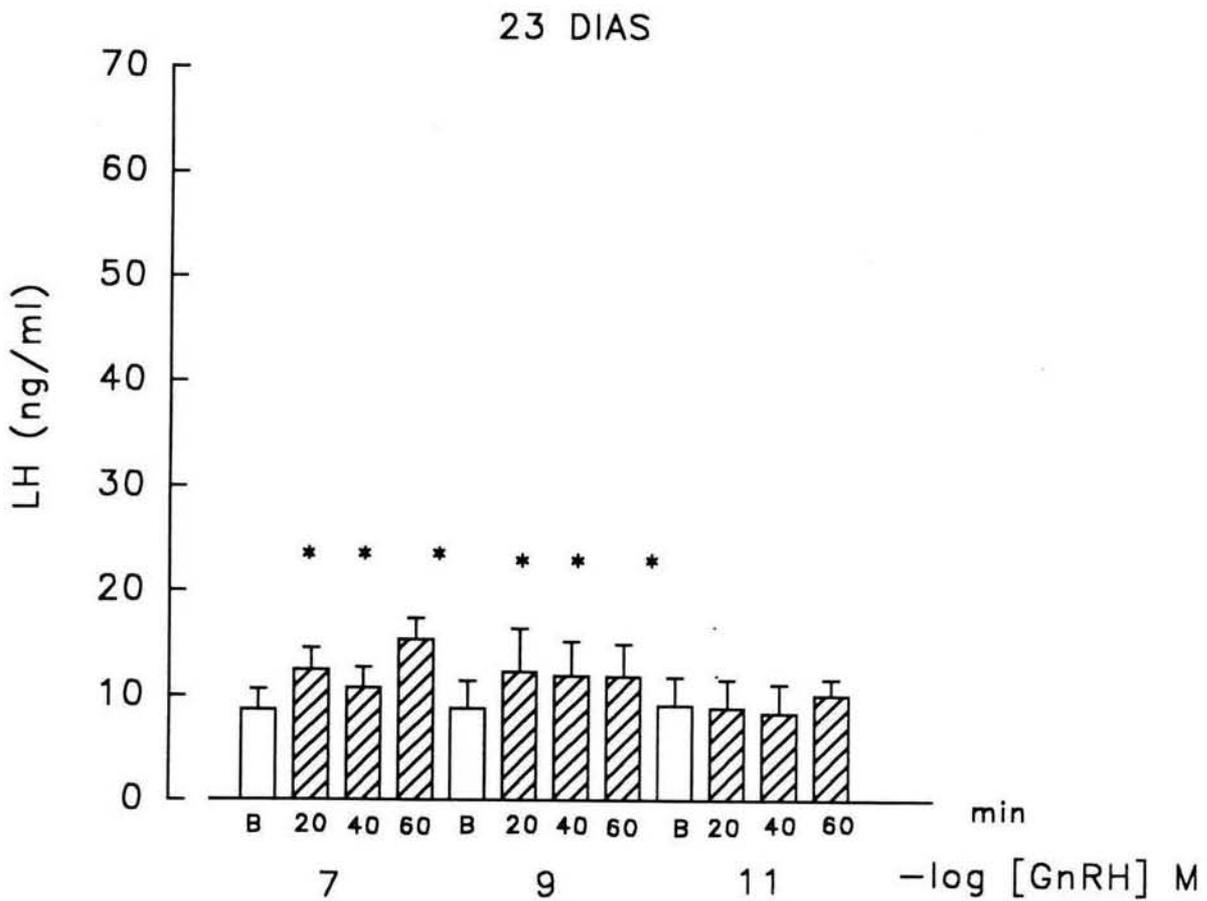


Figura 7. Secreción basal y estimulada ante tres distintas dosis de GnRH, por hipófisis de ratas de 23 días de edad. Se observa una respuesta dosis-dependiente, la cual es significativa con respecto a su basal desde los 20 min para las concentraciones de $10^{-7}M$ y $10^{-9}M$, pero no existe diferencia significativa para $10^{-11}M$. Significancia * $p < 0.05$.

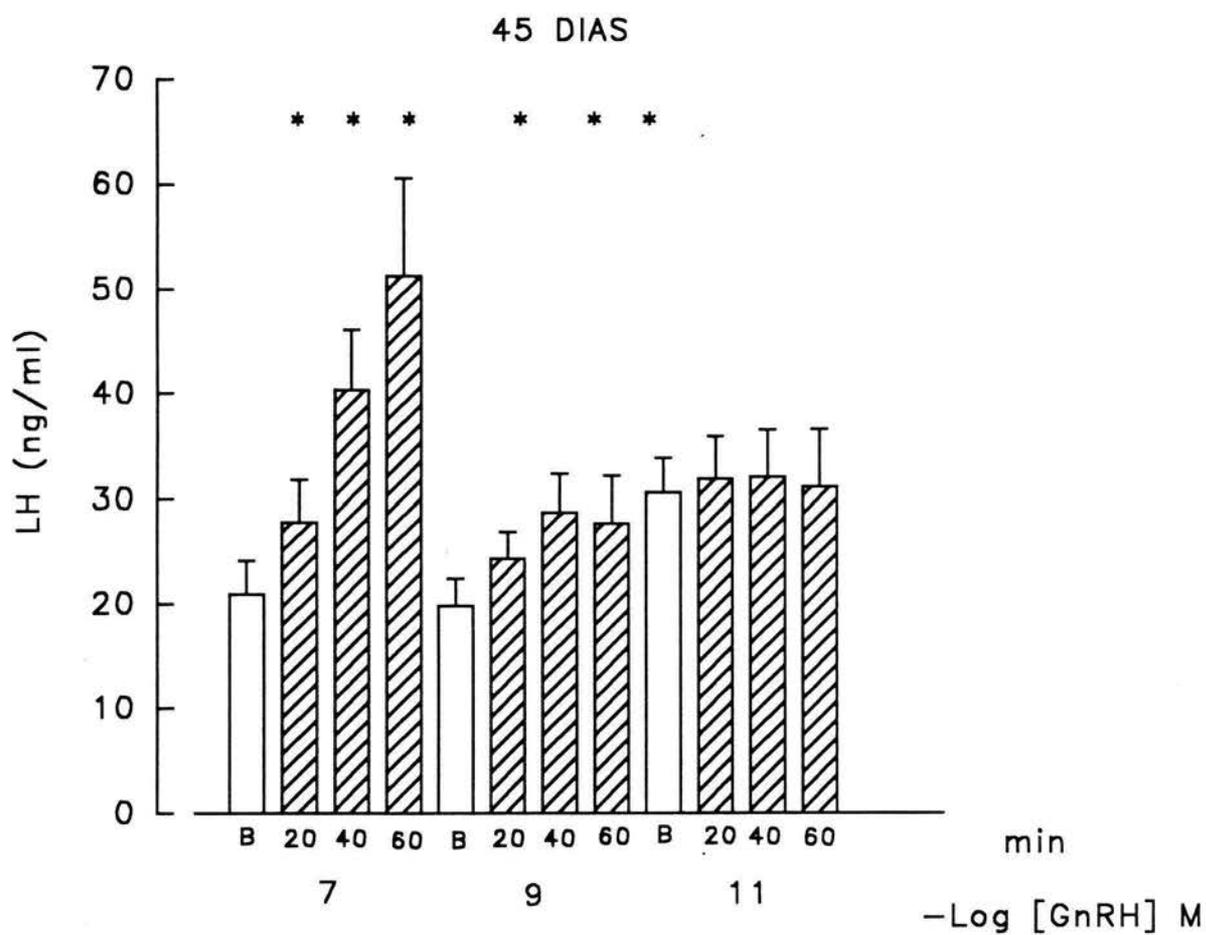


Figura 8. Secreción basal y estimulada ante tres distintas dosis de GnRH, por hipófisis de ratas de 45 días de edad. Se observa una respuesta dosis-dependiente, la cual es significativa con respecto a su basal desde los 20 min para las concentraciones de $10^{-7}M$ y $10^{-9}M$, pero no existe diferencia significativa para $10^{-11}M$. Significancia * $p < 0.05$.

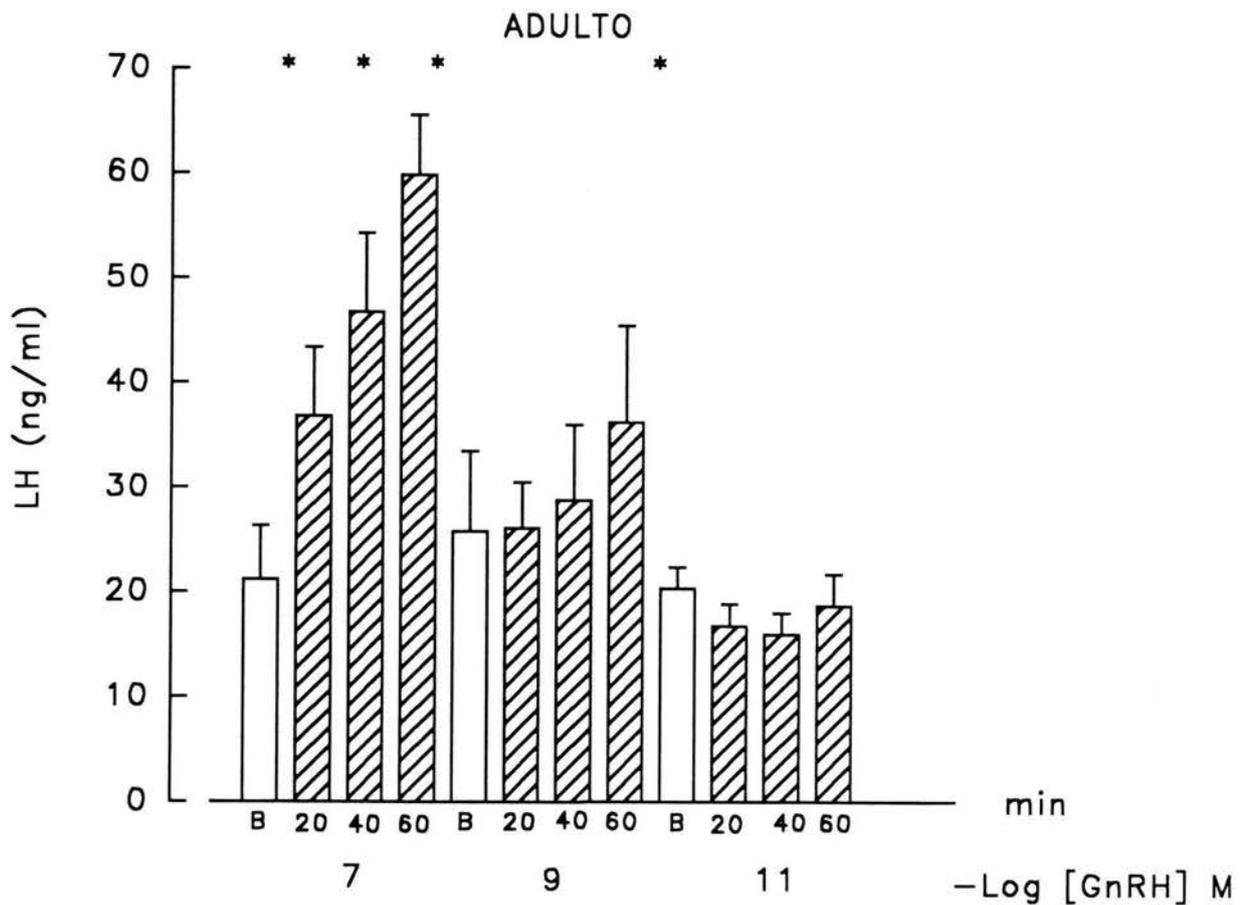


Figura 9. Secreción basal y estimulada ante tres distintas dosis de GnRH, por hipófisis de ratas de 90 días de edad. Se observa una respuesta dosis-dependiente, la cual es significativa con respecto a su basal desde los 20 min para las concentraciones de 10^{-7} M pero no para 10^{-9} M, donde es significativa hasta los 60 min y no existe diferencia significativa para 10^{-11} M. Significancia * $p < 0.05$.

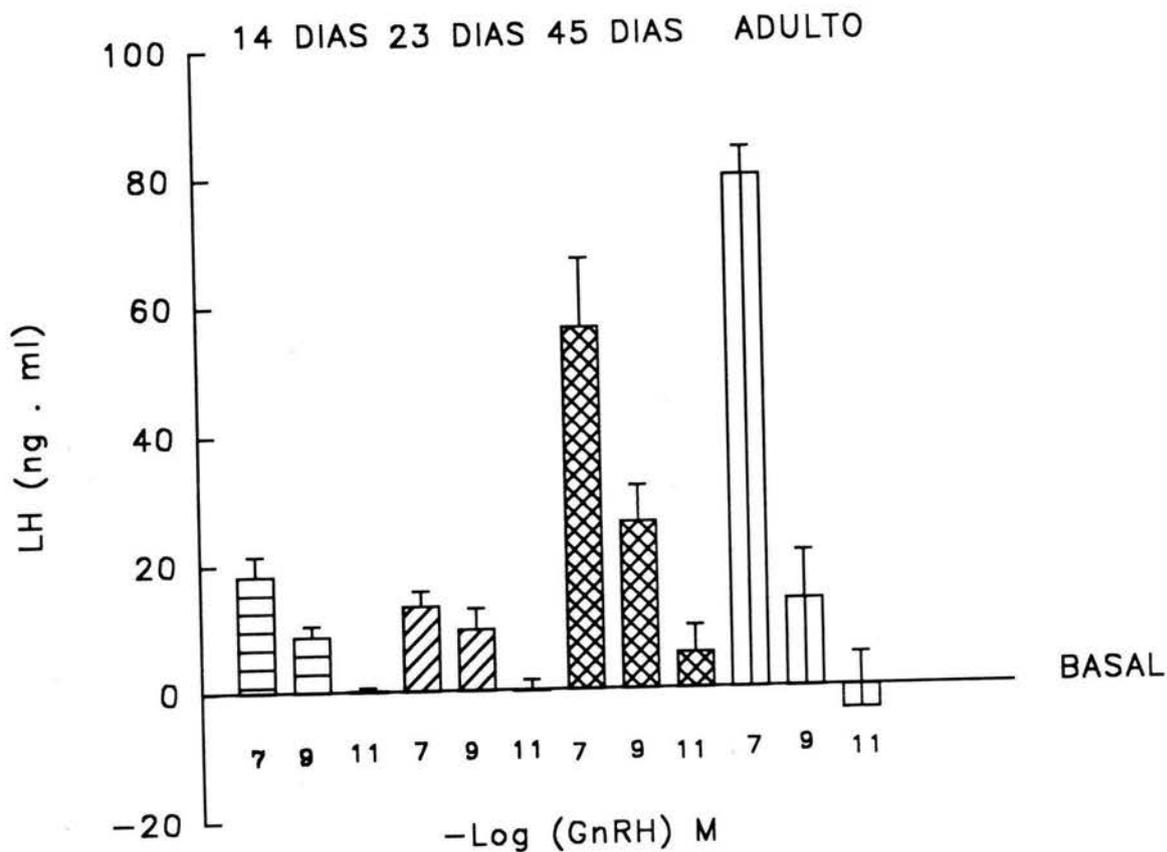


Figura 10. Sumatoria de la estimulación total a lo largo de los tres períodos de incubación para las cuatro distintas edades estudiadas. A cada valor se le restó su propia basal y después se sumaron los tres tiempos para obtener el promedio. Se aprecia un aumento tanto en la secreción basal como estimulada, conforme el animal crece.

PROTEINAS TOTALES $\mu\text{g/ml}$

EDAD(días)	X	SEM
14	8.9	0.65
23	27.3	6.9
45	50.04	12.3
90	100.0	16.0

Figura 11. Se muestra el promedio y SEM del contenido protéico de las hipófisis de ratas macho de diferentes edades.

tiempos, y obtener el promedio de cada edad. Aquí se observa una respuesta dosis dependiente para las tres edades estudiadas. Si se comparan las cuatro edades entre sí, se observa que a la edad de 14 días las glándulas secretan menos LH y que las concentraciones son mayores al aumentar la edad de las donantes.

El tamaño de las hipófisis varía con la edad siendo la de mayor tamaño la del adulto. Teniendo en cuenta que el tamaño de un tejido se correlaciona con su contenido de proteínas se obtuvieron las proteínas totales por glándula. En la figura 11 se muestran las concentraciones de proteínas por hipófisis de las cuatro edades estudiadas y se observan grandes diferencias entre sí, de lo anterior uno puede inferir que conforme el animal crece aumentan el número de células gonadotropas por lo que se hace necesario normalizar los datos de secreción de LH por la concentración de proteínas de manera individual.

Al corregir las proteínas totales de cada hipófisis y sus correspondientes concentraciones de LH, tanto basales como estimuladas, las diferencias encontradas entre los distintos grupos disminuyen, en las siguientes gráficas (Fig. 12, 13, 14 y 15) se observan estos datos, así como dos ejemplos del comportamiento individual para las hipófisis de ratas de las edades de 23 y 45 días; se aprecia una dispersión grande de

los datos aún desde la basal, pero se puede observar que cada glándula sigue un patrón similar a las demás; cuando parte de una concentración basal alta, la estimulación con las concentraciones de $10^{-7}M$ y $10^{-9}M$ supera a la misma.

Se quiso saber entonces cuál había sido el incremento total ante el estímulo, restando a cada concentración estimulada su propia basal y sumando los tres tiempos para obtener el promedio de cada edad, los datos se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA simple, y se observó que al igual que en la figura 10, había una respuesta dosis dependiente(Fig. 16).

Se compararon también las cuatro distintas edades entre sí para ver si había diferencia entre ellas para cada una de las distintas concentraciones usadas y se encontró que solo a la edad de 14 días existe diferencia estadística significativa con respecto a las demás edades, ante las dosis de 10^{-7} y 10^{-9} M mientras que para las tres edades restantes no existen diferencias significativas a ninguna de las tres dosis de GnRH utilizadas, para analizar estos datos se utilizó la prueba de Bonferroni(Fig. 16).

Con estos datos se observó que las hipófisis de rata de las cuatro edades estudiadas responden a la GnRH de forma dosis dependiente de manera similar, pero las de ratas de 14 días secretan una mayor cantidad de LH con respecto a su basal ante el estímulo con GnRH. Su patrón de secreción se asemeja en la temporalidad de la respuesta al de las hipófisis de

ratas de 23 días ya que ambas alcanzan un máximo de estimulación desde los 20 minutos de incubación mientras que las hipófisis de 45 días y adulto responden de modo gradual y alcanzan su máximo hasta los 60 minutos. A ninguna edad responden a la dosis de $10^{-11}M$ y las hipófisis de adulto responden de un modo menos marcado a la concentración de $10^{-9}M$ que las de 14, 23 y 45 días.

Los resultados mostrados anteriormente fueron validados desde un punto de vista histológico. De acuerdo a las figuras 19, 20, 21 y 22 se puede observar que las células aún después de todos los periodos de incubación se encontraban con características histológicas correspondientes a un tejido normal, o sea, los bordes de las células se encuentran bien identificados, en los espacios intercelulares no se presentan imágenes sugerentes de edema y los núcleos de las células no muestran picnosis o retraimientos.

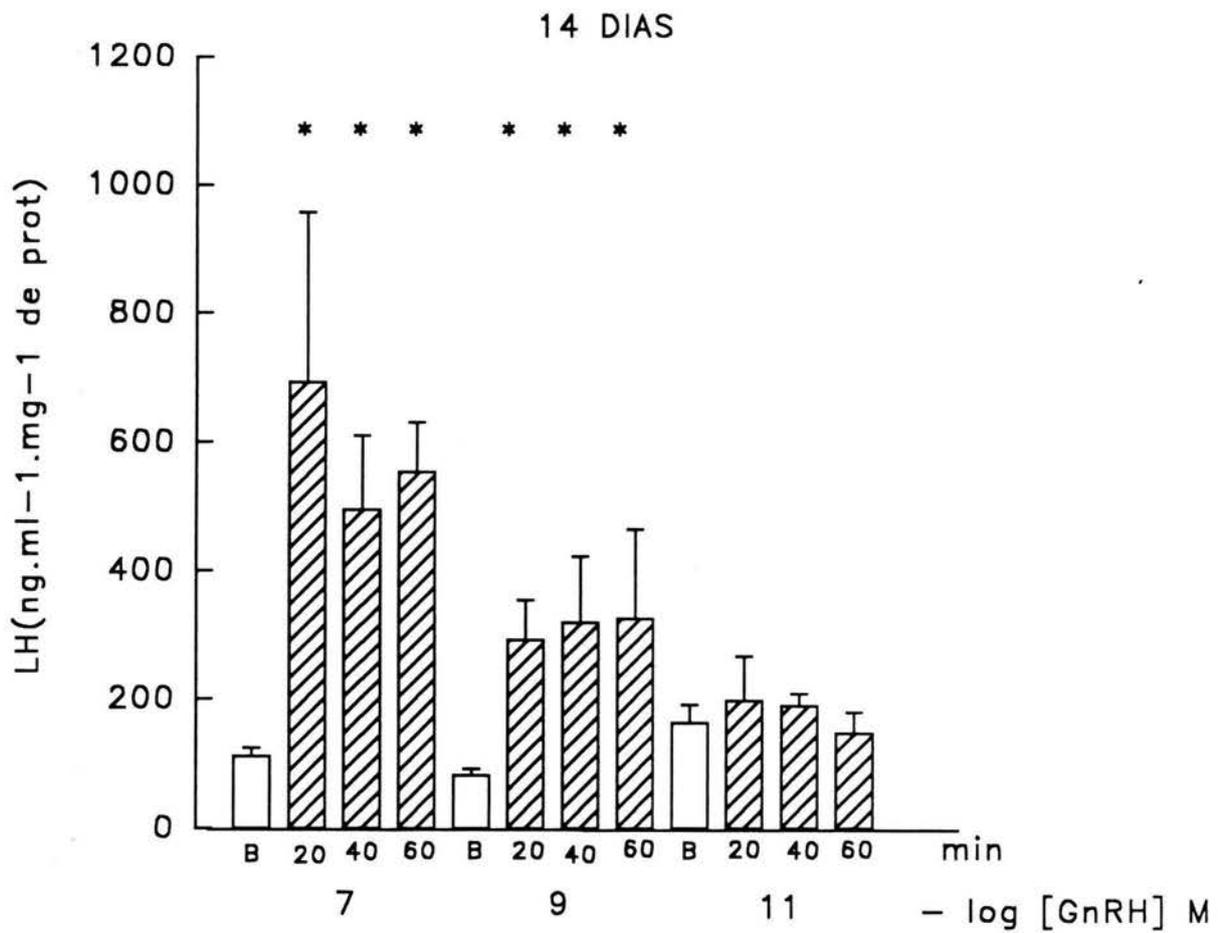


Figura 12. Secreción basal y ante tres distintas dosis de GnRH, por hipófisis de ratas de 14 días de edad (Datos normalizados por mg de proteína). Se observa una respuesta dosis dependiente similar a la de los datos sin normalizar. Significancia * $p < 0.05$.

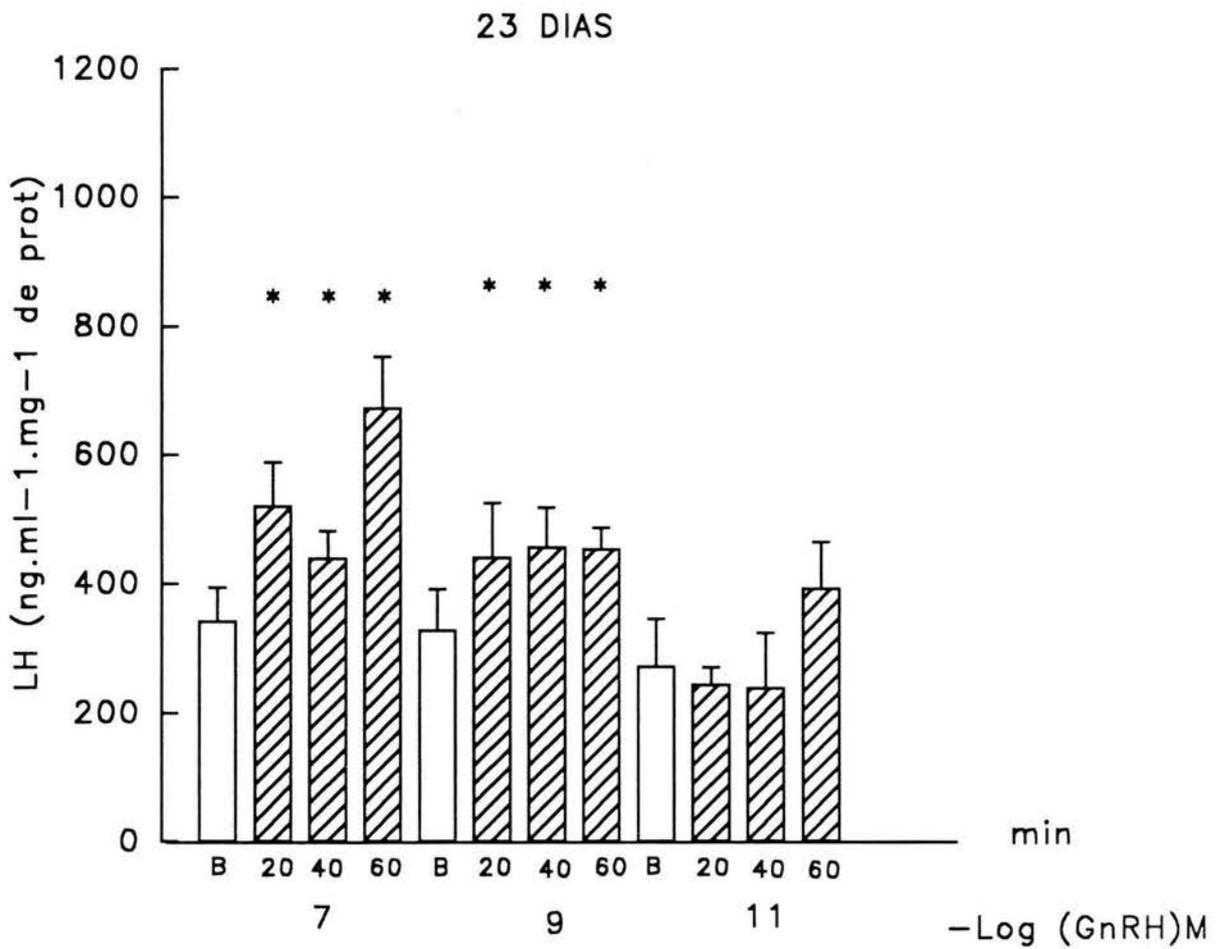


Figura 13. Secreción basal y ante tres distintas dosis de GnRH, por hipófisis de ratas de 23 días de edad (Datos normalizados por mg de proteína). Se observa una respuesta dosis dependiente similar a la de los datos sin normalizar. Significancia * $p < 0.05$.

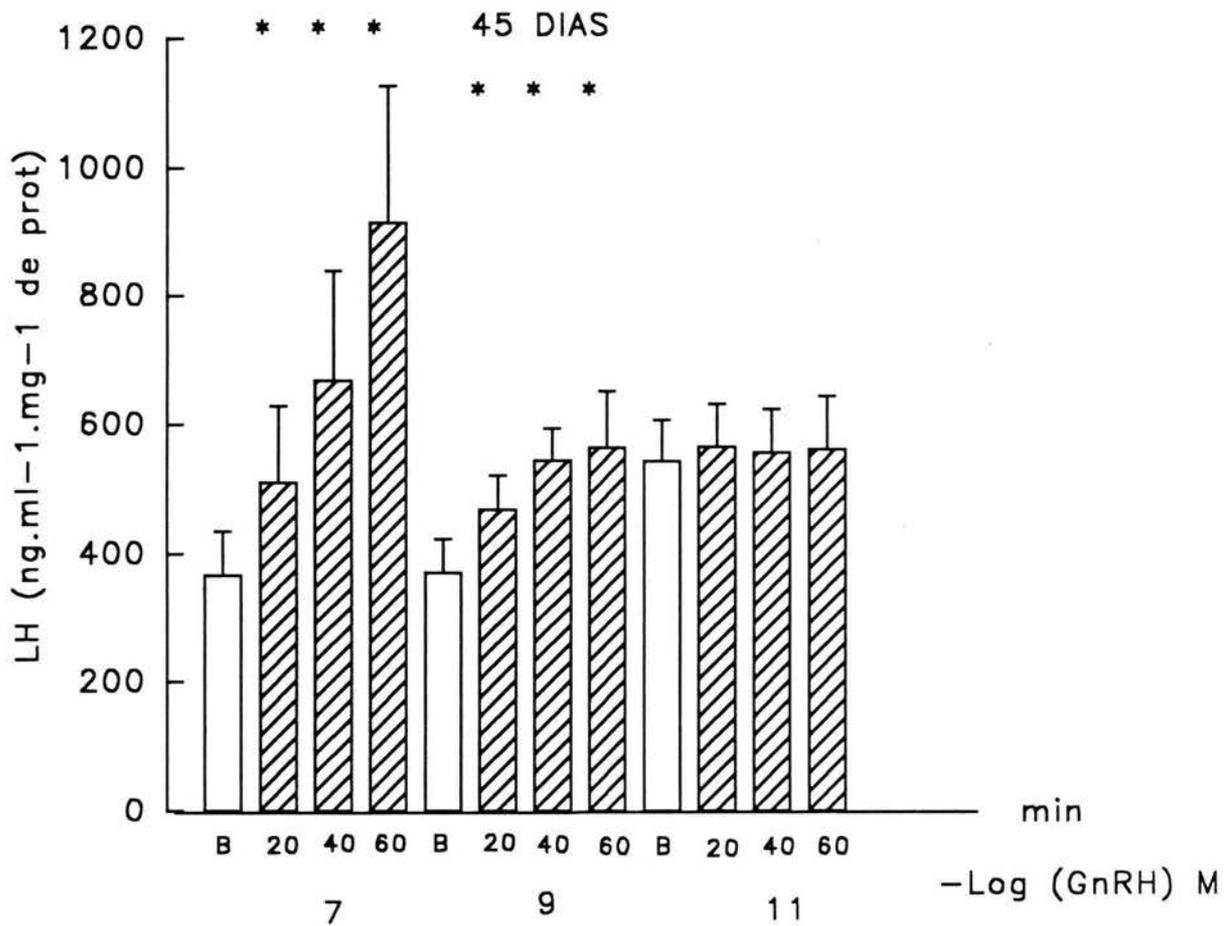


Figura 14. Secreción basal y ante tres distintas dosis de GnRH, por hipófisis de ratas de 45 días de edad (Datos normalizados por mg de proteína). Se observa una respuesta dosis dependiente similar a la de los datos sin normalizar. Significancia * $p < 0.05$.

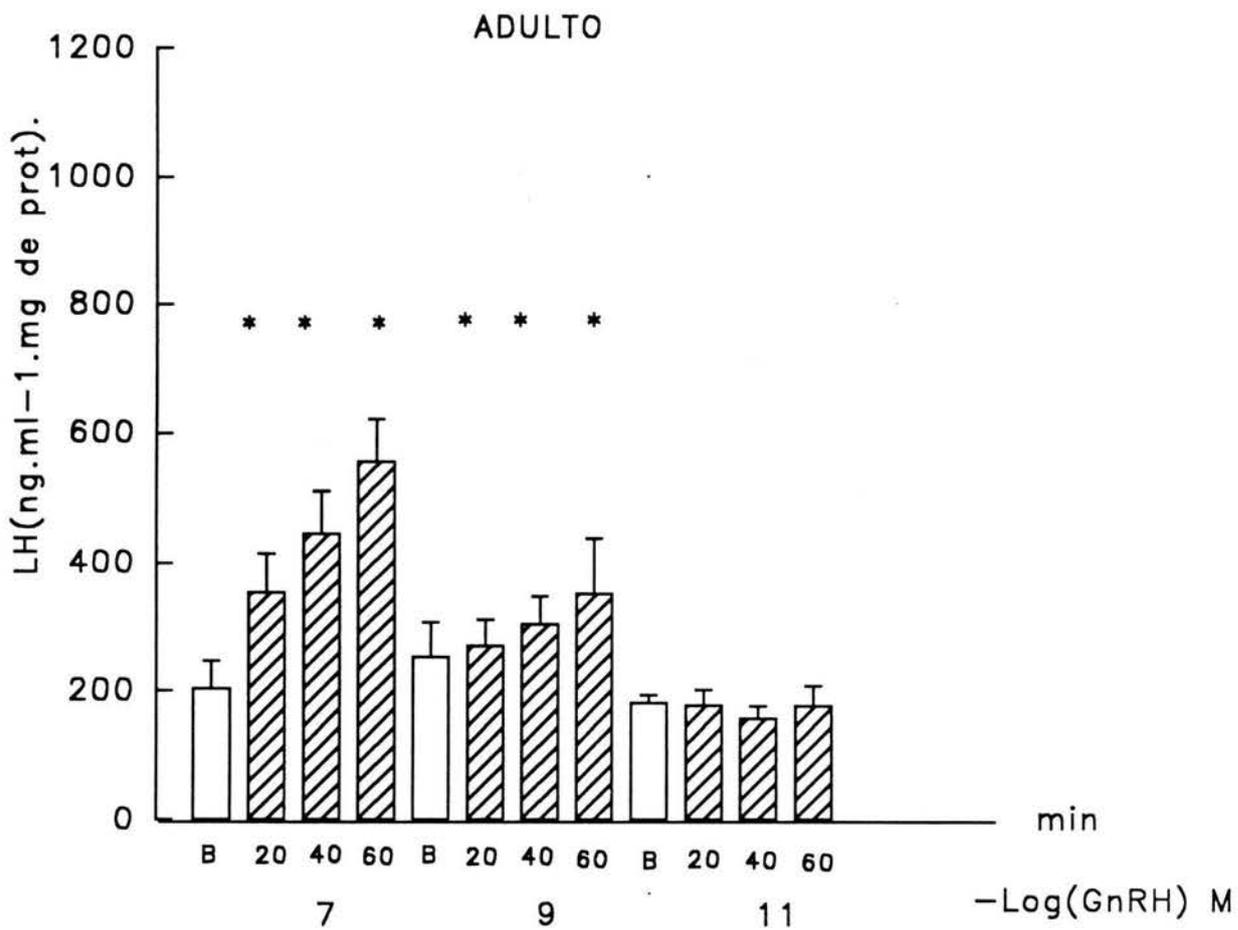


Figura 15. Secreción basal y ante tres distintas dosis de GnRH, por hipófisis de ratas de 90 días de edad (Datos normalizados por mg de proteína). Se observa una respuesta dosis dependiente similar a la de los datos sin normalizar. Significancia * $p < 0.05$.

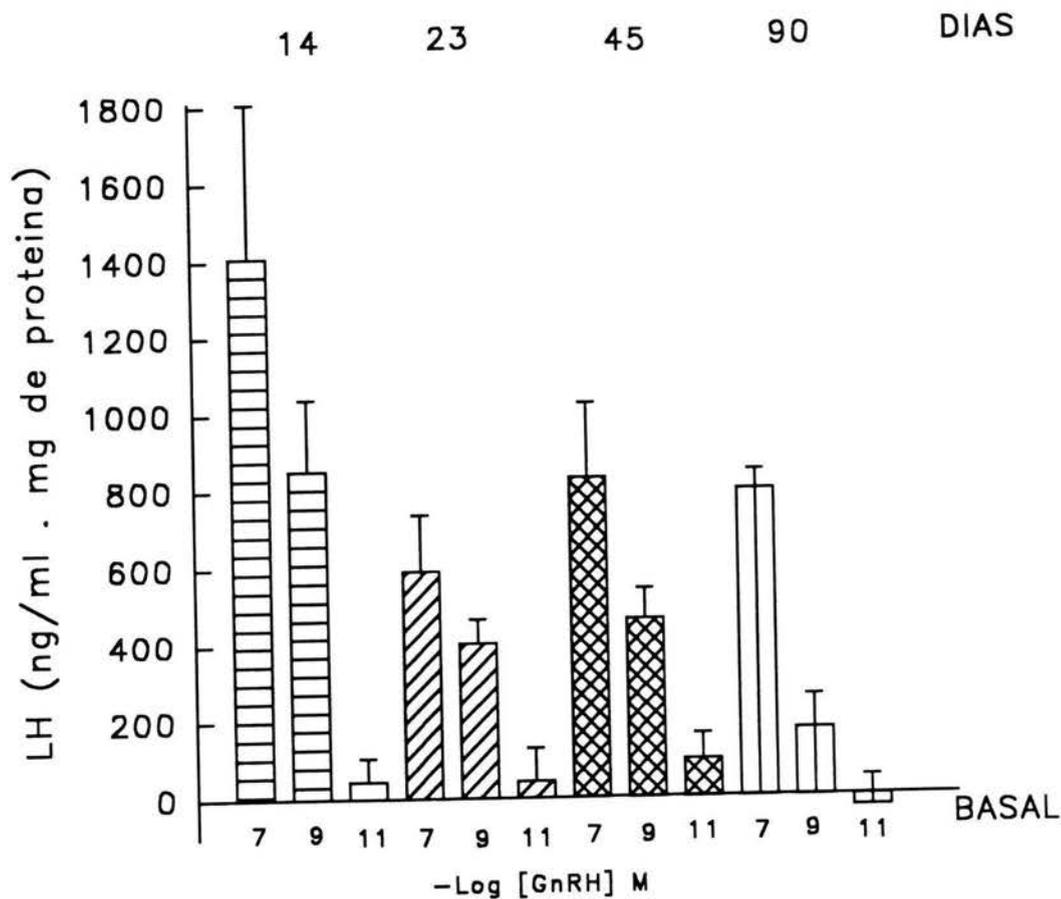


Figura 16. Sumatoria de la estimulación total a lo largo de los tres períodos de incubación para las cuatro distintas edades estudiadas. A cada valor se le restó su propia basal y después se sumaron los tres tiempos para obtener el promedio (Valores normalizados por mg de proteína). No existe diferencia estadísticamente significativa entre las edades de 23, 45 y 90 días pero si se observa una respuesta mayor a la edad de 14 días para las concentraciones de $10^{-7}M$ y $10^{-9}M$.

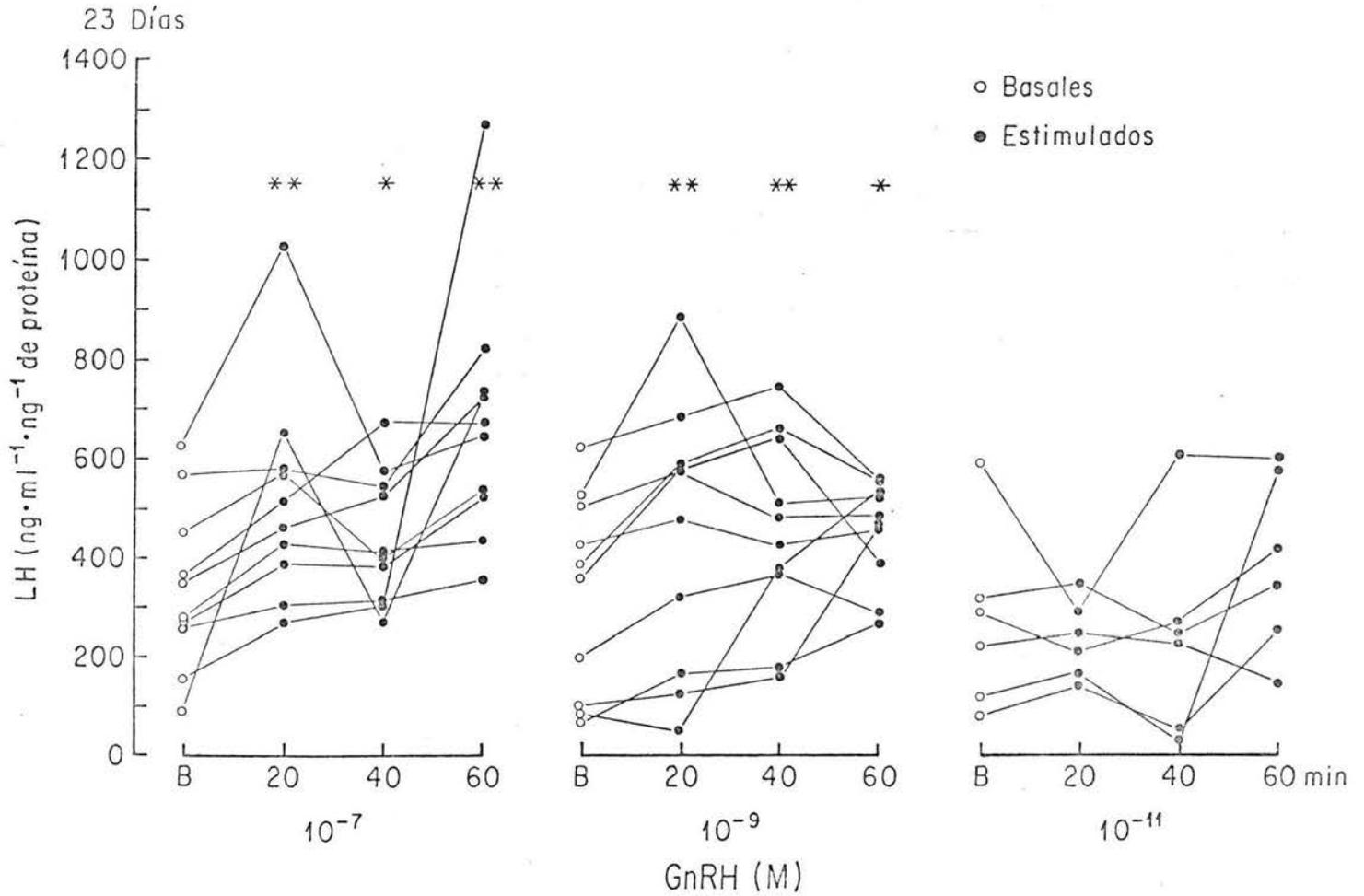


Figura 17. Secreción basal y ante tres distintas dosis de GnRH, por hipófisis de rata macho de 23 días, se muestra el comportamiento individual de cada hipófisis. Existe una dispersión de los datos elevada aún desde la basal, pero cuando dicha basal es elevada la secreción estimulada siempre es superior a la misma, conservando una misma tendencia entre sí.

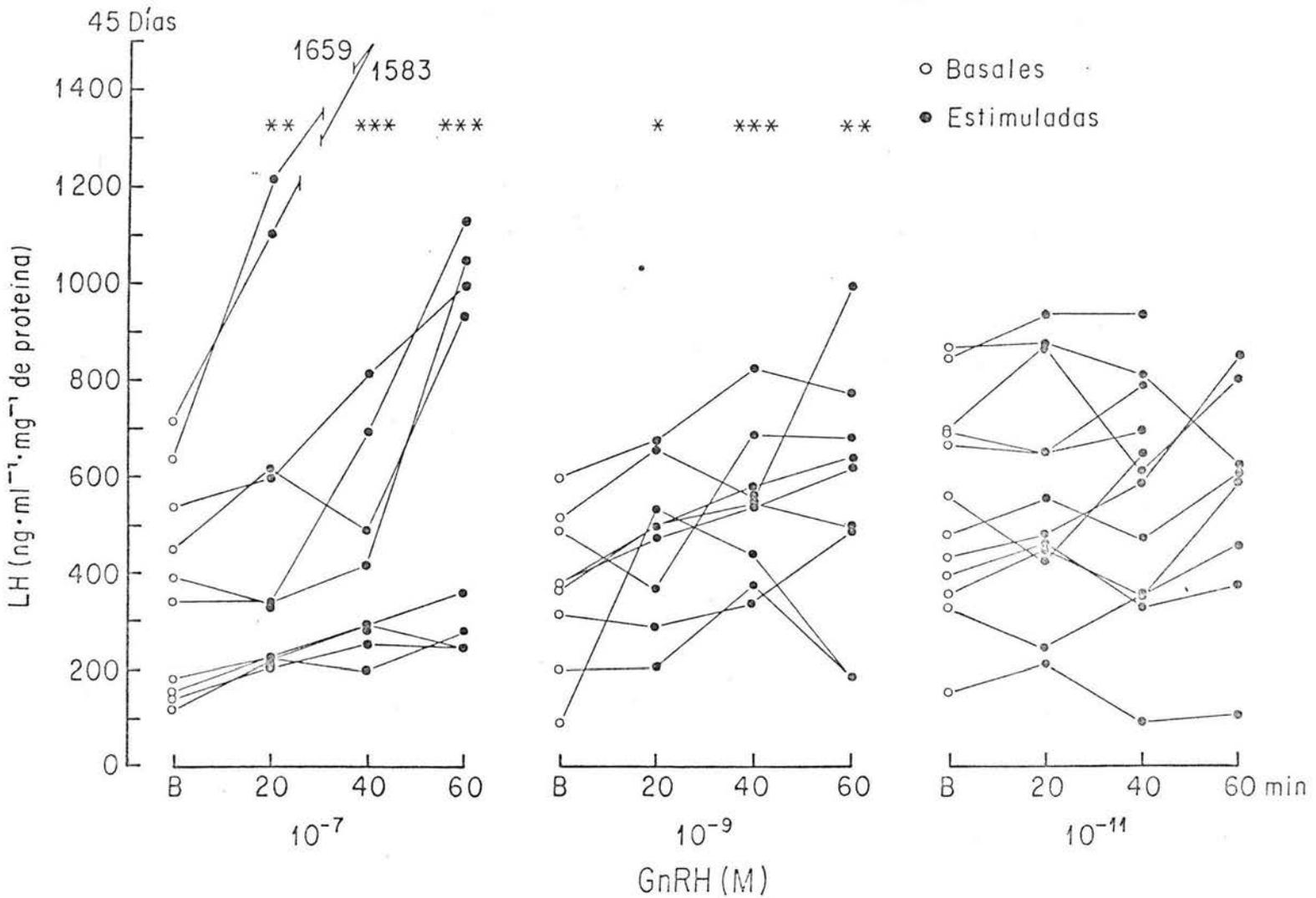


Figura 18. Secreción basal y ante tres distintas dosis de GnRH, por hipófisis de rata macho de 45 días, se muestra el comportamiento individual de cada hipófisis. Existe una dispersión de los datos elevada aún desde la basal, pero cuando dicha basal es elevada la secreción estimulada siempre es superior a la misma, conservando una misma tendencia entre sí.

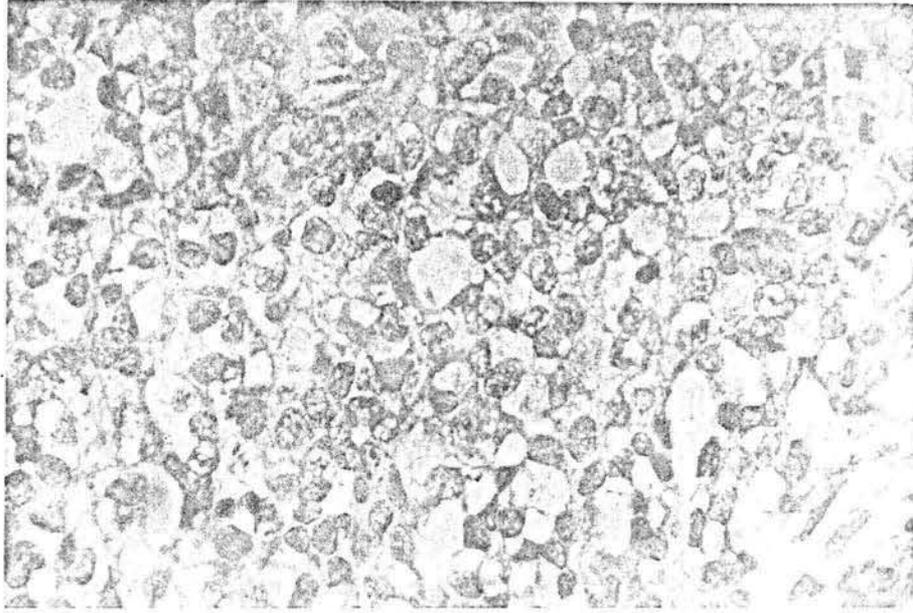


Figura 19. Micrografia 63X de células hipofisiarias de rata de 23 días de edad después de ser procesadas en las mismas condiciones experimentales, no se observa presencia de edemas u otra patología.

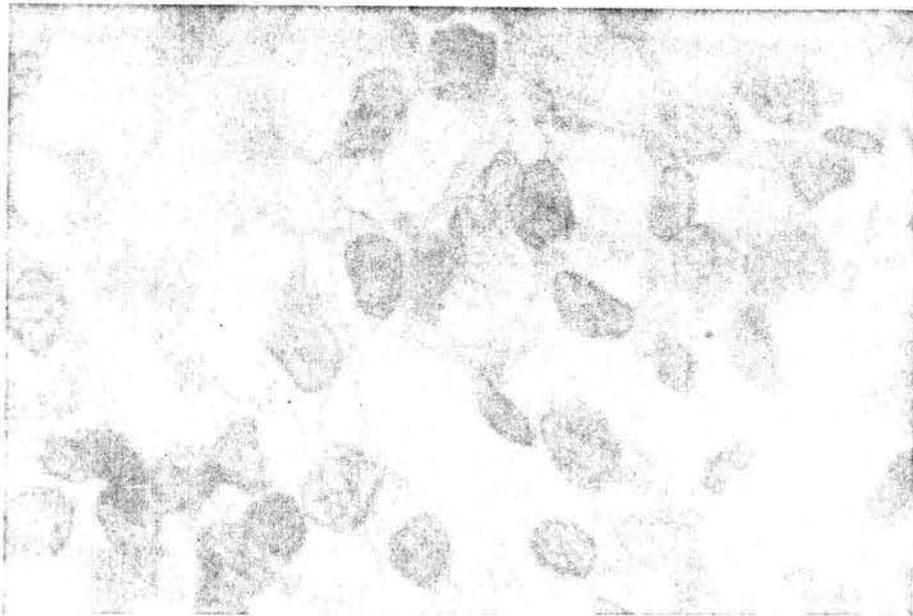


Figura 20. Micrografia 100X de células hipofisiarias de rata de 23 días de edad después de ser procesadas en las mismas condiciones experimentales, no se observa presencia de edemas u otra patología.

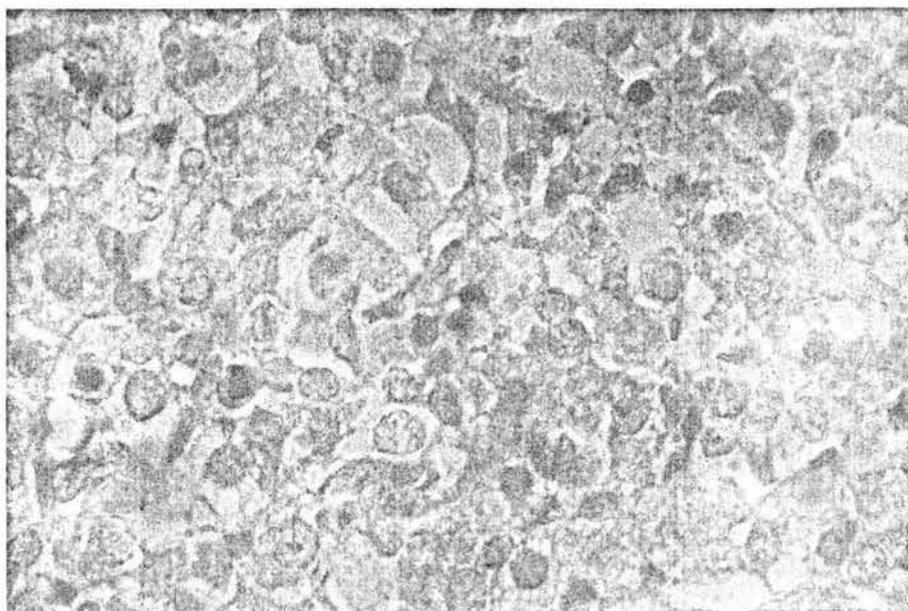


Figura 21. Micrografia 63X de células hipofisiarias de rata de 45 días de edad después de ser procesadas en las mismas condiciones experimentales, no se observa presencia de edemas u otra patología.

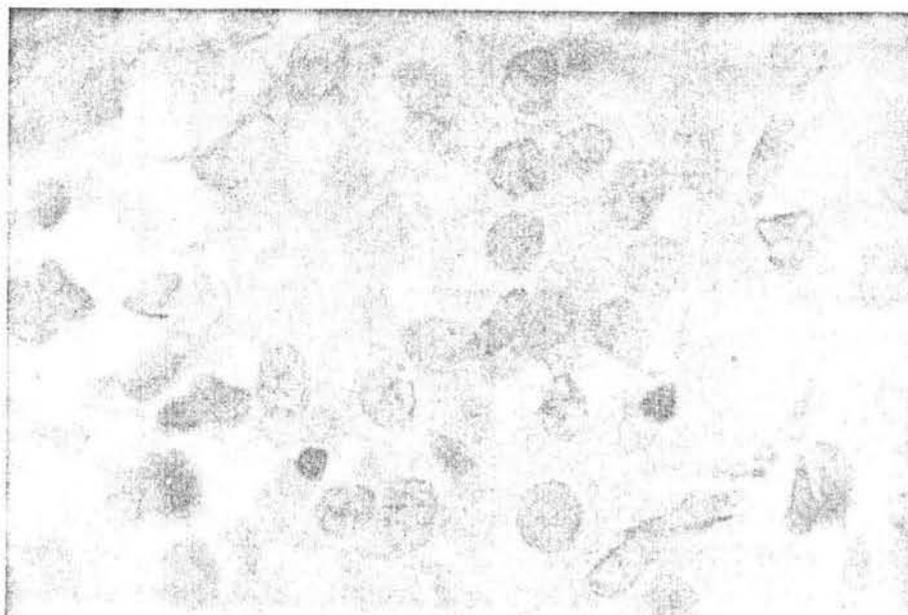


Figura 22. Micrografia 100X de células hipofisiarias de rata de 45 días de edad después de ser procesadas en las mismas condiciones experimentales, no se observa presencia de edemas u otra patología.

DISCUSION

Los resultados de este trabajo muestran que el modelo de incubación de la glándula utilizado es eficiente para estudiar la secreción hormonal de hipófisis de ratas a distintas edades ya que se puede obtener tanto la secreción basal o espontánea como la estimulada. La ventaja del modelo en relación al cultivo de células es que se mantiene la citoarquitectura de la glándula, o sea no se modifican ni la distribución de las poblaciones celulares ni sus posibles interrelaciones que puedan estar presentes en las distintas etapas del desarrollo de las hipófisis. Además, en este modelo el comportamiento de las células se encuentra determinado por las condiciones fisiológicas que prevalecían en el animal íntegro, evitándose, como sucedería en el cultivo celular, la participación de los componentes del suero bovino fetal u otros sueros u hormonas necesarias para la sobrevivencia de las células aisladas. Con respecto al uso del animal completo, este modelo nos permite eliminar variables presentes en el animal íntegro como son la participación de hormonas y factores tanto hipotalámicos como gonadales que se encuentran influyendo sobre la función de la hipófisis. Utilizando este modelo es posible analizar la acción de la GnRH tanto desde un punto de vista temporal como relacionado con su concentración en la secreción de gonadotropinas por las células gonadotropas. Es importante

hacer notar que la glándula mantiene una apariencia histológica normal después de todos los periodos de incubación, como se puede apreciar en las micrografías de los cortes finos y a nivel de la microscopía de luz, apreciándose ausencia de edemas ó células con irregularidades en el núcleo o en los límites del citoplasma.

Los datos del trabajo experimental con las hipófisis en las diferentes etapas del desarrollo muestran una respuesta dosis dependiente en la secreción de LH ante el estímulo con GnRH. En las cuatro edades estudiadas se observó una mayor magnitud en la respuesta con la concentración de 10^{-7} M de GnRH que con la concentración de 10^{-9} M, mientras que no hubo respuesta significativa con la concentración de 10^{-11} M para ninguna de las cuatro edades estudiadas. Al analizar los datos de manera individual de las hipófisis de los animales de 23 y 45 días de edad se observa una dispersión de los mismos muy grande, incluso desde la secreción basal. Aun lo anterior se observó que cuando los niveles basales de LH se encuentran elevados la respuesta a la GnRH fué siempre superior a los mismos. Posiblemente estas fluctuaciones se deban a que las hipófisis de estos animales se encontraban con diferentes estados de estimulación con la GnRH hipotalámica. Se conoce que en los animales antes del periodo adulto no tienen bien establecido el patrón de secreción pulsátil de GnRH del hipotálamo y presentan picos de liberación de la hormona hipotalámico con

diferente magnitud y duración lo cual hace que las células hipofisiarias presenten diferentes estados de actividad (Ojeda et al 86).

Comparando las concentraciones de LH en el medio de incubación obtenidas se aprecia que las hipófisis de rata adulta secretan mayor cantidad de LH de manera basal y estimulada. Estas concentraciones son menores a las observadas en la etapa puberal, juvenil e infantil. Pero como se pudo observar en la tabla 3.1 la diferencia en el tamaño correlacionado con el contenido protéico de las hipófisis también varia de manera muy marcada siendo mayor en los animales más viejos. De acuerdo a lo anterior se observa una correlación entre secreción de LH y tamaño, contenido de proteínas, de la hipófisis permitiendo suponer que las hipófisis de los animales de las cuatro edades estudiadas secretaban concentraciones de la hormona de manera muy similar. Para corroborar lo anterior se procedió a normalizar los datos con el contenido de proteínas y se encontró que se pierden las diferencias entre las edades de 23, 45 y 90 días, lo cual nos permite suponer que a estas edades la hipófisis presenta una capacidad de secreción semejante. En el caso de las hipófisis de animales de 14 días de edad la secreción de LH fué significativamente mayor que para las otras edades. Además se pudo apreciar que a los 14 días de edad las hipófisis presentan una respuesta a la GnRH mucho mayor que en edades posteriores. Lo anterior es muy claro en las figuras

que corresponden al incremento en la secreción con respecto a la basal cuando las células se encuentran en presencia de la GnRH. Esta respuesta mayor de las hipófisis de 14 días ante el estímulo sugiere que a esta edad la glándula es más sensible a la GnRH. En relación a la temporalidad de la respuesta se observó que las hipófisis de ratas de 14 y 23 días responden de manera significativa desde los 20 minutos después del estímulo y se mantiene estable hasta los 60 minutos. Mientras que en las hipófisis de ratas de 45 y 90 días aumenta su secreción de manera gradual obteniéndose la máxima respuesta hasta el período de 60 minutos. Incluso las hipófisis de 90 días no alcanzan un nivel significativamente diferente con respecto a su basal hasta los 60 minutos con la concentración de 10^{-9} M. De acuerdo a lo anterior parecería que a menor edad las hipófisis de rata presentan una capacidad de responder más rápidamente ante el estímulo con la GnRH. Una posible explicación a las diferencias en la rapidez de la respuesta es la barrera difusional que opone el tejido para el paso de la GnRH y la LH entre el medio de cultivo y las células. En las hipófisis de los animales púberes y adultos el proceso sería más lento por la mayor cantidad de tejido. Ahora bien, en el trabajo clásico de Nakane (1970) se muestra que en la hipófisis de ratas adultas se presenta una disposición periférica de las mismas además de una central concentrada en el área anterior-ventral. En el caso de las hipófisis de los animales de las otras edades no se conoce si la topología de

las células gonadotropas es diferente a la del adulto. En el caso del adulto, lo anterior nos permite suponer que las células localizadas en la porción periférica tuvieron acceso inmediato a la hormona estimulante sin que la difusión de la misma contribuyera al retraso de la respuesta. En el caso de las células localizadas más profundamente probablemente la difusión de la GnRH fué más lenta en las hipófisis de mayor tamaño y contribuyó al retardo en la manifestación de la respuesta.

En relación a la respuesta a la GnRH dada por las hipófisis de 14 días, la cual fué para la concentración de 10^{-9} M semejante a la obtenida con una concentración 100 veces mayor para las otras tres edades estudiadas, una posible explicación es un incremento en el porcentaje de células gonadotropas con respecto a la población general de las células hipofisiarias. Lo anterior se basa en las observaciones de Deneff et al. (1978) y Childs et al. (1981). Estos autores encontraron que en la etapa infantil hay más gonadotropas con respecto a la población total de células hipofisiarias, que en etapas anteriores y posteriores del desarrollo de la rata. Aunado a estos cambios de número también observaron la presencia de diferentes tipos de células gonadotropas. En las hipófisis de los animales en la etapa infantil observaron células pequeñas y redondeadas semejantes a las de la etapa neonatal así como células de mayor tamaño y anguladas como las que se observan en hipófisis de animales adultos, permitiendo suponer que la

etapa infantil corresponde a un periodo de transición. Con respecto a la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH durante el desarrollo Debeljuk et al. (72) encontraron que en la rata hembra existen diferencias en las concentraciones de LH y FSH ante el estímulo con la hormona en distintas etapas del desarrollo postnatal. Ellos encontraron la máxima respuesta entre las edades de 15-25 días de edad, disminuyendo ésta hacia las edades subsecuentes, siendo la respuesta mínima el día 35 de edad, con ligeros incrementos en la etapa adulta. Spona y Luger (1973) llevaron a cabo un estudio de la respuesta a la GnRH por adenohipófisis de ratas macho y hembra de diferentes edades postnatales. Ellos observaron que los machos responden en mayor magnitud a la edad de 10 días comparandola con aquellos de 0 y 20 días de edad, pero no observaron diferencia significativa con las edades de 10, 30 y 40 días, aunque de modo basal la secreción de LH no es significativamente diferente a ninguna de las edades estudiadas excepto a los 40 días de edad, que se encuentra muy elevada. En el caso de las hipófisis de hembra la secreción basal más elevada la apreciaron a los 20 días de edad, también a esta edad se da la máxima respuesta ante la GnRH, seguida por la edad de 10 días. Las ratas hembras en las edades de 40 y 60 días presentan una secreción muy baja de LH tanto de forma basal como estimulada. Es importante hacer notar que en este estudio se utilizó un medio de cultivo adicionado con suero bovino fetal. Además las glándulas se preincubaban

durante tres horas, esto puede haber influenciado la secreción basal, debido a factores que pueden estar presentes en el medio enriquecido con el suero bovino fetal. Dullaart (1976) utilizando un sistema "in vitro" similar al que utilizamos en este estudio encontró un pico en la liberación de LH ante el estímulo con GnRH por hipófisis de hembras entre los días 15-25 de edad pero la dispersión de sus datos fué grande. Las hipófisis de macho, de acuerdo a este investigador, no presentaron variaciones significativas en la secreción de LH en las diferentes edades estudiadas. En contraposición al las observaciones de Dullaart en las ratas macho Ojeda y Jameson (1977) observaron en el animal íntegro una respuesta aumentada ante el estímulo con GnRH en la etapa infantil, con un pico de máxima respuesta alrededor del día 15 de edad. Estos cambios de sensibilidad también se presentaron en las ratas hembras. Por otro lado ha sido publicado que a los 15 días de edad la rata presenta un incremento en la cantidad de receptores a GnRH que coincide con la mayor sensibilidad a esta hormona (Duncan et al 83). En nuestro trabajo pudimos observar en la rata macho diferencias en la sensibilidad de las hipófisis a la GnRH con respecto a la edad del animal, presentandose la máxima respuesta por la hipófisis de 14 días de edad. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Ojeda y Jameson (1977) en el animal íntegro. Además, coinciden con lo observado en hembras. Así mismo difieren en lo que Dullaart (1976) observó para el macho en sus estudios "in vitro". En

relación a estas diferencias es importante señalar diferencias en la metodología que se siguió en los dos trabajos. Dullaart consideró solo un período de preincubación de 30 minutos para la estabilización de las glándulas. De acuerdo a nuestra experiencia se requieren dos períodos de 30 minutos de estabilización ya que en la primera hora después de su remoción la hipófisis libera cantidades grandes de LH. Lo anterior puede explicar las altas concentraciones de LH encontradas por Dullaart lo que pudo enmascarar la respuesta a la GnRH. La metodología de Spona y Luger difiere tanto en el medio de incubación usado como en los tiempos de incubación, por lo que estos resultados no son del todo comparables con el presente trabajo.

CONCLUSIONES

Este trabajo muestra que la sensibilidad a la GnRH por hipófisis de ratas macho, varía en las distintas etapas del desarrollo postnatal de la rata, siendo mayor en la etapa infantil que en etapas subsecuentes y que las variaciones séricas reportadas en la etapa puberal tiene más que ver con cambios en la cantidad de GnRH liberada por el hipotálamo que en la sensibilidad de la hipófisis a la misma. Sería interesante probar con este modelo la respuesta de hipófisis de animales a edades previas a los 14 días, así como la liberación de FSH ante un estímulo similar con GnRH. Así

también probar el efecto que otras hormonas implicadas en el eje hipotálamo-hipófisis-gonada, tienen sobre la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH, tales como testosterona, progesterona, e incluso factores provenientes del sistema inmunológico que pudieran tener implicación en esta respuesta.

BIBLIOGRAFIA

Aubert M.L., Begeot M., Winiger B.P., Morel G., Sizonenko P.C., Dubois P.M. 1985 Ontogeny of GnRH and Pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal Rats. *Endocrinology* 116: 1565-1575.

Becú-Villalobos D., Lacau-Mengido I. M., Libertun C. 1990 Ontogenic studies of the neural control of Adenohipophyseal Hormones in the Rat: Gonadotropins Cellular and Molecular *Neurobiology* 10:473-484.

Bedolla T.N., Ulloa-Aguirre A., Landeros V.P., Pérez-Palacios G. 1984 Análisis de datos y control de calidad en el RIA. Guía para la evaluación de resultados. *Rev. Inv. Clin.* 36: 179-192.

Bercu B.B., Jackson I.M.D., Sawin C.T., Safaii H., Reichlin S. 1977 Permanent impairment of testicular development after transient immunological blockade of endogenous GnRH in neonatal rat. *Endocrinology* 101:1871-1882.

Bercu B.B. 1982 Neutralization of GnRH in neonatal rats with permanent impairment of the hipotalamic-pituitary-testicular axis. *Biology of reproduction* 26: 612 619.

Bradford M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram Quantities of protein utilizing the

principle of protein dye binding, Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Carbajo - Perez E., Watanabe Y.G., 1990 Cellular proliferation in the anterior pituitary of rat during the postnatal period. Cell Tissue Res 261: 333-338.

Catt K.J. 1983 Receptors and actions of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on pituitary gonadotrophs. In Mc-Cann S.M., Dihindsa D.S. Role of peptides and proteins in control of reproduction. Elsevier Press, New York, p 33.

Catt K.J. & Stojilkovic S.S. Calcium signaling and Gonadotropin Secretion, Brief reviews, TEM sept-oct 1989 Elsevier Science Publishing Co., Inc. pp 15-20.

Conn P.M., Dafau M.L. & Catt K.J. 1979 GnRH-stimulated release of LH from rat pituicytes does not require production of cyclic AMP. Endocrinology 104:448-453.

Conn P.M. 1986 The molecular basis of gonadotropin releasing hormone action. Endocr. Rev. 7: 3-10.

Chemes H.E., Dym M, Raj H.G.M., 1979 Hormonal regulation of Sertoli cell differentiation. Biology of Reproduction 21: 251-262.

Chiappa S. A., Fink G. 1977 Releasing factor and hormonal changes in the Hypothalamic-Pituitary-Gonadotrophin and Adrenocorticotrophin systems before and after birth and puberty in male, female and androgenized female rats J. Endocr. 72: 211-224.

Childs G., Ellison D., Foster L., Ramaley A.J., 1981 Postnatal maturation of gonadotropes in male rat pituitary. Endocrinology 109: 1683-1692.

Debeljuk L., Arimura A., Schally A. 1972 Pituitary Responsiveness to LH-Releasing Hormone in Intact Female Rats of Different Ages. Endocrinology 90:1499-1502.

Denef C., Hautekeete E., De Wolf A., Vanderschueren B. 1978 Pituitary Basophils from immature Male and Female Rats: Distribution of Gonadotrophs and Thyrotrophs as Studied by Unit Gravity Sedimentation. Endocrinology 103:724-735.

Döhler K.D. and Wuttke W. 1975 Changes with age in levels of serum gonadotrophins, prolactin and gonadal steroids in prepuberal male and female rats. Endocrinology 97: 898-904.

Dullaart J. 1977 Immature Rat Pituitary Glands in vitro: Age- and Sex- Related Changes in Luteinizing Hormone Releasing Hormone-Stimulated Gonadotrophin Release. J. Endocr. 73:309-

319.

Duncan J., Dalkin A.C., Barkan A., Regiani S., Marshall J.C. 1983 Gonadal regulation of pituitary GnRH receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinology* 113: 2238-2246.

Fink G. Gonadotropin Secretion and its control Ch 32. In *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. 1988 pp 1349-1376.

Goodman H.M. Pituitary Gland CH.2 In *Basic Medical Endocrinology*, Raven Press 1988 pp 27-44.

Grady R.R. 1986 Effect of neonatal treatment with the Sex-Opposite Steroid on Gonadotropin Responsiveness in rats. *Neuroendocrinology* 43: 322-330.

Goldman B.D., Grazia Y.R., Kamberi I.A., Porter J.C. 1971 Serum Gonadotropin Concentrations in Intact and Castrated Neonatal Rats. *Endocrinology* 88:771-778.

Harris G.W. y Donovan B.T. 1966 *The pituitary gland Vol 1 Anterior pituitary* Butterworth & Co.

Hirota K., Hirota T., Aguilera G., Catt K.J. 1985 Hormone induce redistribution of calcium activated phospholipid

dependent protein kinasa in pituitary gonadotrophs, *J. Biol. Chem.* 260:3243.

Hopkins C.R. Walker A.M. 1978 Calcium as a second messenger in the stimulation of luteinizing hormone secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 12: 189.

Huhtaniemi I.T. Katikineni & Catt K.J. 1981 Regulation of LH receptors and steroidogenesis in the neonatal rat testis, *Endocrinology* 109:588-595.

Huhtaniemi I.T., Nozu K., Dwight W.W., Dufau M.L. Catt K.J. 1982 Acquisition of regulatory mechanisms for gonadotropin receptors and steroidogenesis in the maturing rat testis. *Endocrinology* 111: 1711-1719.

Jacobs R., Merrit J., Hallam T., Rink T. 1988 Repetitive spikes in cytosolic calcium evoked by histamine in human endothelial cells. *Nature* 111:1421.

Junier M., Wolff A., Hoffman G., Ma Y., Ojeda S. 1992 Effect of hypothalamic lesions that induce precocious puberty on the morphological and functional maturation of the LHRH neuronal system. *Endocrinology* 131:787-798.

Karanth S., Gill M.K., Dutt A., Lehri N., Juneja H.S. 1986

Ontogeny of serum and pituitary gonadotrophins in male rats treated with low doses of 5 α -dihydrotestosterone. J. Endocr.108:369-375.

Kamberi I.A., Mc Cann S.M. 1972 Effects of implants of testosterone in the Median Eminence and Pituitary on FSH secretion. Neuroendocrinology 9:20-29.

Ketelslegers J., Hetzel W., Sherins R., Catt K. 1978 Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: Plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. Endocrinology 103:212-222.

Kitahara S., Winters S.J., Oshima H. Troen P. 1991 Effects of gonadal steroids on FSH and LH secretion by Pituitary cells from castrated and intact male rats. Biology of reproduction 44:121-126.

Kragt C.L., Dahlgren J. 1972 Development of Neural Regulation of Follicle Stimulating Hormone (FSH) Secretion Neuroendocrinology 9: 30-40.

Krieger D., Hughes J. Neuroendocrinology 1980 pp 3-12 Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Lalau J.D., Aubert M.L., Carmignac D.F., Grégoire I., Dupouy

J. 1990 Reduction in testicular function in rats. Neuroendocrinology 51:284-288.

Langub C., Maley B., Watson R. 1991 Ultrastructural evidence for LHRH neuronal control of estrogen responsive neurons in the preoptic area. Endocrinology 128:27-36.

Lehman M., Karsch F. 1993 Do GnRH, Tyrosine Hidroxilase-, and β -Endorphin-immunoreactive neurons contain Estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in Suffolk Ewe. Endocrinology 133:887-895.

Larrea F., Oliart R.M., Escorza A., Valencia X., Ulloa-Aguirre A. 1988 Mecanismo de acción de las gonadotropinas hipofisiarias y regulación hormonal de la esteroidogénesis. Rev. Invest. Clin 40: 33-45.

Lentz T.L. Cell Fine Structure 1971 pp.307-320. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.

Mackinnon P.C., Mattock J.M. & Haar M.B. 1976 Serum Gonadotrophin levels in male, female and androgenized female rats and the effect of general disturbance on high LH levels. J. Endocr. 70:361-371.

Matsumoto A.M., Karpas A.E., Southworth M.B., Dorsa D.M.,

Bremner W.J. 1986 Evidence for activation of the CNS-Pituitary Mechanism for Gonadotropin Secretion at the time of Puberty in the male rat. *Endocrinology* 119:362-369.

Midgley A.R., Rebar R.W., Niswender G.D. Radioimmunoassays Employing Double Antibody Techniques, In *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology*, September 23-25, 1969. pp. 247-256.

Naor Z. 1990 Signal transduction mechanisms of Ca ++ mobilizing hormones: The case of Gonadotropin-Releasing Hormone. *Endocr. Rev.* 11: 326-338.

Nakane P.K. 1970 Classifications of Anterior Pituitary Cell Types with Immunoenzyme Histochemistry. *The Journal of Histochemistry and Citochemistry* 18: 9-20.

Negro-Vilar A. & Valencia M.M. Male endocrinology and endocrine evaluation of reproductive disorders Ch 5 In *Physiology and Toxicology of male reproduction*, Academic Press Inc. 1988 pp 103-136.

Ojeda S.R., Jameson H.E., Mc Cann S.M. 1977 Developmental changes in pituitary responsiveness to LHRH in the female rat : Ovarian-Adrenal influence during the infantile period.

Endocrinology 100:440.

Ojeda S.R., Andrews W.W., Advis J.P., Smith W.S. 1980 Recent Advances in the Endocrinology of Puberty. Endocrine Reviews 1 N^o3 p 228-257.

Ojeda S.R., Urbanski H.F., Ahmed C.E. The onset of Female Puberty: Studies in Rat. In Recent Progress in Hormone Research V. 42 Academic Press, Inc. 1986 pp 385-442.

Ojeda S.R. & Urbanski H.F. Puberty in the rat Ch 39 In The physiology of reproduction, Raven Press, Ltd. 1988 pp 1699-1737.

Payne A.H., Kelch R.P., Murono E.P., Kerlan J.T. 1977 Hypothalamic, pituitary and testicular function during sexual maturation of the male rat. J. Endocr. 72: 17-26.

Spona J., Luger O. 1973 in vitro Responsiveness of Male Rat Pituitaries of Different Ages to LH-Releasing Hormone (LH-RH). Febs Letters 32:49-51.

Spona J., Luger O. 1973 in vitro Stimulation of LH Release by LH-RH in Female Rat Pituitaries of Different Ages. Febs Letters 32:52-54.

Swerdloff R.F., Walsh P.C., Jacobs H.S., Odell W.D. 1971 Serum LH & FSH during sexual maturation in male rat: Effect of castration and cryptorchidism. *Endocrinology* 88:120-128.

Tixier-Vidal A. & Farquhar M.G. 1975 *Ultrastructure in Biological System Vol 7 The Anterior Pituitary Academic Press* pp 85-93.

Valladares L.E., Ronco A.M., Pino A.M. 1986. RNA synthesis in Leydi cells during sexual maturation in the rat: Effect of LH. *J. Endocr.* 110:551-556.

Vogel D.L., Gunsalus G.L., Bercu B.B., Musto N.A., Bardin W. 1983. Sertoli cell maturation is impaired by neonatal passive immunization with antiserum to LHRH. *Endocrinology* 112:1115.

Volpe P., Krause K., Hashimoto S. 1988 Calciosome, a cytosolic organelle: the inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive Ca^{+2} store of non-muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1091.

Warren D.W., Huhtaniemi I.T., Tapanainen J., Dufau M.L. Catt K.J. 1984 Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. *Endocrinology* 114:470-476.