

03068



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

11
28
21

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

EFFECTO DE LAS HORMONAS OVARICAS SOBRE
LAS RESPUESTAS MEDIADAS POR RECEPTORES
ADRENERGICOS EN EL CEREBRO DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A I

LUZ DEL CARMEN MEDINA BAÑUELOS

DIRECTOR: DR. FERNANDO ANTON TAY



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**A mi familia,
especialmente a mi madre**

Mis agradecimientos a:

El Dr. Carlos Forray Claps por sus valiosas contribuciones en el desarrollo del trabajo de investigación.

El Dr. Carlos Valverde Rodríguez por su ayuda en la revisión del manuscrito final.

El jurado por sus comentarios y sugerencias en la revisión de esta tesis:

**Dr. Fernando Antón Tay
Dr. Roberto Domínguez Casalá
Dr. Flavio Mena Jara
Dr. Manuel Salas Alvarado
Dr. Carlos Valverde Rodríguez**

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofarmacología
Endócrina, Departamento de Biología de la Reproducción,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.**

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
Clasificación de los Receptores Adrenérgicos	5
Mecanismos de Regulación de la Actividad del Receptor β -adrenérgico	5
Desensibilización	6
Desensibilización Homóloga	6
Desensibilización Heteróloga	7
Regulación Cruzada	7
Regulación Hormonal de los Receptores Adrenérgicos	9
Esteroides Adrenales	9
Esteroides Gonadales	10
JUSTIFICACION	13
HIPOTESIS	14
DISEÑO EXPERIMENTAL	15
MATERIAL Y METODOS	16
Preparación de Rebanadas	16
Preparación de Sinaptoneurosomas	17
Ensayo de la Formación de AMPc	17
Ensayo de Unión β -Adrenérgica	18
Análisis Estadístico	18
Materiales	18
RESULTADOS	19
Caracterización de la Actividad Noradrenérgica en Rebanadas de Hipocampo	19
Efecto de Agonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc	19
Efecto de Antagonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc	19
Caracterización de la Actividad Noradrenérgica en Sinaptoneurosomas de Hipocampo	21
Efecto de Agonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc	21

Caracterización de la Actividad Noradrenérgica en Sinaptoneurosomas de Hipotálamo	21
Efecto de Agonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc	21
Efecto de los Esteroides Ováricos sobre la Actividad Noradrenérgica	23
Efecto de los Esteroides Ováricos en Rebanadas de Hipocampo	23
Efecto de los Esteroides Ováricos en Sinaptoneurosomas de Hipocampo	24
Efecto de los Esteroides Ováricos en Sinaptoneurosomas de Hipotálamo	26
Efecto de los Esteroides Ováricos sobre la Unión β-adrenérgica	27
DISCUSION	29
Caracterización de la Actividad Noradrenérgica	29
Regulación por los Esteroides Ováricos sobre la Actividad Noradrenérgica	30
Efecto de los Estrógenos sobre la Actividad de los Receptores β -adrenérgicos	30
Efecto de los Estrógenos sobre la Actividad de los Receptores α_1 -adrenérgicos	31
Efecto de la Progesterona sobre la Actividad de los Receptores α_1 -adrenérgicos	32
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFIA	39

RESUMEN

Este estudio se realizó para determinar: 1) los subtipos de receptores adrenérgicos que intervienen en la síntesis de AMPc estimulada por norepinefrina (NE) en el hipotálamo y el hipocampo de la rata y 2) si los efectos de las hormonas ováricas sobre el sistema noradrenérgico se deben a la modificación en la actividad de estos subtipos de receptores. La actividad de los receptores β y α -adrenérgicos se determinó mediante la cuantificación de la formación de AMPc inducida por agonistas adrenérgicos, en rebanadas de hipocampo y sinaptoneurosomas de hipocampo e hipotálamo de ratas ovariectomizadas (OVX) (testigo) y ratas OVX tratadas con benzoato de estradiol (BE), BE+progesterona (P_4) y P_4 sola. En el hipocampo e hipotálamo de los animales OVX, la NE (agonista total) y el isoproterenol (ISO, agonista β -adrenérgico selectivo) aumentaron significativamente la formación de AMPc. La respuesta a ISO fue menor respecto a la obtenida con NE. Los agonistas metoxamina (α_1 -adrenérgico) y clonidina (α_2 -adrenérgico) por sí solos no modificaron la formación de AMPc. Sin embargo, la adición de metoxamina durante la estimulación con ISO aumentó la producción de cAMP a niveles semejantes a los obtenidos con NE; este efecto no se observó con la clonidina. En las rebanadas de hipocampo, el propanolol (antagonista β -adrenérgico) inhibió significativamente la formación de AMPc inducida por NE; la fentolamina (antagonista α_1 -adrenérgico) produjo una inhibición menor y la yohimbina (antagonista α_2 -adrenérgico) no tuvo efecto significativo. La administración de BE redujo significativamente la producción de AMPc estimulada por ISO en el hipocampo. El BE simultáneamente redujo la respuesta a ISO y aumentó la potenciación por metoxamina sobre la formación de AMPc inducida por ISO en el hipotálamo. La administración de P_4 , sola o combinada con BE, aumentó el efecto potenciador de la metoxamina sobre la producción de AMPc estimulada por ISO en rebanadas de hipocampo; la hormona bloqueó la acción potenciadora de la metoxamina en sinaptoneurosomas de hipotálamo. El análisis de Scatchard de la unión de radioligando a los receptores β , en membranas de hipotálamo e hipocampo de animales OVX y OVX con sustitución hormonal, indica que las modificaciones en la formación de AMPc inducidas por los esteroides ováricos no se correlacionan con cambios en el número o en la afinidad de los receptores β -adrenérgicos. Los resultados de este estudio indican que: 1) en el hipotálamo y el hipocampo de las ratas OVX, la NE estimula la síntesis de AMPc mediante la activación de los receptores β y α -adrenérgicos; 2) los estrógenos disminuyen la actividad de los receptores β y aumentan la actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos en el hipotálamo, mientras que en el hipocampo sólo reducen la actividad de los receptores β ; 3) la P_4 aumenta la actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos en el hipocampo y en el hipotálamo bloquea su actividad.

SUMMARY

The present study was undertaken to determine 1) the adrenergic receptor subtypes involved in norepinephrine stimulated cAMP synthesis in the female rat hypothalamus and hippocampus and 2) whether the effects of ovarian hormones on the noradrenergic system could be due to a modification of these receptor subtype activity. The activity of β and α -adrenergic receptors was assessed by measuring the cAMP formation induced by adrenergic agonists in hippocampus slices and hippocampus and hypothalamus synaptoneuroosomes either from ovariectomized (OVX) rats (controls) or from OVX rats treated with estradiol benzoate (BE), progesterone (P₄) or a combination of both hormones. In OVX animals, NE (a total agonist) and isoproterenol (ISO, a β selective agonist) significantly highered the cAMP levels in the hippocampus and the hypothalamus. The response to ISO was less than the response to NE. Agonists methoxamine (an α_1 -adrenergic agonist) and clonidine (an α_2 -adrenergic agonist) did not by themselves modify the cAMP levels. However, methoxamine- but not clonidine- addition during ISO stimulus, increased the cAMP formation to levels similar to those observed with NE. In hippocampus slices, propranolol (a β -adrenergic antagonist) effectively inhibited NE-induced cAMP formation; phentolamine (an α_1 -adrenergic antagonist) showed a smaller inhibition, while yohimbine (an α_2 -adrenergic antagonist) showed no significant effect. BE administration significantly reduced the responsiveness to ISO in the hippocampus but simultaneously enhanced methoxamine potentiation of ISO-induced hypothalamus cAMP formation. P₄ treatment alone or combined with BE, increased methoxamine potentiation of the hippocampus slices response to ISO while it eliminated methoxamine increase of ISO response in the hypothalamus synaptoneuroosomes. A Scatchard plot analysis of radioligand binding to the β -adrenergic receptor in hypothalamus membranes and hippocampus from OVX and hormone treated animals shows that hormone dependent modifications of cAMP accumulation do not correlate with either changes in β -adrenergic receptor number or with binding affinity. These results suggest that 1) NE-stimulated cAMP synthesis in OVX rat hypothalamus and hippocampus is effected through β and α_1 -adrenergic receptor activation 2) estrogens reduce β but increase α_1 -adrenergic receptor activity in the hypothalamus and reduce β receptor activity only in the hippocampus and 3) P₄ increases α_1 -adrenergic receptor activity in the hippocampus while blocking this activity in the hypothalamus.

INTRODUCCION

Clásicamente se reconoce que las acciones de las hormonas esteroides en el Sistema Nervioso Central (SNC) comprenden dos tipos de efectos: 1) **organizacionales** que son inducidas principalmente durante un período específico del desarrollo cerebral y que producen una modificación permanente en la estructura y función neuronal; y 2) **activacionales** que son reversibles y se ejercen repetidamente a lo largo de toda la vida del organismo (McEwen y col., 1982; Pfaff y McEwen, 1983).

Los efectos **activacionales** de los esteroides incluyen desde la modulación de procesos metabólicos neuronales hasta la regulación de procesos integrativos como la conducta, estados afectivos, aprendizaje y memoria, respuestas adaptativas a las modificaciones ambientales, así como su participación como señales específicas en el control neuroendócrino de la secreción de hormonas adenohipofisarias (McEwen y Parsons, 1982; De Kloet, 1991).

El mecanismo principal de acción de las hormonas esteroides involucra su unión a receptores nucleares específicos y la regulación de la transcripción genómica, por lo que la manifestación del efecto biológico presenta períodos de latencia de horas a días (Yamamoto, 1985; Beato y col., 1989). Sin embargo, también se han descrito efectos con latencias en el orden de segundos o minutos, que muy probablemente implican un mecanismo de acción mediado por la interacción de la hormona con sitios membranales específicos (Schumacher, 1990a; McEwen, 1991).

En el control neuroendócrino de la secreción de gonadotrofinas, los esteroides ováricos no parecen ejercer su acción de retroalimentación directamente en las neuronas hipotalámicas que sintetizan la hormona liberadora de gonadotrofinas (LHRH), dado que estas neuronas no contienen receptores a estrógenos ni a progesterona (P₄) (Shivers y col., 1983; Fox y col., 1990). La transmisión de la información de las neuronas que concentran esteroides ováricos a las neuronas LHRHérgicas es mediada por diferentes sistemas de neurotransmisión, entre los cuales el sistema noradrenérgico juega un papel importante (Kalra, 1986; Kordon y col., 1994).

La evidencia actual acerca de la participación del sistema noradrenérgico en el control de la secreción de gonadotrofinas, puede resumirse de la siguiente manera:

- 1) Numerosas terminaciones noradrenérgicas, que se originan en el tallo cerebral (principalmente en los grupos celulares A₁, A₂ y locus coeruleus) se asocian estrechamente con los cuerpos celulares de las neuronas que sintetizan la hormona liberadora de gonadotrofinas (LHRH) (Moore y Bloom, 1979; Jennes y col., 1982).
- 2) La liberación de norepinefrina (NE) en las sinapsis noradrenérgicas hipotalámicas, inducida por activación de las neuronas del grupo celular A₁ y del locus coeruleus, aumenta la secreción de la luteotropina (LH) hipofisaria. La respuesta es bloqueada por la administración de inhibidores de la síntesis de NE (Gitler y Barraclough, 1987a,b, 1988; Herbinson y col., 1990).

- 3) La alteración en la actividad noradrenérgica hipotalámica se asocia con modificaciones en la liberación de LHRH y en la descarga pulsátil de LH. El recambio de NE en los núcleos preóptico medial, arqueado, supraquiásmático y en la eminencia media, es mayor durante los períodos en los que la síntesis y secreción de LHRH y LH se encuentran aumentadas, por ejemplo durante el proestro en ratas normales y después de la administración de esteroides ováricos en ratas ovariectomizadas (OVX) (Honma y Wuttke, 1980; Wise y col., 1981; Rance y col., 1981).
- 4) Los efectos moduladores de la NE sobre la liberación de gonadotrofinas, dependen del ambiente hormonal. En ratas OVX la NE inhibe la liberación de LHRH, pero en animales normales y en animales OVX tratados con esteroides ováricos la NE estimula la liberación de LHRH. La acción facilitadora de la NE parece ser mediada por activación de los receptores α -adrenérgicos y la acción inhibitoria por activación de los receptores β -adrenérgicos, localizados en las sinapsis noradrenérgicas (Cáceres y Taleisnik, 1980; Drouva y col., 1982; Taleisnik y Sawyer, 1986; Brann y Mahesh, 1991; Wessner y col., 1993).

Aún cuando la información anterior refleja un avance importante en el conocimiento de la participación de la interacción de los esteroides ováricos con las neuronas noradrenérgicas en el control de la secreción de gonadotrofinas, la valoración del efecto específico de los esteroides ováricos sobre el sistema noradrenérgico es difícil, ya que:

- 1) La mayoría de los estudios se han realizado en el hipotálamo, sin tomar en cuenta que la actividad neuronal depende, tanto de las fluctuaciones cíclicas de las hormonas ováricas, como de la actividad rítmica propia de los núcleos marcapaso incluidos en esta área cerebral.
- 2) En la mayoría de los casos, los diseños experimentales no permiten diferenciar si el efecto de los esteroides se debe a su acción sobre el metabolismo neuronal en general, o a sus efectos de retroalimentación sobre neuronas localizadas en una red neuronal específica en el control de la secreción de gonadotrofinas. Esto se debe en parte a que hasta muy recientemente se tiene un conocimiento más preciso de las entradas que recibe una neurona determinada.
- 3) Los efectos de la manipulación de hormonal no son tomados en cuenta ni discutidos en términos de los fenómenos de autorregulación de la actividad sináptica, como la hipersensibilización, desensibilización y regulación cruzada.

Debido a estas limitaciones, la información disponible en relación a los mecanismos por los cuales los esteroides modulan la neurotransmisión noradrenérgica en el SNC es incompleta. De ahí que, en este trabajo nos interesó el estudio de los efectos de los esteroides ováricos sobre los cambios neuroquímicos que ocurren a nivel de la transmisión sináptica, en particular sobre la actividad del sistema receptor β -adrenérgico-adenilato ciclasa. La información obtenida en este sentido puede ser relevante, ya que además de ayudar a precisar la acción moduladora de los esteroides sobre los circuitos noradrenérgicos que intervienen en el control de la secreción de

gonadotropinas, puede dar información de la manera en que las neuronas proceden metabólicamente para el manejo de las señales extracelulares.

CLASIFICACION DE LOS RECEPTORES ADRENERGICOS

Los receptores adrenérgicos se han clasificado en 3 tipos (α_1 , α_2 y β) y varios subtipos, dependiendo de sus características farmacológicas y de las vías de transducción de la señal que desencadenan. En términos generales, los receptores β -adrenérgicos se acoplan a la proteína unidora de nucleótidos de guanina estimuladora (Gs), activan a la adenilato ciclasa y aumentan la concentración intracelular de AMPc; los receptores α_2 -adrenérgicos se acoplan a la proteína G inhibitoria (Gi) y disminuyen la actividad de la adenilato ciclasa y la concentración intracelular de AMPc (Gilman, 1987; Strosberg, 1990; Summers y McMartin., 1993).

Los receptores α_1 -adrenérgicos activan a un efector diferente, la fosfolipasa C, que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5,-bifosfato e induce la formación de los segundos mensajeros: inositol 1,4,5-trisfosfato y diacilglicerol, responsables de la movilización de calcio intracelular y activación de la proteína cinasa C, respectivamente (Nishizuka, 1988; Berridge, 1993). La naturaleza exacta de la proteína G que interviene en el acoplamiento entre el receptor α_1 -adrenérgico y la fosfolipasa C no se ha determinado, pero se ha sugerido que podría ser algún miembro de la familia Gq (Smarcka y col., 1991; Wu y col., 1992).

La activación simultánea de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos por la NE, implica que la respuesta neuronal depende del nivel de actividad de cada uno de los receptores y de las diferentes interacciones que se establecen entre ellos.

MECANISMOS DE REGULACION DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR β -ADRENERGICO

La sensibilidad de los receptores β -adrenérgicos a la NE es regulada dinámicamente. En la sinapsis existen mecanismos de control que, por un lado, permiten que la neurona postsináptica responda rápidamente al agonista y, por el otro, la protegen contra alteraciones extremas y sostenidas en la liberación de NE. Así, en condiciones en las que disminuye la cantidad de neurotransmisor en el espacio sináptico, se presenta un aumento en la sensibilidad de los receptores al agonista (**hipersensibilización**), mientras que en situaciones en que los receptores están expuestos a cantidades elevadas del neurotransmisor, se presenta una disminución en la sensibilidad al agonista (**desensibilización**).

Desensibilización

Aún cuando en el proceso de desensibilización intervienen diversos mecanismos bioquímicos, se han identificado 2 patrones generales: la **desensibilización homóloga** que se caracteriza por una disminución en la sensibilidad de la adenilato ciclasa, limitada al receptor específico ocupado por el agonista y la **desensibilización heteróloga** en la que se presenta una disminución en la respuesta no sólo del receptor ocupado por el agonista, sino de otros receptores acoplados al mismo sistema de transducción de la señal (Harden, 1983; Sibley y Lefkowitz, 1985; Sibley y col., 1987; Benovic y col., 1988).

En términos conceptuales esta división representa un acercamiento útil para el estudio del fenómeno de desensibilización. Sin embargo, no siempre es clara, ya que en muchas situaciones ambos procesos ocurren simultáneamente y varios sistemas celulares pueden utilizar combinaciones de los diferentes mecanismos de desensibilización.

Desensibilización Homóloga

La desensibilización homóloga del receptor β -adrenérgico involucra al menos tres etapas diferentes: **a)** el **desacoplamiento** inicial rápido (segundos a minutos) del receptor de la Gs, sin pérdida detectable en el número de receptores; **b)** **secuestro**, a los pocos minutos de estimulación por el agonista, los receptores son secuestrados en vesículas subcelulares, en donde permanecen inaccesibles al agonista y alejados del resto de los componentes del sistema (Gs y adenilato ciclasa); **c)** **regulación a la baja**, después de la exposición prolongada al agonista (horas), el número de receptores disminuye por la reducción en su síntesis o el aumento en su degradación (Benovic y col., 1988; Hausdorff y col., 1990).

Un evento clave que interviene en el proceso de desensibilización es la fosforilación del receptor, catalizada por la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y por una proteína cinasa específica, denominada receptor β -adrenérgico cinasa (β -ARK). La β -ARK es una enzima citosólica que fosforila sólo la forma del receptor ocupado por el agonista; la unión del agonista al receptor induce la translocación de la enzima a la membrana en donde fosforila sitios específicos del receptor β -adrenérgico. Esta modificación promueve el desacoplamiento parcial del receptor β -adrenérgico de Gs y facilita la unión de un cofactor, denominado β -arrestina, que previene por completo la interacción del receptor con Gs (Benovic y col., 1986, 1987, 1989, 1991; Lefkowitz y col., 1990; Lohse y col., 1990a, b; Pitcher y col., 1992; Chen y col., 1993).

La contribución relativa de los mecanismos mediados por la PKA y por la β -ARK en la desensibilización homóloga parece estar determinada por las características cinéticas de cada una de las reacciones.

Se ha propuesto que la fosforilación del receptor catalizada por la β -ARK y la desensibilización subsiguiente es importante en el cerebro, en donde los receptores sinápticos están expuestos, tanto a cambios rápidos, como a cantidades elevadas de catecolaminas (Hausdorff y col., 1990; Lohse y col., 1990a; Roth y col., 1991). En apoyo a esta hipótesis se ha descrito, mediante el análisis de los mRNAs, que existen dos subtipos de β -ARKs (β ARK1 y β ARK2) y de β -

arrestinas (β -Arrestina1 y β -Arrestina2) que son expresados principalmente en el cerebro (Benovic y col., 1989, 1991; Lohse y col., 1990b; Attramadal y col., 1992).

La desensibilización dependiente de PKA, dado que es un mecanismo de desensibilización lenta y que ocurre a concentraciones bajas del agonista, es probable que no sea un mecanismo de regulación eficaz para los receptores β -adrenérgicos predominantes en el cerebro (β_1), pero sí adecuado para la modulación de la sensibilidad de los receptores β predominantes en los tejidos periféricos (β_2) (Hausdorff y col., 1990; Roth y col., 1991).

Desensibilización Heteróloga

En la desensibilización heteróloga se presenta una disminución más general de la respuesta celular, debido a la modificación en los diferentes componentes del sistema β -adrenérgico (receptor, proteína G y adenilato ciclasa).

La modificación a nivel del receptor β -adrenérgico involucra la fosforilación catalizada por la PKA, que es activada en respuesta a la estimulación del receptor o a cualquier estímulo que incremente la concentración intracelular de AMPc. La PKA fosforila sitios específicos del receptor β -adrenérgico e inhibe su acoplamiento con la proteína Gs (Benovic y col., 1985; Clark y col., 1988, 1989; Lefkowitz y col., 1990).

En varios tipos celulares, la desensibilización heteróloga se acompaña de modificaciones en la cantidad o en la actividad de la proteína Gs (Kassis y Fishman, 1982; Garrity y col., 1983; Premont e Iyengar, 1989) o de la proteína Gi (Hadcock y col. 1990; Reithman y col., 1991), la adenilato ciclasa también puede ser modificada directamente durante el proceso (Premont y col., 1992).

Regulación Cruzada

El análisis de los eventos que ocurren en condiciones de estimulación sostenida de un receptor ha permitido identificar alteraciones en la sensibilidad y en la expresión de los componentes de los sistemas de transducción acoplados a otros receptores, fenómeno denominado "**regulación cruzada**" (Hadcock y col., 1990; Morris y col., 1991). Este tipo de regulación permite explicar la manera en que la célula puede procesar e integrar la información que recibe de agonistas endógenos, como la NE, que activan vías múltiples de transducción de la señal. La NE induce la estimulación e inhibición de la adenilato ciclasa, mediada por los receptores β y α_2 -adrenérgicos, respectivamente, y la estimulación de la fosfolipasa C, mediada por los receptores α_1 -adrenérgicos.

La activación persistente de los receptores β -adrenérgicos, no sólo desensibiliza a este sistema, sino que ejerce una regulación cruzada sobre los receptores acoplados de manera inhibitoria a la adenilato ciclasa, aumentando su sensibilidad al agonista (Hadcock y col., 1990; Sakae y Hoffman 1991). Asimismo, la estimulación prolongada de los receptores acoplados a la inhibición de la adenilato ciclasa, por un lado, desensibiliza a estos receptores y, por el otro,

incrementa la actividad de los receptores acoplados a la vía estimuladora de la enzima (Jones y col., 1987; Hadcock y col., 1991; Port y col., 1992).

La regulación cruzada también se extiende a la vía estimuladora de fosfolipasa C; la activación persistente de los receptores β -adrenérgicos aumenta la actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos (Morris y col., 1991). Cambios en el sentido opuesto se presentan como consecuencia de la estimulación prolongada de los receptores acoplados a la fosfolipasa C, que produce un incremento en la sensibilidad del sistema de adenilato ciclasa (Johnson y Towes, 1990).

La comunicación entre diferentes vías de transducción de la señal también opera como un mecanismo de integración a corto plazo, durante la activación simultánea de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos. De esta forma, el repertorio de respuestas celulares es aumentada por estas interacciones que pueden ser sinérgicas, potenciadoras o antagonicas.

En el cerebro se ha demostrado que la NE estimula la síntesis de AMPc, mediante la activación de los receptores α_1 y β -adrenérgicos. Los receptores α_1 -adrenérgicos no se encuentran acoplados directamente a la adenilato ciclasa, pero ejercen un efecto potenciador sobre la respuesta de los receptores β -adrenérgicos en distintas áreas cerebrales (Daly y col., 1980a, 1981; Leblanc y Ciaranello, 1984; Vanacek y col., 1985; Pilc y Enna, 1985; Johnson y Minneman, 1986; Stone y Herrera, 1986; Etgen y Petitti, 1987; Duman y Enna, 1987; Robinson y Kendall, 1989a,b). Se ha sugerido que los receptores α_2 también pueden potenciar la respuesta β -adrenérgica (Pilc y Enna, 1986; Petitti y Etgen, 1989).

Aún cuando no se ha establecido el mecanismo por el cual los receptores α_1 potencian la respuesta de los receptores β -adrenérgicos, se han propuesto varias hipótesis para explicar el fenómeno. Dado que se requiere de la entrada de calcio extracelular para que se presente esta respuesta (Schwabe y Daly, 1977; Duman y col., 1986), se ha sugerido que las enzimas dependientes de calcio, como la fosfolipasa A₂ (Duman y col., 1986; Ho y Klein, 1987; Chik y col., 1991) y la proteína cinasa C (Hollingsworth y col., 1985a; Karbon y col., 1986; Sugden y Klein, 1988; Anand-Srivastava y Srivastava, 1990; Gusovsky y Gutkind, 1991; Houslay, 1991) intervienen en el proceso.

Estas dos posibilidades no son excluyentes, ya que el aumento en la producción de AMPc, mediado por los receptores α_1 -adrenérgicos, puede ocurrir por mecanismos asociados, tanto a la fosfolipasa A₂, como a la fosfolipasa C. La fosfolipasa A₂, activada por la entrada de calcio extracelular, induce la liberación de ácido araquidónico a partir de fosfolípidos membranales y éste puede estimular directamente a la cinasa C. El diacilglicerol formado por activación de la fosfolipasa C, acoplada al receptor α_1 -adrenérgico, activa a la proteína cinasa C (McPhail y col., 1984; Murakami y Routtenberg, 1985; Axelrod y col., 1988). Por lo tanto, la activación de la cinasa C, ya sea por la estimulación de la fosfolipasa C y la formación de diacilglicerol o por la activación de la fosfolipasa A₂ y la liberación de ácido araquidónico, puede ser un evento clave en la regulación α_1 -adrenérgica de la formación de AMPc.

La cinasa C es capaz de actuar sobre los diferentes componentes del sistema β -adrenérgico y regular la formación de AMPc. La cinasa C puede fosforilar a la Gs y aumentar su actividad o facilitar su acoplamiento con la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa (Bell y col., 1985), puede fosforilar a la Gi y disminuir su capacidad para inhibir a la adenilato ciclasa e incrementando la sensibilidad de la adenilato ciclasa a la activación por Gs (Katada y col., 1985; Watanabe y col., 1985; Bell y Brunton, 1986) o puede fosforilar directamente a la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa (Yoshimasa y col., 1987; Simmoteit y col., 1991).

La participación de la cinasa C en los mecanismos que intervienen en la modulación α_1 de la respuesta β -adrenérgica, no parece ser un mecanismo general, ya que en la corteza cerebral de rata el fenómeno de potenciación α_1 -adrenérgica sobre la síntesis de AMPc, estimulada por el receptor β , no es mediado por la cinasa C ni por la fosfolipasa A₂ (Robinson y Kendall, 1989a). Una explicación probable es la participación de una población de receptores α_1 -adrenérgicos, que no se asocian con la activación de estas enzimas.

En el cerebro de rata se han identificado al menos dos subtipos de receptores α_1 , con diferentes propiedades farmacológicas y bioquímicas: α_{1a} y α_{1b} (Morrow y Creese, 1986; Johnson y Minneman, 1987; Bylund, 1992). Los receptores α_{1b} inducen principalmente un aumento rápido en la formación de 1,4,5-trisfosfato y la liberación de calcio de depósitos intracelulares, mientras que los receptores α_{1a} promueven la entrada de calcio extracelular a través de canales sensibles a voltaje (Han y col., 1987; Minneman, 1988; Wilson y Minneman, 1990). Es probable que en tejidos como la corteza cerebral de rata, en los cuales el efecto potenciador del sistema α_1 -adrenérgico sobre la formación de AMPc aparentemente es independiente de la activación de la cinasa C y de la fosfolipasa A₂ (Robinson y Kendall, 1989a,b), el aumento en la disponibilidad de calcio intracelular, por activación de los receptores α_{1a} , sea el factor determinante en la modulación de la interacción entre los receptores α_1 y β -adrenérgicos.

REGULACION HORMONAL DE LOS RECEPTORES ADRENERGICOS

Entre las acciones celulares de los esteroides destaca su participación como moduladores de la respuesta celular a los efectos de la NE, "acción permisiva" (Ros y col., 1988; Malbon y col., 1988). Gran parte de la información que existe en este sentido, se ha obtenido del estudio con los glucocorticoides.

Esteroides Adrenales

Un sitio importante de modulación por los esteroides adrenales en la sinapsis noradrenérgica es el sistema de adenilato ciclasa sensible a NE. Esta regulación se ha estudiado en modelos experimentales que producen cambios crónicos en las concentraciones circulantes de esteroides, como el estrés, la adrenalectomía y la administración de adrenocorticotropina (ACTH) o corticosterona. La adrenalectomía aumenta la sensibilidad de la adenilato ciclasa a la NE, mientras que el estrés y la administración crónica de ACTH o corticosterona disminuyen la sensibilidad de la enzima en la corteza cerebral de rata (Mobley y Sulser, 1980a,b; Mobley y col., 1983; Stone y col., 1987).

Los efectos "permisivos" de los glucocorticoides sobre la sensibilidad del sistema de adenilato ciclasa pueden ser ejercidos en los distintos componentes del sistema: *receptor* (Foster y Harden, 1980; Nakada y col., 1987), *adenilato ciclasa* (Johnson y Jaworski, 1983; Rodan y col., 1984; Forray y Richelson, 1985; Ros y col., 1989a) y *proteína G* (Rodan y Rodan, 1986; Lacasa y col., 1988; Ros y col., 1989b).

En varios tipos celulares, el aumento en la sensibilidad a los agonistas β se asocia con un incremento en el nivel de expresión del receptor β -adrenérgico (Foster y Harden, 1980; Norris y col., 1987; Hadcock y Malbon, 1988). Esta acción ocurre por la unión del complejo hormona-receptor a secuencias específicas de DNA, denominadas elementos de respuesta, que están presentes en el gen del receptor β -adrenérgico (Emorine y col., 1987; Malbon y Hadcock, 1988).

Existe poca información acerca de los efectos hormonales sobre la regulación de las proteínas G en el SNC, pero se ha demostrado que la adrenalectomía disminuye significativamente la cantidad de la subunidad α de la proteína Gs y la administración subsecuente de corticosterona aumenta y disminuye la cantidad de las subunidades α de las proteínas Gs y Gi, respectivamente, en la corteza cerebral de rata (Saito y col., 1989).

Esteroides Gonadales

Al igual que los glucocorticoides, los esteroides ováricos modulan el sistemas de adenilato ciclasa sensible a NE en varias regiones cerebrales (Gunaga y col., 1974; Wagner y col., 1979; Wagner y Davis, 1980; Etgen y Pettitti, 1986; Harrelson y McEwen, 1987). En el área preóptica y el hipotálamo la producción de AMPc estimulada por NE varía durante el ciclo estral; la mayor concentración del nucleótido coincide con los periodos en que existen concentraciones elevadas de estradiol en plasma (Davis, 1978, Zubin y Taleisnik, 1983; Etgen Pettitti, 1986). La administración combinada de estrógenos y P₄ a ratas OVX disminuye la formación de AMPc estimulada por NE en el área preóptica, hipotálamo e hipocampo (Etgen y Pettitti, 1987; Harrelson y McEwen, 1987; Pettitti y Etgen, 1989).

La información acerca del efecto de los esteroides sobre el número de receptores adrenérgicos es contradictoria. Se ha reportado que la administración aguda de estrógenos a ratas OVX aumenta el número de receptores β -adrenérgicos en el hipotálamo (Wilkinson y col., 1979) y el hipotálamo medio basal (Vacas y Cardinali, 1980), disminuye en el hipotálamo y la adenohipófisis (Petrovic y col., 1985) o no altera su concentración en el área preóptica, hipotálamo (Etgen y Karkanias, 1990), corteza cerebral (Vacas y Cardinali, 1980; Petrovic y col., 1985; Etgen y Karkanias, 1990) o glándula pineal (Vacas y Cardinali, 1980). El tratamiento crónico con estrógenos disminuye la cantidad de receptores β en el hipotálamo (Wagner y col., 1979; Wilkinson y col., 1983), corteza cerebral (Wagner y col., 1979; Biegon y col., 1983), cuerpo estriado, bulbo olfatorio (Wagner y col., 1979) y adenohipófisis (Petrovic y col., 1985) o no los modifica en el hipotálamo (Petrovic y col., 1985).

En el caso de los receptores α -adrenérgicos, los reportes iniciales no señalan cambios en el número de receptores por efecto de los estrógenos (Wilkinson y col., 1979; Vacas y Cardinali,

1980; Ambrosio y col., 1984). Sin embargo, los estudios de unión con ligandos específicos para los subtipos de receptores α -adrenérgicos, indican que el tratamiento **agudo** con estradiol aumenta el número de sitios α , en el hipotálamo y el área preóptica de la rata (Etgen y Karkanas, 1990) y la administración **crónica** de la hormona incrementa la cantidad de estos receptores en el núcleo del tracto solitario (Shackelford y col., 1988). La administración de P₄ a los animales pretratados con estradiol no modifica la unión a ninguno de los subtipos de receptores α -adrenérgicos en el hipotálamo y el área preóptica (Etgen y Karkanas, 1990).

A partir de estos datos es difícil valorar el efecto de los esteroides ováricos sobre la regulación en la cantidad de receptores adrenérgicos, ya que:

- 1) En la mayoría de los estudios mencionados, los ensayos de unión se realizaron en regiones cerebrales grandes y utilizando ligandos que no discriminan entre los subtipos de receptores α y β -adrenérgicos.
- 2) Las determinaciones se realizaron a horas del día en que las diferencias en la cantidad de receptores no son obvias, por ejemplo durante la mañana.
- 3) En ninguno de los reportes se considera que, además del estado hormonal, otros factores fisiológicos como el fotoperíodo y la actividad neuronal intrínseca regulan la cantidad de receptores.

Como se mencionó anteriormente, la regulación homóloga en el número de receptores adrenérgicos está determinada por el grado de actividad neuronal, que depende de la cantidad de neurotransmisor que llega a la postsinapsis.

Por su parte, el fotoperíodo influye de manera importante no sólo sobre la cantidad de receptores, sino sobre la mayoría de los eventos de la neurotransmisión, ya que la concentración de NE, las enzimas que intervienen en su metabolismo, y la cantidad de receptores presentan variaciones circádicas en el SNC (Wirz-Justice, 1987). Los ritmos presentan un patrón determinado en cada región y pueden ser diferentes aún dentro de los núcleos de una misma región cerebral (por ejemplo en el hipotálamo), de tal forma que la suma de todos los núcleos incluidos en bloques grandes de tejido, que generalmente se utilizan en los ensayos de unión, no permite valorar el efecto específico de los esteroides sobre la cantidad de receptores adrenérgicos.

Debido a las dificultades metodológicas, existen muy pocos estudios en los que se haya investigado el efecto de los esteroides ováricos en núcleos cerebrales, considerando las variaciones dependientes del fotoperíodo. Weiland y Wise (1987, 1989), mediante autorradiografía cuantitativa, que permiten determinar la cantidad de receptores en núcleos cerebrales discretos, demuestran que en ratas OVX la concentración de receptores α , presenta un ritmo diurno en los núcleos supraquiasmático y preóptico medial y en la glándula pineal, que es alterado por la administración **aguda** de estradiol. El tratamiento hormonal no sólo modifica esta variación rítmica, sino que disminuye el número de receptores α -adrenérgicos en estas regiones, en la eminencia media y en el núcleo ventromedial.

En el caso de los receptores β , la variación diurna en la concentración de receptores β_1 -adrenérgicos se presenta en la eminencia media, el núcleo ventromedial y la glándula pineal de ratas OVX, mientras que el ritmo en la cantidad de receptores β_2 -adrenérgicos se presenta sólo en el núcleo supraquiasmático. El tratamiento con estradiol tiene efectos diferentes en estas áreas cerebrales: suprime el ritmo de los receptores β_1 en la eminencia media y en el núcleo ventromedial y de los receptores β_2 en el núcleo supraquiasmático; aumenta selectivamente el número de receptores β_1 en el núcleo preóptico medial; disminuye el número de receptores β_2 en el núcleo supraquiasmático y reduce la cantidad de ambos subtipos en la glándula pineal (Weiland y Wise, 1987, 1989).

Estos datos indican que los resultados de los estudios, en los que no se considera las variaciones circádicas y que se realizan en áreas grandes de tejido, no son concluyentes para explicar los efectos inducidos por los esteroides ováricos.

JUSTIFICACION

Debido a la naturaleza heterogénea del hipotálamo y a la dificultad metodológica en el estudio de núcleos hipotalámicos, en este trabajo realizamos gran parte de los experimentos en el hipocampo.

La organización celular del hipocampo es homogénea y su estructura y sinaptología se han caracterizado en detalle (Ramón y Cajal, 1911; Lopes da Silva y col., 1990). Numerosas terminaciones noradrenérgicas, provenientes del locus coeruleus se distribuyen por todo el hipocampo (Jones y Moore, 1977; Loy y col., 1980) y las terminaciones sinápticas contienen receptores, tanto β (el subtipo β_1 , es el dominante), como α -adrenérgicos (el subtipo α_1 , es el dominante) (Zilles y col., 1991; Booze y col., 1993).

Los estudios inmunoenzimáticos y de hibridación "in situ", indican la presencia de cantidades elevadas de receptores a esteroides ováricos en el hipocampo de la rata (Pelletier y col., 1988, Maggi y col., 1989; Simerly y col., 1990; Bettini y col., 1992). Además, algunos de los efectos de los esteroides son mediados por su acción a nivel membranal (Dorner y col., 1980; Foy y Teyler, 1982; Wong y Moss, 1991).

El hipocampo interviene en el control de la secreción de gonadotrofinas y de la conducta sexual femenina (Velasco y Taleisnik, 1969; Kawakami y col., 1973; Maggi y Perez, 1985) y se han descrito diferencias sexuales y efectos de los esteroides gonadales sobre su morfología (Wimer y Wimer, 1985; Morse y col., 1986; Britton, 1993), concentración de neurotransmisores, enzimas y receptores (Loy y Sheldon, 1987; Luine, 1985; Beck y col., 1990) y actividad eléctrica (Teyler y col., 1980; Dorner y col., 1980; Foy y Teyler, 1983; Wong y Moss, 1991).

Así, el hipocampo puede ser un buen modelo para el estudio de la actividad noradrenérgica central y de los efectos de los esteroides ováricos sobre la sinapsis noradrenérgica.

HIPOTESIS

Los mecanismos mediante los cuales las hormonas ováricas modulan la neurotransmisión noradrenérgica en el SNC no se han determinado. La regulación de los sistemas noradrenérgicos centrales por los esteroides ováricos probablemente se debe a que inducen cambios específicos en la actividad de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos, lo que se traducen en modificaciones en el grado de "regulación cruzada" de las vías de transducción de la señal a las que se encuentran acoplados.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Una aproximación experimental al estudio de la actividad de las neuronas noradrenérgicas es la caracterización de las respuestas de los subtipos de receptores a los que se une la norepinefrina. En este trabajo evaluamos la actividad del receptor β -adrenérgico mediante la cuantificación del AMPc formado en función del estímulo específico (NE y sus agonistas y antagonistas). La modificación de la respuesta β -adrenérgica por estimulación del componente α -adrenérgico, se tomó como índice de la actividad de los receptores α -adrenérgicos.

La actividad del sistema receptor β -adenilato ciclasa se estudió tanto en rebanadas, como en sinaptoneurosomas de hipocampo e hipotálamo de ratas ovariectomizadas (OVX), con y sin sustitución hormonal.

La mayoría de los estudios sobre la actividad del sistema β -adrenérgico cerebral se han realizado en rebanadas. En este trabajo también se utilizaron sinaptoneurosomas, ya que se ha reportado que esta preparación presenta varias ventajas respecto a las rebanadas. Los sinaptoneurosomas son una preparación en la cual se produce menor destrucción neuronal respecto a los homogenados y contiene una gran cantidad de terminaciones presinápticas y postsinápticas. La captación de adenina marcada es mayor, por lo que el porcentaje de cambio inducido por las modificaciones en la actividad de la adenilato ciclasa es más aparente (Hollingsworth y col., 1985a,b). Los ensayos realizados con esta preparación presentan mayor sensibilidad y reproducibilidad, lo que nos permitió valorar las modificaciones en la formación de AMPc en el hipotálamo.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) (180-200 g), obtenidas del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Los animales se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad 10:14 horas, temperatura de 22-25°C y acceso libre a agua y alimento (Purina). Los animales se ovariectomizaron bilateralmente y 2 semanas después de la operación se dividieron en los siguientes grupos:

- 1) Animales OVX tratados subcutáneamente (s.c.) con vehículo (aceite de ajonjolí).
- 2) Animales OVX tratados s.c. con benzoato de estradiol (BE, 5 µg/ 0.1 ml de aceite de ajonjolí) 48 horas antes del sacrificio.
- 3) Animales OVX tratados con BE (5 µg/ 0.1ml, 48 horas antes del sacrificio) + progesterona (P₄, 1 mg/ 0.2 ml de aceite de ajonjolí) 4 horas antes del sacrificio.
- 4) Animales OVX tratados con P₄ (1 mg/ 0.2 ml de aceite de ajonjolí) 4 horas antes del sacrificio.

Los animales se sacrificaron por decapitación a las 15:00 horas, ya que se ha reportado que la actividad noradrenérgica y los efectos de los estrógenos son mayores durante la tarde (Wise y col., 1981; Weiland y Wise, 1987, 1989). Inmediatamente después del sacrificio, se extrajo el cerebro y se colocó en solución Krebs-Ringer bicarbonato (KRB), pH 7.4, mantenida en baño de hielo con oxigenación constante (95% O₂/5% CO₂). Los hipotálamos e hipocampos se disecaron siguiendo el método descrito por Glowinski e Iversen (1966).

PREPARACION DE REBANADAS

Las rebanadas (225 µm de espesor) de los hipocampos se obtuvieron en un seccionador de tejido Sorvall. Las rebanadas se transfirieron a un tubo con 5 ml de KRB y se preincubaron durante 10 min (37°C), con agitación y oxigenación constante (95% O₂/5% CO₂). Transcurrido este tiempo, se cambió el medio por 5 ml de KRB fresco con adenina [³H] (7 µCi/ml, a.e. 25 Ci/mM) y se incubó durante 20 min. Al final de la incubación, se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces por centrifugación (600 g, 1 min) y resuspensión en KRB fresco. El precipitado obtenido se resuspendió en un volumen conocido de KRB y alícuotas de 70 µl de esta suspensión se distribuyeron en cajas multipozos para el ensayo de la formación de AMPc.

PREPARACION DE SINAPTONEUROSOMAS

Los sinapto-neurosomas se obtuvieron por el método descrito por Hollinsworth y col. (1985b). Los hipotálamos y los hipocampos se pasaron por una malla de nylon, se homogeneizaron en 10 volúmenes de KRB, en un homogeneizador de vidrio/vidrio (5 golpes) y se centrifugaron a 1,000 g (4°C) por 10 min. La pastilla se resuspendió en 15 ml de KRB y se preincubó a 37°C por 60 min. Se cambió el medio por 2 ml de KRB con adenina- ^3H (10 $\mu\text{Ci/ml}$, a.e. 25 Ci/mM) y se incubó durante 45 min. Terminada la incubación, se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces por centrifugación (600 g, 1 min) y resuspensión en KRB fresco. La pastilla se resuspendió en un volumen conocido de KRB y alícuotas de 100 μl de esta suspensión se distribuyeron en cajas multipozos para el ensayo de la formación de AMPc.

ENSAYO DE LA FORMACION DE AMPc

La formación de AMPc se determinó por la técnica de premarcaje con adenina marcada, descrita por Shimizu y col. (1969).

La mezcla de reacción para la determinación de la acumulación de AMPc incluyó el inhibidor de la fosfodiesterasa, isobutilmetilxantina (IBMX, 200 μM) y en su caso los antagonistas a ensayar (a las concentraciones que se indican en los resultados), en un volumen final de 400-450 μl . La reacción se inició al agregar el tejido a la mezcla anterior; se incubó durante 10 min (37°C) bajo atmósfera de oxígeno y agitación constante. La estimulación se realizó por la adición de 50 μl de los agonistas (a las concentraciones que se indican en los resultados) al medio de incubación; 10 min después la reacción se terminó agregando 50 μl de ácido tricloroacético (concentración final 5%).

Para calcular la recuperación del AMPc ^3H formado se agregó como estándar interno 0.9 nCi de AMPc ^{14}C (a.e. 286 mCi/mmol). A cada una de las muestras se les agregó 500 μl de agua y 200 μl de Tris 1M. Se tomó una alícuota de 50 μl del sobrenadante de cada una de las muestras para calcular la cantidad total de nucleótidos de adenina marcados.

El AMPc ^3H formado se aisló por un método secuencial de cromatografía en columna de intercambio iónico (Dowex 50 W-X8) y cromatografía en columna de alúmina (Salomon y col., 1974; Stenstrom y Richelson, 1982).

La cantidad de ^3H y ^{14}C presente en el eluado de las columnas de alúmina se contó por espectrofotometría de centelleo líquido. Los datos se corrigieron por la eficiencia de conteo del aparato (estandarización externa). Los resultados se expresan como porcentaje de dpm de AMPc ^3H formado a partir del contenido total de nucleótidos de adenina ^3H (% de conversión). La recuperación valorada individualmente mediante el estándar interno fue constante (63 \pm 5%).

ENSAYO DE UNION β -ADRENERGICA

Los hipocampos e hipotálamos se homogeneizaron en 10 volúmenes de Tris-HCl salino (pH 7.3); la fracción membranal se obtuvo por centrifugación a 30,000 g (4°C) durante 20 min, esta operación se realizó 2 veces. La pastilla se resuspendió en 40 volúmenes de Tris-HCl salino. Los ensayos se realizaron por triplicado en una mezcla de reacción (volumen final de 1 ml) que contenía 500 μ l de la preparación membranal (aproximadamente 1 mg de proteína/ml), el radioligando β -adrenérgico dihidroalprenolol- ^3H (DHA- ^3H), a.e. 51 Ci/mM disuelto en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4). La incubación se llevó a cabo por 30 min a 30°C, en presencia de distintas concentraciones de DHA ^3H (0.25-6 nM), en ausencia y presencia de alprenolol frío (100 μ M).

La separación del ligando libre del unido se llevó a cabo por filtración al vacío, a través de filtros Whatman GF/B, seguida de 3 lavados con solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4). La radiactividad de los filtros se determinó por espectrofotometría de centelleo líquido. La unión específica de DHA ^3H se calculó como la diferencia entre el ligando unido en ausencia (unión total) y en presencia de alprenolol. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry y col. (1951).

Los datos se analizaron con el programa ENZFITTER (Leatherbarrow, 1987).

ANALISIS ESTADISTICO

Los variaciones entre los grupos se determinaron por análisis de varianza de una entrada (ANOVA), seguido por la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p < 0.05$.

MATERIALES

El BE (benzoato de β -estradiol) y la P_4 se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

El IBMX (3-isobutil-1-metil-xantina), la norepinefrina, el isoproterenol, la metoxamina, la clonidina, el propranolol, la yohimbina, la fentolamina y el alprenolol se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

La adenina ^3H (a.e. 25 Ci/mM), el AMPc ^{14}C (a.e. 286 mCi/mmol) y el DHA- ^3H (a.e. 51 Ci/mM) se obtuvieron de Amersham International.

La resina Dowex 50 W-X8 se obtuvo de Sigma Chemical Co. y la alúmina se obtuvo de Merck.

RESULTADOS

Con el objeto de estudiar la actividad noradrenérgica, se caracterizaron los subtipos de receptores adrenérgicos que participan en la formación de AMPc en rebanadas de hipocampo de ratas OVX, mediante el uso de agonistas y antagonistas selectivos.

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD NORADRENERGICA EN REBANADAS DE HIPOCAMPO

Efecto de Agonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc

La actividad noradrenérgica total se estudió mediante la estimulación con el agonista total norepinefrina (NE, 10 μ M); la actividad de los receptores β -adrenérgicos por la estimulación con el agonista β selectivo, isoproterenol (ISO, 25 μ M); la actividad de los receptores α_1 y β -adrenérgicos por la estimulación con ISO (25 μ M) + metoxamina (Metox, 1 mM) y la de los receptores α_2 y β -adrenérgicos con ISO (25 μ M) + clonidina (Clon, 100 μ M).

La NE incrementó significativamente la síntesis de AMPc (430% la concentración basal), mientras que la estimulación selectiva de los receptores β -adrenérgicos con ISO, indujo sólo el 60% de la respuesta producida por NE (Tabla 1).

La estimulación con los agonistas α_1 adrenérgico, Metox, y α_2 -adrenérgico, Clon, por si solos no modificaron la síntesis de AMPc. Sin embargo, la Metox en presencia de ISO aumentó la formación de AMPc inducida por ISO a concentraciones similares a las obtenidos con NE. La Clon no modificó la cantidad de AMPc producida por el ISO (Tabla 1). La Metox aumentó de manera dependiente de la dosis (100 nM-1 mM) la cantidad de AMPc inducida a una concentración fija de ISO (25 μ M) (Fig. 2). El ISO a esta dosis produjo una respuesta máxima en los ensayos dosis respuesta del efecto del agonista (datos no mostrados).

Efecto de Antagonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc

La contribución de los receptores β y α -adrenérgicos en la formación de AMPc estimulada por NE, se estudió valorando el efecto de antagonistas adrenérgicos selectivos. En presencia de NE, el antagonista β -adrenérgico, propranolol (1 μ M), disminuyó significativamente (70%) la formación de AMPc. El antagonista α_1 -adrenérgico, fentolamina (100 μ M), bloqueó sólo una fracción de la respuesta a NE (37%), mientras que el antagonista α_2 -adrenérgico, yohimbina (100 μ M), inhibió sólo un 11% la respuesta a NE (Tabla 2).

TABLA 1. Efecto de Agonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc en Rebanadas de Hipocampo de Ratas OVX

Agonista	AMPc (% de Conversión)	% de Estimulación
BASAL	0.069±0.003	100
NE	0.296±0.014*	429
ISO	0.188±0.011*	273
METOX	0.074±0.002	107
METOX+ISO	0.303±0.023**	439
CLON	0.079±0.004	115
CLON+ISO	0.194±0.009*	281

Las rebanadas preincubadas con adenina [³H], se incubaron 10 min con vehículo (Basal) o los agonistas adrenérgicos: norepinefrina 10 µM (NE), isoproterenol 25 µM (ISO), metoxamina 1mM (Metox) y clonidina 100 µM (Clon), solos o en combinación con ISO. Los datos representan la $\bar{X} \pm EE$ de dos experimentos realizados por triplicado.

* p < 0.05 respecto a la Basal, Newman-Keuls.

** p < 0.05 respecto a ISO, Newman-Keuls.

TABLA 2. Efecto de Antagonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc inducida por NE en Rebanadas de Hipocampo de Ratas OVX

Antagonista	AMPc (% de Conversión) NE (10 µM)	% de Inhibición
TESTIGO	0.285 ± 0.011	
PROPANOLOL	0.086 ± 0.006*	70
FENTOLAMINA	0.179 ± 0.015*	37
YOHIMBINA	0.254 ± 0.006	11

Las rebanadas preincubadas con adenina [³H], se incubaron 10 min con NE 10 µM (testigo) o los antagonistas adrenérgicos: propranolol (1 µM), fentolamina (100 µM) y yohimbina (100 µM). Los datos representa la $\bar{X} \pm EE$ de dos experimentos realizados por triplicado.

* p < 0.05 respecto al testigo, Newman-Keuls.

Los efectos de los agonistas y antagonistas adrenérgicos sobre la formación de AMPc fueron característicos de acciones mediadas por los receptores β y α_1 -adrenérgicos. Por lo tanto, la respuesta adrenérgica total se definió como la cantidad de AMPc inducida por NE; la respuesta β -adrenérgica como la cantidad de AMPc inducida por ISO y la respuesta potenciadora α_1 -adrenérgica como el grado al cual la estimulación con el agonista α_1 -adrenérgico aumentó la respuesta β -adrenérgica (porcentaje de incremento en la cantidad de AMPc inducida por ISO+Metox respecto a la obtenida con ISO solo).

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD NORADRENERGICA EN SINAPTONEUROSOMAS DE HIPOCAMPO

Efecto de Agonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc

Las respuestas adrenérgicas en los sinaptoneurosomas de hipocampo sólo se determinaron mediante la estimulación con agonistas adrenérgicos y, dado que en las rebanadas de hipocampo se observó que los agonistas α_1 y α_2 por sí mismos no modifican la concentración de AMPc, únicamente se estudió el efecto de NE, ISO, ISO+Metox e ISO+Clon.

La NE (10 μ M) estimuló la formación de AMPc 360% la concentración basal. La síntesis de AMPc fue mediada por los receptores β y α_1 -adrenérgicos, ya que la estimulación simultánea con ISO+Metox aumentó la cantidad de AMPc a concentraciones similares a las obtenidas con la NE, mientras que la estimulación de los receptores α_2 con Clon no modificó la respuesta de ISO (Tabla 3).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las rebanadas de hipocampo; sin embargo, el grado de participación de los receptores β y α_1 -adrenérgicos en la síntesis total de AMPc fue diferente. La estimulación de los receptores β -adrenérgicos con ISO produjo el 80% de la respuesta a NE (vs al 60% en las rebanadas) y el efecto potenciador de los receptores α_1 sobre la actividad β -adrenérgica fue menor; la Metox aumentó en un 30% la respuesta a ISO, mientras que en las rebanadas el incremento fue del 60% (Tablas 1 y 3).

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD NORADRENERGICA EN SINAPTONEUROSOMAS DE HIPOTALAMO

Efecto de Agonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc

Aún cuando la estimulación en la síntesis de AMPc por la NE (10 μ M) fue menor respecto a la obtenida en los sinaptoneurosomas de hipocampo (245% la concentración basal), la participación de los receptores β -adrenérgicos en la respuesta total a la NE y la acción potenciadora α_1 sobre la actividad β , fueron similares a las de los sinaptoneurosomas de hipocampo (Tablas 3 y 4). El ISO produjo el 76% de la respuesta a NE y la Metox aumentó 34% la respuesta de ISO. La estimulación de los receptores α_2 con Clon no modificó la respuesta de ISO (Tabla 4).

TABLA 3. Efecto de Agonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc en Sinaptoneurosomas de Hipocampo de Ratas OVX

Agonista	AMPc (% de Conversión)	% de Estimulación
BASAL	0.372 ± 0.012	100
NE	1.338 ± 0.053*	360
ISO	1.046 ± 0.036*	281
ISO+METOX	1.353 ± 0.040**	363
ISO+CLON	0.917 ± 0.052*	247

Las rebanadas preincubadas con adenina [³H], se incubaron 10 min más con vehículo (Basal) o los agonistas adrenérgicos: NE (10 µM), ISO (25 µM), Metox (1mM) y Clon (100 µM) solos o en combinación con ISO (25 µM). Los datos representan la $\bar{X} \pm EE$ de tres experimentos realizados por triplicado.

- * p < 0.05 respecto a la Basal, Newman-Keuls.
- ** p < 0.05 respecto a ISO, Newman-Keuls.

TABLA 4. Efecto de Agonistas Adrenérgicos sobre la formación de AMPc en Sinaptoneurosomas de Hipotálamo de Ratas OVX

Agonista	AMPc (% de Conversión)	% de Estimulación
BASAL	0.970 ± 0.038	100
NE	2.389 ± 0.076*	245
ISO	1.815 ± 0.026*	187
ISO+METOX	2.423 ± 0.176**	250
ISO+CLON	1.748 ± 0.065*	180

Las rebanadas preincubadas con adenina [³H], se incubaron 10 min más con vehículo (Basal) o los agonistas adrenérgicos: NE (10 µM), ISO (25 µM), Metox (1mM) y Clon (100 µM), solos o en combinación con ISO (25 µM). Los datos representan la $\bar{X} \pm EE$ de tres experimentos realizados por triplicado.

- * p < 0.05 respecto a la Basal, Newman-Keuls.
- ** p < 0.05 respecto a ISO, Newman-Keuls.

EFEECTO DE LOS ESTEROIDES OVÁRICOS SOBRE LA ACTIVIDAD NORADRENERGICA

Para determinar si los esteroides ováricos modulan la actividad de los receptores α_1 y β -adrenérgicos, se examinó la producción de AMPc estimulada por agonistas adrenérgicos en el hipocampo y en el hipotálamo de ratas bajo las siguientes condiciones hormonales:

- 1) OVX (grupo testigo)
- 2) OVX + benzoato de estradiol (BE)
- 3) OVX + BE + progesterona (P_4)
- 4) OVX + P_4 .

El tratamiento hormonal no modificó la síntesis basal de AMPc.

Efecto de los Esteroides Ováricos en Rebanadas de Hipocampo

La administración de BE disminuyó la respuesta a NE un 12% (no significativo) respecto al grupo testigo. Este efecto fue ejercido mediante la disminución en la actividad de los receptores β -adrenérgicos, ya que la formación de AMPc inducida por ISO fue inhibida significativamente (27%) respecto al grupo testigo. La actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos no fue modificada por el BE, dado que el nivel de potenciación de la Metox sobre la respuesta β -adrenérgica fue semejante al grupo testigo (OVX, 37% y OVX+BE, 34%). Por lo tanto, la inhibición en la respuesta a ISO+Metox que se presentó después del tratamiento con BE (25%) también se debió al bloqueo en la respuesta β -adrenérgica (Fig. 1).

La administración de P_4 , sola o en combinación con BE, aumentó significativamente la respuesta a NE (30% vs testigo). El efecto no parece ser mediado por la modificación directa en la actividad del receptor β -adrenérgico, ya que la respuesta a ISO fue similar a la del grupo testigo. Sin embargo, el tratamiento con P_4 incrementó la acción potenciadora de los receptores α_1 -adrenérgicos sobre la respuesta β -adrenérgica; la Metox aumentó la formación de AMPc estimulada por ISO un 50% en los animales tratados con BE+ P_4 y un 70% en los animales tratados con P_4 sola (Fig. 1).

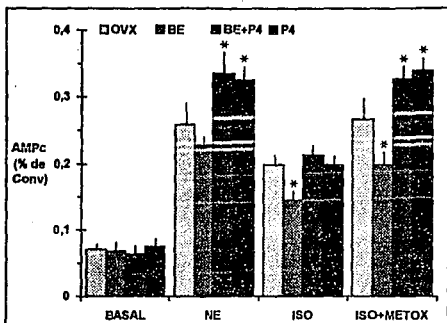


Fig. 1. Efecto de los Esteroides Ováricos sobre la acumulación de AMPc Inducida por Agonistas Adrenérgicos en Rebanadas de Hipocampo. Las rebanadas preincubadas con adenina [3 H], se incubaron 10 min en ausencia (Basal) o en presencia de los agonistas adrenérgicos: NE (10 μ M), ISO (25 μ M) solo o en combinación con Metox (1 mM). Los animales OVX fueron tratados con vehículo (OVX), BE solo (5 μ g, 48 horas antes del sacrificio) (BE) o en combinación con P4 (1 mg, 4 horas antes del sacrificio) (BE+P4) y P4 sola (P4). Los datos representa el $\bar{X} \pm EE$ de dos experimentos realizados por triplicado.

*p < 0.05 respecto a OVX, Newman-Keuls.

Para caracterizar la facilitación por la P₄ sobre la potenciación α , de la respuesta β -adrenérgica, se realizaron ensayos de curvas dosis-respuesta del efecto de Metox, en presencia de una concentración fija de ISO (25 μ M). Los resultados muestran que el tratamiento hormonal incrementa el grado de potenciación α , sobre la respuesta β , mediante el aumento en la eficacia de la Metox, sin modificar su potencia, ya que el valor de DE₅₀ no fue significativamente diferente del obtenido en el grupo testigo (OVX, 13.58 \pm 1.07 μ M; OVX+BE+P₄, 12.26 \pm 0.58 μ M) (Fig. 2).

Efecto de los Esteroides Ováricos en Sinaptoneurosomas de Hipocampo

La administración de BE inhibió significativamente la respuesta a NE (33%), respecto a la obtenida en los animales testigo. Al igual que en las rebanadas, el efecto del BE se debió al bloqueo selectivo en la actividad de los receptores β -adrenérgicos, como lo indica la disminución (25% vs testigo) en la formación de AMPc estimulada por ISO. Además, en presencia de BE la respuesta a ISO+Metox también fue reducida como consecuencia de la inhibición en la actividad de los receptores β , más bien que de la modificación en la actividad de los receptores α -adrenérgicos, dado que el grado de potenciación por Metox sobre la respuesta β -adrenérgica fue similar a la del grupo testigo (35% y 40%, en los animales OVX y OVX+BE, respectivamente) (Fig. 3).

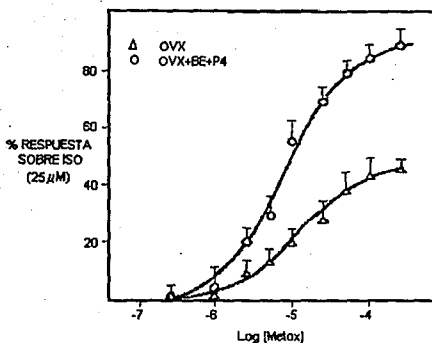


Fig. 2. Curva Dosis-Respuesta del efecto de Metoxamina sobre la formación de AMPc inducida por Isoproterenol en Rebanadas de Hipocampo. Las rebanadas se obtuvieron de animales OVX (Δ) y OVX tratados con BE+P₄ (O), con el mismo esquema de administración que se describe en la Fig. 1. Las rebanadas se incubaron por 10 min con diferentes concentraciones de Metox, antes de la adición de ISO (25 μ M). Los datos se expresan como el porcentaje de incremento sobre la respuesta a ISO y representan la $\bar{X} \pm EE$ de dos experimentos realizados por triplicado.

La disminución en la sensibilidad a la NE por los estrógenos fue revertida por la administración de P₄; en los animales tratados con BE+P₄ la inhibición en la respuesta a NE fue menor (15% vs testigo) y en los animales tratados con P₄ sola la respuesta a NE fue similar a la del grupo testigo. La P₄ no parece modificar la actividad de los receptores β -adrenérgicos, ya que la formación de AMPc inducida por ISO en los sinaptoneurosomas de animales tratados con P₄, sola o en combinación con BE, fue similar a la del grupo testigo. En los sinaptoneurosomas de hipocampo no se observó el efecto facilitador de la P₄ sobre la potenciación α_1 -adrenérgica de la respuesta β -adrenérgica que se presentó en las rebanadas; la potenciación por Metox sobre la respuesta de ISO fue comparable a la del grupo testigo (OVX, 35%; BE+P₄, 37%; P₄, 36%) (Fig. 3).

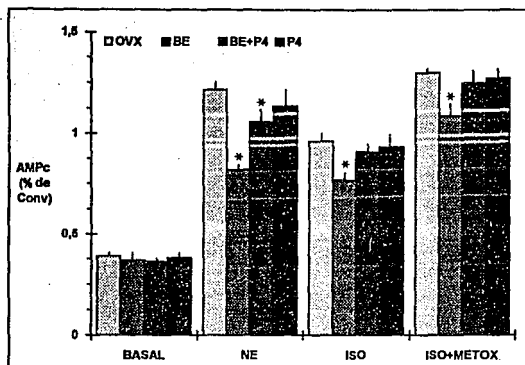


Fig. 3. Efecto de los Esteroides Ováricos sobre la acumulación de AMPc inducida por Agonistas Adrenérgicos en Sinaptoneurosomas de Hipocampo. Los sinaptoneurosomas preincubados con adenina [^3H], se incubaron 10 min en ausencia (Basal) o presencia de los agonistas adrenérgicos: NE (10 μM) e ISO (25 μM), solo o en combinación con Metox (1 mM). Los animales fueron tratados con el mismo esquema de administración hormonal al descrito en la Fig. 1. Los datos representa la $\bar{X} \pm \text{EE}$ de dos a tres experimentos realizados por triplicado.

* $p < 0.05$ respecto a OVX, Newman-Keuls.

Efecto de los Esteroides Ováricos en Sinaptoneurosomas de Hipotálamo

Aún cuando la administración de BE no cambió significativamente la respuesta a NE respecto al grupo testigo, modificó la contribución relativa de los receptores β y α_1 -adrenérgicos en la síntesis total de AMPc. El tratamiento con BE bloqueó la formación de AMPc estimulada por ISO (25% vs al testigo) y simultáneamente aumentó la actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos; la Metox potenció la respuesta a ISO en un 25% en el grupo testigo, mientras que en los animales tratados con BE el incremento fue del 50% (Fig. 4).

La administración de P_4 , sola o en combinación con BE, disminuyó significativamente la respuesta a NE (30% vs al testigo). El efecto de la P_4 no parece involucrar una modificación directa en la actividad de los receptores β -adrenérgicos, ya que la síntesis de AMPc estimulada por ISO fue similar a la del grupo testigo. La reducción en la sensibilidad a la NE más bien se debió al bloqueo de la acción potenciadora de los receptores α_1 -sobre la respuesta β -adrenérgica; la potenciación por Metox sobre la formación de AMPc inducida por ISO fue eliminada por el tratamiento con P_4 , presentándose concentraciones comparables del nucleótido en los sinaptoneurosomas expuestos a ISO solo e ISO+Metox (Fig. 4).

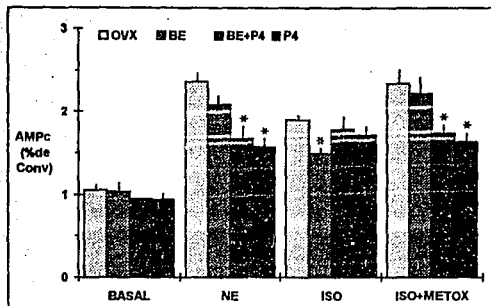


Fig. 4. Efecto de los Esteroides Ováricos sobre la acumulación de AMPc inducida por Agonistas Adrenérgicos en Sinaptoneurosomas de Hipotálamo. Los sinaptoneurosomas preincubados con adenina [^3H], se incubaron 10 min en ausencia (Basal) o presencia de los agonistas adrenérgicos: NE (10 μM) e ISO (25 μM), solo o en combinación con Metox (1 mM). Los animales fueron tratados con el mismo esquema de administración hormonal al descrito en la Fig. 1. Los datos representa el $\bar{X} \pm \text{EE}$ de dos a tres experimentos realizados por triplicado.

* $p < 0.05$ respecto a OVX, Newman-Keuls.

EFFECTO DE LOS ESTEROIDES OVARICOS SOBRE LA UNION β -ADRENERGICA

Un mecanismo por el cual los esteroides ováricos pueden modular la sensibilidad a NE es mediante la regulación en la cantidad de receptores adrenérgicos. Para examinar esta posibilidad, se estudió la unión del radioligando DHA [^3H] a los receptores β -adrenérgicos, en membranas de hipocampo y de hipotálamo de ratas OVX, tratados con estradiol solo o en combinación con P_4 , con el mismo esquema de administración que se utilizó para determinar las modificaciones en la actividad del sistema receptor β -adenilato ciclasa.

El análisis de Scatchard de la unión de DHA [^3H] en membranas de hipocampo, muestra que el tratamiento hormonal no modifica la constante de disociación (K_d) (OVX, 1.1 ± 0.06 ; OVX+BE, 1.2 ± 0.03 ; OVX+BE+ P_4 , 1.1 ± 0.07 nM) o la unión máxima (B_{max}) (OVX, 37.5 ± 1.1 ; OVX+BE, 32.5 ± 0.5 ; OVX+BE+ P_4 , 34.4 ± 1.2 fmol/mg de proteína) (Fig. 5).

En las membranas de hipotálamo tampoco se presentaron modificaciones en la K_d (OVX, 0.89 ± 0.03 ; OVX+BE, 0.99 ± 0.01 ; OVX+BE+ P_4 , 1.01 ± 0.05 nM), o en la B_{max} (OVX, 28.0 ± 0.7 ; OVX+BE, 27.8 ± 0.2 ; BE+ P_4 , 28.6 ± 0.8 fmol/mg de proteína) por efecto de la administración de hormonas ováricas (Fig. 6).

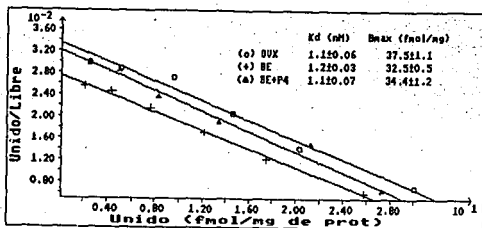


Fig. 5. Representación de Scatchard de la Unión β -Adrenérgica de DHA- ^3H en Membranas de Hipocampo. Las membranas se obtuvieron de ratas OVX tratadas con vehículo (testigo) (o), BE solo (+) o en combinación con P4 (Δ), con el mismo esquema de administración que se describe en la Fig. 1. Cada valor representa la X de un experimento representativo, realizado por triplicado.

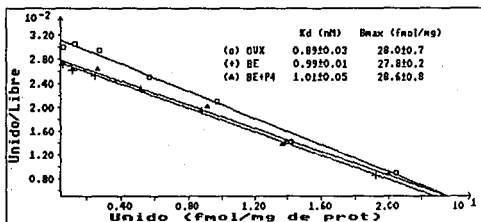


Fig. 6. Representación de Scatchard de la Unión β -Adrenérgica de DHA- ^3H en Membranas de Hipotálamo. Las membranas se obtuvieron de ratas OVX tratadas con vehículo (testigo) (o), BE solo (+) o en combinación con P4 (Δ), con el mismo esquema de administración que se describe en la Fig. 1. Cada valor representa la X de un experimento representativo, realizado por triplicado.

DISCUSION

Los datos de este estudio demuestran que en el hipocampo y en el hipotálamo la NE estimula la síntesis de AMPc mediante la activación de los receptores β y α_1 -adrenérgicos y confirman la hipótesis de que los esteroides ováricos modulan la sensibilidad del sistema noradrenérgico en el SNC, mediante la modificación en la actividad y grado de "regulación cruzada" de los receptores β y α_1 -adrenérgicos. Existen diferencias regionales en los efectos reguladores de los esteroides ováricos sobre la actividad noradrenérgica. En el hipocampo los estrógenos disminuyen la actividad de los receptores β -adrenérgicos y en el hipotálamo simultáneamente disminuyen la actividad β y aumentan el efecto potenciador de los receptores α_1 -adrenérgicos sobre la respuesta β .

El hallazgo principal de este trabajo es que la P₄ por sí misma es capaz de modular la actividad noradrenérgica cerebral; en el hipocampo aumenta el efecto potenciador de los receptores α_1 sobre la actividad β -adrenérgica, mientras que en el hipotálamo bloquea la potenciación α_1 de la actividad β -adrenérgica.

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD NORADRENERGICA

La conclusión de que la NE estimula la síntesis AMPc en las *rebanadas del hipocampo* de ratas OVX, por medio de la activación de los receptores β y α_1 -adrenérgicos se basa en que: 1) el agonista β -adrenérgico selectivo, ISO, produjo una estimulación menor en la formación de AMPc respecto al agonista total NE; 2) el agonista α_1 -adrenérgico, Metox, en presencia de ISO estimuló la formación de AMPc a niveles similares a los obtenidos con la NE, este efecto no fue inducido por el agonista α_2 -adrenérgico, Clon; 3) los antagonistas β -adrenérgico, propranolol y α_1 -adrenérgico, fentolamina, bloquearon significativamente la respuesta a NE, mientras que el antagonista α_2 -adrenérgico, yohimbina, fue poco efectivo en el bloqueo de la respuesta a NE.

El efecto de los agonistas adrenérgicos en los *sinaptoneurosomas del hipocampo* de ratas OVX, confirman la participación de los receptores β y α_1 -adrenérgicos en la síntesis de AMPc. Sin embargo, la contribución de los receptores β a la respuesta total de NE fue mayor y el efecto potenciador de los receptores sobre la actividad β -adrenérgica fue menor respecto a las *rebanadas*. Estas diferencias muy probablemente se deben a que la estructura sináptica y organización celular es distinta en estas preparaciones. Además, la metodología para la obtención de los *sinaptoneurosomas* incluye la homogenización del tejido en solución amortiguadora Krebs-Ringer bicarbonato y se ha descrito que este procedimiento reduce la magnitud de la interacción potenciadora de los receptores α_1 con receptores acoplados a la adenilato ciclasa (Chasin y col., 1974; Daly y col., 1980b).

En los *sinaptoneurosomas del hipotálamo* de ratas OVX, el grado de participación y de los receptores β y α_1 -adrenérgicos en la respuesta a la NE fue similar a la de los *sinaptoneurosomas* de hipocampo. Sin embargo, la NE produjo una estimulación menor en la síntesis de AMPc en el hipotálamo debido a que su sensibilidad a los efectos estimuladores de la NE es menor respecto a la del hipocampo (Johnson y Minneman, 1985, 1987).

Los resultados en hipocampo e hipotálamo son congruentes con la demostración de que los receptores α , ejercen una acción potenciadora sobre la respuesta β -adrenérgica en diferentes áreas cerebrales (Daly y col., 1980a, 1981; Pilc y Enna, 1985; Stone y Herrera, 1986; Robinson y Kendall, 1989a,b; Etgen y Petitti, 1987, 1990). Este tipo de interacción constituye un ejemplo de comunicación o "regulación cruzada" entre 2 sistemas diferentes de transducción de la señal en el SNC. Esta regulación se ha demostrado principalmente en rebanadas y en células de cultivo; nuestros datos indican que los sinaptoneurosomas son una preparación apropiada para el estudio del fenómeno.

REGULACION POR LOS ESTEROIDES OVARICOS SOBRE LA ACTIVIDAD NORADRENERGICA

Efecto de los Estrógenos sobre la Actividad de los Receptores β -adrenérgicos

La regulación por los estrógenos sobre la actividad noradrenérgica en el *hipocampo* e *hipotálamo* involucra la disminución en la actividad del receptor β -adrenérgico; éste parece ser un efecto general de los estrógenos ya que se presenta tanto en el SNC (Etgen y Petitti, 1987; Harrelson y McEwen, 1987; Petitti y Etgen, 1990), como en tejidos periféricos (Kirchick y Birnbaumer, 1983; Boulet y Fortier, 1988; Reimer y col., 1988). Los ensayos de unión indican que los estrógenos inhiben la actividad β -adrenérgica sin modificar el número o la afinidad por el antagonista β , [DHA- 3 H]. Resultados similares se han descrito en el hipotálamo y en la corteza cerebral (Vacas y Cardinali, 1980; Etgen y Karknias, 1990; Ungar y col., 1993).

Los estrógenos muy probablemente reducen la actividad del sistema β -adrenérgico interfiriendo en el acoplamiento del receptor β con la proteína Gs. Se ha demostrado que la eficacia de acoplamiento de los receptores dopaminérgicos D₂ con su proteína G (Clopton y Gordon, 1986; Borgundvaag y George, 1988; Munemura y col., 1989) y de los receptores β con la proteína Gs (Ungar y col., 1993) es modificada por los estrógenos. Este efecto de la hormona puede ser producido por alteración del receptor, de la proteína Gs o de ambos (Fig. 7A).

Se sabe que la modificación del receptor por fosforilación altera el acoplamiento con la proteína Gs; el receptor β puede ser fosforilado por la β ARK, por la PKA o por la proteína cinasa C (Hausdorff y col., 1990; Lefkowitz y col., 1990). Existen ciertos antecedentes para proponer que los estrógenos inducen el desacoplamiento del receptor β -adrenérgico, aumentando la tasa de fosforilación catalizada por la PKA, ya que se ha demostrado que la hormona regula la actividad de la cinasa en el útero de la rata (Liu y Greengard, 1976; Liu y col., 1981; Liu, 1984).

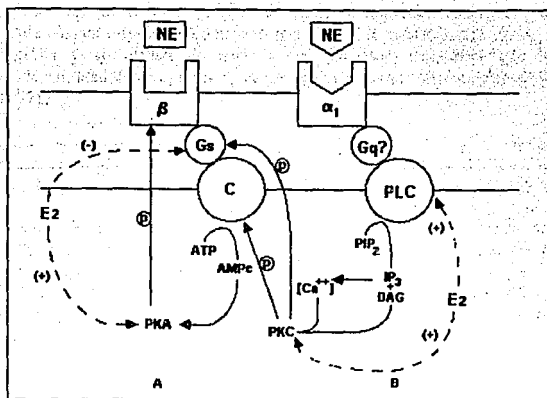


Fig. 7 Modelo que describe los sitios probables de regulación de los estrógenos sobre los sistemas β -adrenérgico (A) y α_1 -adrenérgico (B). NE, Norepinefrina; Gs y Gq, proteínas unificadoras de nucleótidos de guanina; C, subunidad catalítica de la adenilato ciclasa; PKA, proteína cinasa dependiente de AMPc; PLC, fosfolipasa C; PKC, proteína cinasa C; IP₃, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol.

Los estrógenos tal vez promueven el desacoplamiento del receptor β -adrenérgico de la proteína Gs disminuyendo el nivel o actividad de la proteína Gs. Se ha descrito un papel modulador de los estrógenos sobre diferentes proteínas G (Maus y col., 1990; Bouvier y col., 1991); en el útero y en el cuerpo lúteo de conejo la reducción por los estrógenos sobre la actividad de la adenilato ciclasa, acoplada al receptor β -adrenérgico, se asocia con una disminución en la cantidad de la subunidad α de la proteína Gs (Kirchick y Birnbaumer, 1983; Reimer y col., 1988).

Efecto de los Estrógenos sobre la Actividad de los Receptores α_1 -adrenérgicos

En los *sinaptoneurosomas de hipotálamo* el tratamiento con BE, además de disminuir la sensibilidad de los receptores β -adrenérgicos, aumentó la actividad potenciadora de los receptores α_1 -adrenérgicos sobre la respuesta β -adrenérgica. Esto explica el hecho de que la respuesta total a NE no fuera significativamente diferente de la obtenida en los animales testigo.

El efecto facilitador de los estrógenos sobre la acción potenciadora de los receptores α_1 sobre la respuesta β -adrenérgica también se ha reportado en rebanadas de hipotálamo (Etgen y Petitti, 1987; Petitti y Etgen, 1990). Estos autores sugieren que el efecto de la hormona es mediado por el incremento en el número de receptores α_1 (Etgen y Karkanias, 1990). Sin embargo, esta posibilidad debe ser confirmada debido a que estos estudios presentan algunos problemas

metodológicos (uso de bloques grandes de tejido y sacrificio de los animales durante la mañana). Además, un estudio más detallado que incluye la determinación de los receptores por autorradiografía y el análisis de núcleos hipotalámicos, demuestra que los estrógenos disminuyen la cantidad de receptores α_1 -adrenérgicos en varios núcleos hipotalámicos (Weiland y Wise, 1987).

El aumento en la actividad del sistema α -adrenérgico por los estrógenos puede ser explicada por mecanismos alternativos que no incluyen modificaciones a nivel del receptor, como el aumento en el nivel o actividad de la fosfolipasa C y de la proteína cinasa C (Fig. 7B).

Recientemente se ha propuesto que una isoforma de la fosfolipasa C (fosfolipasa $C\alpha$) puede ser un mediador de muchas de las acciones de los estrógenos en diferentes tejidos (Mobbs y col., 1991). Los estrógenos inducen la síntesis o alteran la actividad de la enzima (Mobbs y col., 1988, 1990a,b, 1991; Kaplitt y col., 1993); la modificación en la actividad probablemente ocurre por unión directa a la enzima ya que ésta presenta un dominio homólogo al dominio unificador de estrógenos del receptor al esteroide (Barker y col., 1990).

Con respecto a la proteína cinasa C, se ha demostrado que los estrógenos modifican la cantidad y la actividad de varias isoformas de la enzima en la adenohipófisis de la rata (Drouva y col., 1990, Audy y col., 1990; Thomson y col., 1993) y el cuerpo lúteo de conejo (Maizels y col., 1992). Sin embargo, ya que el estradiol no se une a la enzima purificada ni aumenta su actividad, se ha propuesto que la modulación de la cinasa C es indirecta, mediante la modificación en la fosfolipasa C (Mobbs y col., 1991).

La regulación, ya sea directa o indirecta, de la cinasa C por los estrógenos puede ser un evento importante en el aumento de la potenciación α -adrenérgico de la respuesta β -adrenérgico que se presenta en el hipotálamo. La activación de la cinasa C puede regular cruzadamente al sistema receptor β -adrenérgico e incrementar su actividad; la enzima es capaz de fosforilar a la proteína Gs, aumentando su actividad o facilitando el acoplamiento con la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa (Bell y col., 1985) o a la subunidad catalítica de adenilato ciclasa, incrementando el grado de activación por la proteína Gs (Yoshimasa y col., 1987; Simmoteit y col., 1991).

Efecto de la Progesterona sobre la Actividad de los Receptores α -adrenérgicos

Un hallazgo importante de este estudio es que la P_4 por sí misma es capaz de modular la actividad noradrenérgica cerebral; en el hipocampo la hormona disminuye la sensibilidad a la NE y en el hipotálamo produce el efecto contrario.

La acción facilitadora de la P_4 sobre la sensibilidad a la NE en el *hipocampo*, no es mediada por la modificación directa del receptor β -adrenérgico, sino por el aumento en el efecto potenciador de los receptores α_1 -adrenérgicos sobre la actividad β -adrenérgica. Esto es apoyado por los datos de las curvas dosis-respuesta del efecto de Metox sobre la formación de AMPc inducida por ISO en rebanadas de hipocampo, que muestran que la administración de P_4 a animales

pretratados con BE, incrementa significativamente la estimulación máxima del agonista α_1 -adrenérgico sobre la respuesta β -adrenérgica.

La facilitación por la P₄ sobre la actividad α_1 -adrenérgica no se pudo demostrar en los sinaptoneurosomas de hipocampo; la mayor participación de los receptores β y la menor acción potenciadora de los receptores α_1 sobre la actividad β -adrenérgica pudo haber enmascarado el efecto de la hormona.

La P₄ disminuyó la sensibilidad a la NE en los sinaptoneurosomas de *hipotálamo* mediante el bloqueo de la potenciación α_1 -adrenérgica sobre la respuesta β -adrenérgica. La potenciación por la Metox sobre la formación de AMPc estimulada por ISO fue eliminada por completo, presentándose niveles comparables del nucleótido en presencia de ISO+Metox y de ISO solo. Esta acción inhibitoria de la P₄ sobre la actividad del sistema α_1 -adrenérgico también se ha demostrado en rebanadas de hipotálamo; sin embargo, el efecto de la P₄ solo se presentó en animales pretratados con estrógenos (Etgen y Petitti, 1986; Petitti y Etgen, 1989, 1990).

La demostración de que la P₄ no requiere de la presencia de estrógenos para ejercer sus efectos sugiere que la hormona modula la actividad noradrenérgica por mecanismos membranales. Se han descrito varias acciones membranales de la P₄; por ejemplo, la hormona induce la liberación rápida de LHRH de fragmentos hipotalámicos (Kim y Ramírez, 1982; Drouva y col., 1983; Ke y Ramírez, 1987), aumenta la liberación de dopamina en el cuerpo estriado (Dluzen y Ramírez, 1984, 1987), produce aumento y redistribución de los receptores a oxitocina en el hipotálamo (Schumacher y col., 1989; 1990b), aumenta la unión de GABA a su receptor en cerebro (Maggi y Perez, 1984) y disminuye la actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos en el hipotálamo (Petitti y Etgen, 1992). Estas acciones muy probablemente ocurren por la interacción de la P₄ con sitios membranales específicos (Ke y Ramírez, 1990).

Aún cuando no se conocen los sistemas de segundo mensajero a los que se acoplan los receptores membranales a la P₄, se ha sugerido al calcio como posible mediador. La activación del receptor induce un aumento rápido en la concentración de calcio intracelular, como resultado de la entrada de calcio extracelular (Thomas y Meizel, 1989; Blackmore y col., 1991; Sanchez-Bueno, 1991). En ovocitos de anfibio, la estimulación del receptor desencadena diferentes sistemas de transducción de la señal, asociados al recambio de fosfolípidos membranales; las señales múltiples aparentemente convergen para estimular y producir la activación sostenida de la proteína cinasa C, a los pocos minutos después de la administración de P₄ (Chien y col., 1991, Kostellow y col., 1987, 1993).

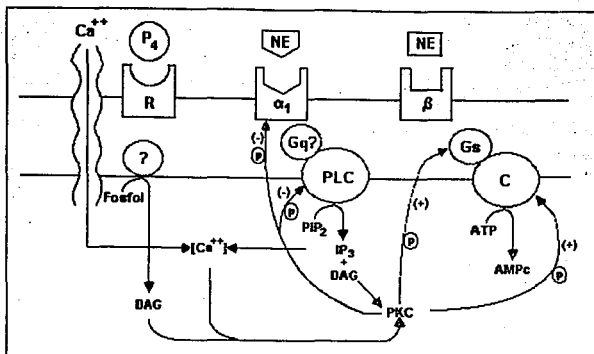


Fig. 8 Modelo que describe los sitios probables de regulación de la progesterona sobre el sistema α_1 -adrenérgico. (Las abreviaturas son las mismas que en la Fig. 7)

Si la P_4 desencadena eventos bioquímicos similares en la neurona, la estimulación de la cinasa C pudiera ser un mediador importante en la modulación positiva (hipocampo) y negativa (hipotálamo) de la P_4 sobre el sistema α_1 -adrenérgico. Como se discutió anteriormente, la cinasa C es capaz de sensibilizar al sistema β -adrenérgico. A su vez, la cinasa C ejerce un control de retroalimentación negativa sobre la vía de recambio de fosfoinosítoles; la cinasa promueve la desensibilización del sistema α_1 -adrenérgico, mediante la fosforilación y desacoplamiento del receptor con su proteína G (Leeb-Lundberg y col., 1985, Cotecchia y col., 1985) o mediante la fosforilación e inactivación de la fosfolipasa C (Bennett y Crooke, 1987) (Fig. 8).

En resumen, los resultados de este estudio demuestran que en el *hipocampo* los estrógenos disminuyen la sensibilidad del receptor β -adrenérgico y en el *hipotálamo* simultáneamente disminuyen la sensibilidad del receptor β y aumentan la acción potenciadora del receptor α_1 -adrenérgico sobre la actividad del receptor β . Por su parte, la P_4 ejerce un efecto dual sobre el sistema α_1 -adrenérgico: en el *hipocampo* aumenta la acción potenciadora de los receptores α_1 sobre la actividad β -adrenérgica, mientras que en el *hipotálamo* la bloquea.

Aunque a partir de estos datos no es posible establecer una relación directa de los efectos de los esteroides ováricos sobre el control de gonadotrofinas, se pueden plantear ciertas correlaciones. Se ha demostrado que el sistema noradrenérgico ejerce influencias tanto facilitadoras, como inhibitorias sobre la liberación de gonadotrofinas, que son mediadas por la activación de los receptores α_1 y β -adrenérgicos, respectivamente. En ratas OVX, sin sustitución hormonal, la NE actúa principalmente mediante la activación de los receptores β -

adrenérgicos para inhibir la secreción de LHRH y LH. Sin embargo, en animales OVX, tratados con estrógenos o estrógenos más progesterona, el efecto predominante de la NE es facilitar la liberación de LHRH y LH; esta acción es mediada por los receptores α_1 -adrenérgicos (Cáceres y Talesnik, 1980; Leung y col., 1982; Talesnik y Sawyer, 1986; Brann y Mahesh, 1991).

La demostración en este trabajo de que el tratamiento con estrógenos simultáneamente aumenta la actividad de los receptores α_1 y disminuye la actividad de los receptores β en el hipotálamo, es congruente con la interpretación de que tales cambios participan en la regulación de la liberación preovulatoria de gonadotrofinas.

El bloqueo por la P_4 de la potenciación α_1 -adrenérgica sobre la síntesis de AMPc, estimulada por el receptor β en el hipotálamo, puede representar un mecanismo importante en la sincronización y facilitación del pico preovulatorio de gonadotrofinas. Si la estimulación de la liberación de gonadotrofinas, requiere de la disminución de la señal inhibitoria, mediada por el receptor β -adrenérgico, el estradiol y la P_4 pueden intervenir en el proceso. Es decir, el tratamiento con estradiol disminuye la actividad del receptor β -adrenérgico y la administración subsiguiente de la P_4 inactiva al sistema β -adrenérgico, removiendo cualquier influencia facilitadora de los receptores α_1 -adrenérgicos, sobre la función del receptor β y permitiendo que la acción estimuladora de los estrógenos sobre el sistema α_1 -adrenérgico ocurra sin oposición.

Nuestros resultados no permiten precisar cuáles neuronas participan en la sinapsis noradrenérgica. El efecto de los esteroides ováricos puede ser ejercido en la sinapsis noradrenérgica sobre la neurona LHRHérgica o en una sinapsis noradrenérgica localizada en una interneurona, que a su vez establece sinapsis con la neurona LHRHérgica.

En el primer caso, existen reportes de que la aplicación "in vitro" de NE a fragmentos de tejido hipotalámico estimula la liberación de LHRH (Negro-Vilar y col., 1979; Nowak y Swerdloff, 1985) y se han descrito terminaciones noradrenérgicas asociadas estrechamente con los cuerpos de las neuronas LHRHérgicas (Hoffman y col., 1982; Jennes y col., 1982). Recientemente se ha desarrollado una línea celular de neuronas LHRHérgicas inmortalizadas (células GT₁), que sintetizan y secretan LHRH (Mellon y col., 1990; Martínez de la Escalera y col., 1992a). Estas células expresan receptores β_1 -adrenérgicos cuya activación por NE o isoproterenol estimula la liberación de LHRH (Martínez de la Escalera y col., 1992b; Findell y col., 1993). Esta información apoya un efecto directo de la NE sobre las neuronas LHRHérgicas.

En el segundo caso, se ha sugerido al sistema GABAérgico como uno de los posibles mediadores de las acciones de la NE sobre las neuronas LHRHérgicas. En el área preóptica medial existen sinapsis noradrenérgicas en las neuronas GABAérgicas (Leranth y col., 1988), las cuales establecen sinapsis con las neuronas LHRHérgicas (Leranth y col., 1985). La liberación de NE endógena, inducida por la estimulación eléctrica del grupo celular noradrenérgico A₁, aumenta la liberación de GABA en el área preóptica medial de ratas OVX (Herbinson y col., 1989, 1990). Además, en las células GT₁ el GABA modula directamente la liberación de LHRH (Martínez de la Escalera y col., 1994).

Las dos posibilidades anteriores no son excluyentes ya que el efecto estimulador de la NE sobre las neuronas LHRHérgicas puede deberse principalmente a la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos, que inhiben una entrada GABAérgica inhibitoria a las neuronas LHRHérgicas y a una acción directa sobre receptores β_1 -adrenérgicos localizados en las neuronas LHRHérgicas (Kordon y col., 1994).

La modulación de la actividad de los receptores β y α_1 -adrenérgicos hipocampales por los estrógenos y la P_4 también pueden ser relevantes en el control de la secreción de gonadotropinas, ya que esta región cerebral ejerce un control inhibitorio sobre la secreción de las mismas en la rata. La lesión del fornix produce un avance de los picos preovulatorios de LH y FSH (Kawakami y Kimura, 1975) y aumento de la concentración de LH en plasma en el proestro (Terasawa y Kawakami, 1973). La estimulación del hipocampo bloquea la ovulación espontánea y la ovulación inducida por la estimulación del área preóptica medial (Velasco y Taleisnik, 1969; Gallo y col., 1971) e inhibe la liberación de LH inducida por la estimulación del área preóptica medial (Kawakami y col., 1973). La manipulación del hipocampo ventral es la que más consistentemente induce las respuestas inhibitorias. Las lesiones en esta parte del hipocampo producen la degeneración del tracto corticohipotalámico medial; esta vía termina principalmente en el núcleo arqueado y en el área hipotalámica anterior, en donde se localizan terminaciones y neuronas LHRHérgicas (Witkin y col., 1982; Jennes y Conn, 1994). La interrupción de este tracto previene el bloqueo de la ovulación inducida por la estimulación del hipocampo ventral (Velasco y Taleisnik, 1969), lo que sugiere un efecto inhibitorio directo sobre la actividad de las neuronas LHRHérgicas.

Dado que el hipocampo, además de participar en el control de la secreción de gonadotropinas, juega un papel importante en la integración de conductas tanto reproductivas como no reproductivas (Beatty, 1984; Maggi y Perez, 1985; Jarrad, 1993), la modulación del sistema noradrenérgico hipocampal por los esteroides ováricos puede ser relevante en estos procesos de integración.

El hipocampo recibe información de todas las modalidades sensoriales, y aún cuando el significado de cada una de ellas varía dependiendo de la importancia que tiene en las diferentes especies, se ha sugerido que esta estructura interviene en los procesos de asociación entre diferentes señales sensoriales y en la comparación de la información reciente con la información almacenada previamente (Rawlis, 1985; Teyler y DiScenna, 1985).

Se ha propuesto que el hipocampo actúa como una "compuerta" para el procesamiento de la información sensorial, que resulta en la construcción de mapas cognoscitivos y por último en la manifestación de conductas adaptativas. El hipocampo participa en la asociación entre estímulos sensoriales de diferentes clases, dependiendo del contexto conductual en el que éstos ocurren (Port y col., 1987; Lopes Da Silva, 1990). Así, en situaciones en que la formación de mapas cognoscitivos y el desarrollo concomitante de conductas exploratorias no es conveniente para el animal, la "compuerta hipocampal" esta cerrada. Cuando la información que requiere el hipocampo para la formación de mapas cognoscitivos esta disponible, la "compuerta

hipocampal" es abierta y se presenta el repertorio normal de conductas exploratorias (Sanchez-Andres y col., 1993).

Por último, la modulación por los esteroides ováricos de la transmisión noradrenérgica puede ser relevante en aspectos más generales de la función cerebral.

A nivel celular la NE ejerce diferentes acciones electrofisiológicas dependiendo del tipo de circuito cerebral en el que se encuentre, esto ha llevado a proponer que la NE actúa como modulador de la sensibilidad neuronal, más bien que como neurotransmisor. En sentido estricto, los neurotransmisores actúan aumentando la conductancia membranal e induciendo excitación o inhibición de la neurona postsináptica. Las respuestas a la NE no pueden ser separadas en acciones sinápticas inhibitorias o excitatorias convencionales; la NE más bien modula el nivel de sensibilidad de una neurona a las diferentes señales aferentes que recibe. En varios circuitos neuronales la NE: 1) inhibe significativamente la tasa de disparo espontánea e incrementa la actividad neuronal producida por la estimulación de vías aferentes, lo que resulta en un aumento en la relación "señal-ruido" de las neuronas activas o, 2) aumenta la sensibilidad de una neurona a estímulos subumbrales a los cuales no responde en ausencia de coactivación noradrenérgica, por lo que se ha asignado un papel de "compuerta" para la NE (Woodward y col., 1979; Waterhouse y col., 1988). En particular en el hipotálamo la NE, mediante la activación de los receptores α_1 , aumenta la respuesta de las señales sinápticas excitadoras, mientras que la activación de los receptores β aumenta la eficacia de las señales sinápticas inhibitorias (Sessler y col., 1988; Cheng y col., 1988). Así, las modificaciones en el grado de activación de los receptores β y α_1 -adrenérgicos inducidas por los esteroides ováricos, pueden aumentar la probabilidad de que las respuestas neuronales a la NE sean excitatorias o inhibitorias. Este tipo de regulación puede ser un mecanismo importante por el cual las hormonas ováricas ejercen sus efectos en el SNC.

CONCLUSIONES

Los datos de este estudio demuestran que:

- 1) La estimulación de la síntesis de AMPc por la NE en el hipotálamo y el hipocampo de la rata hembra es mediada por los receptores β y α_1 -adrenérgicos.
- 2) Los esteroides ováricos regulan la transmisión noradrenérgica en el hipotálamo y el hipocampo, mediante la modificación diferencial en la actividad de los receptores β y α_1 -adrenérgicos.
- 3) Los estrógenos inhiben la actividad del receptor β -adrenérgico en el hipocampo y simultáneamente a la disminución β -adrenérgica, aumentan la actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos en el hipotálamo.
- 4) La P₄ aumenta la actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos en el hipocampo y bloquea su actividad en el hipotálamo.
- 5) La P₄ no requiere de la presencia de estrógenos para ejercer sus efectos moduladores sobre el sistema noradrenérgico.

BIBLIOGRAFIA

- Ambrosio, E., Montero, M.T., Fernandez, I., Azvara, M.C., Orensanz, L.M. (1984). [³H]-Prazosin binding to central nervous system regions of male and female rats. *Neurosci. Lett.* **49**: 193-197
- Anand-Srivastava, M.B., Srivastava, A.K. (1990). Modulation of adenylate cyclase activity by Ca⁺⁺-phospholipid-dependent protein kinase in rat brain striatum. *Mol. Cell. Biochem.* **92**: 91-98
- Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., Dawson, T.M., Codina, J., Kwatra, M.M., Snyder, S.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992). Beta-Arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J. Biol. Chem.* **267**: 17882-17890
- Audy, M.C., Boucher, Y., Bonnin, M. (1990). Estrogen modulate gonadotropin release in relation to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and phorbol ester (PMA) actions in superfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **126**: 1396-1402
- Axelrod, J., Burch, R.M., Jelsema, C.L. (1988). Receptor mediated activation of phospholipase A₂ via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. *Trends Neurosci.* **11**: 117-123
- Barker, W.C., Hunt, L.T., Tsibris, J.C., Spellacy, W.N. (1990). HIP-70: an isoform of phosphoinositol-specific phospholipase C- α . *Science* **249**: 566-567
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**: 335-344
- Beatty, W.W. (1984). Hormonal organization of sex differences in play fighting and spatial behavior. *Prog. Brain Res.* **61**: 320-324
- Beck, S.G., Clarke, W.P., Goldfarb, J. (1990). Chronic estrogen effects on 5-hydroxytryptamine mediated responses in hippocampal pyramidal cells of female rats. *Neurosci. Lett.* **106**: 181-187
- Bell, J.D., Buxton, I.L.O., Brunton, L.L. (1985). Enhancement of adenylate cyclase activity in S49 lymphoma cells by phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **260**: 2625-2628
- Bell, J.D., Brunton, L.L. (1986). Enhancement of adenylate cyclase activity in S49 lymphoma cells by phorbol esters. Withdrawal of GTP-dependent inhibition. *J. Biol. Chem.* **261**: 12036-12041
- Bennett, C.F., Crooke, S.T. (1987). Purification and characterization of a phosphoinositide-specific phospholipase C from guinea pig uterus. *J. Biol. Chem.* **262**: 13789-13797

Benovic, J.L., Pike, L.J., Cerione, R.A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1985). Phosphorylation of the mammalian β -adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **260**: 7094-7101

Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1986). β -adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 2797-2801

Benovic, J.L., Kuhn, H., Weyland, I., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987). Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48 kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 8879-8882

Benovic, J.L., Bouvier, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1988). Regulation of adenylyl cyclase-coupled β -adrenergic receptors. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**: 405-428

Benovic, J.L., DeBlasi, A., Stone, W.C., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1989). β -adrenergic receptor Kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* **246**: 235-240

Benovic, J.L., Onorato, J.J., Arriza, J.L., Stone, W.C., Lohse, R.J. (1991). Cloning expression and chromosomal localization of β -adrenergic receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **266**: 14939-14946

Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. (1993). *Nature* **361**: 315-325

Bettini, E., Pollio, G., Santagati, S., Maggi, A. (1992). Estrogen receptor in rat brain: presence in the hippocampal formation. *Neuroendocrinology* **56**: 502-508

Biegon, A., Reches, A., Snyder, L., Davis, J.N. (1983). Serotonergic and noradrenergic receptors in the rat brain: modulation by chronic exposure to ovarian hormones. *Life Sci.* **32**: 2015-2021

Blackmore, P.F., Neulen, J., Lattanzio, F., Beebe, S.J. (1991). Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J. Biol. Chem.* **266**: 18655-18659

Booze, R.M., Crisostomo, E.A., Davis, J.N. (1993). β -adrenergic receptors in the hippocampal and retrohippocampal regions of rats and guinea pigs: autoradiographic and immunohistochemical studies. *Synapse* **13**: 206-214

Borgundvaag, B., George, S.R. (1988). Estrogen regulation of rat anterior pituitary adenylate cyclase. *Mol. Cell. Endocrinol.* **59**: 35-45

Boulet, A.P., Fortier, M.A. (1988). Sex steroid regulation of β -adrenergic sensitive adenylate cyclase in rabbit myometrial cells in primary culture. *Life Sci.* **42**: 829-840

Bouvier, C., Lagacé, G., Collu, R. (1991). G protein modulation by estrogens. *Mol. Cell. Endocrinol.* **79**: 65-73

Brann, D.W., Mahesh, V.B. (1991). Detailed examination of the mechanism and site of action of progesterone and corticosteroids in the regulation of gonadotropin secretion: Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and catecholamine involvement. *Biol. Reprod.* **44**: 1005-1015

Britton, R.D. (1993). 17β -estradiol induction of filopodial growth in cultured hippocampal neurons within minutes of exposure. *Mol. Cell. Neurosci.* **4**: 36-46

Bylund, D.B. (1992). Subtypes of α_1 and α_2 -adrenergic receptors. *FASEB J.* **6**: 832-839

Cáceres, A., Taleisnik, S. (1980). Inhibition of secretion of luteinizing hormone induced by electrochemical stimulation of the anterior cingulate cortex mediated by a β -adrenergic mechanism. *J. Endocrinol.* **87**: 419-429

Clark, R.B., Kunkel, M.W., Friedman, J., Goka, T.J., Johnson, J.A. (1988). Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for heterologous desensitization of adenylyl cyclase in S49 wild-type lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 1442-1446

Clark, R.B., Friedman, J., Dixon, R.A.F., Strader, C.D. (1989). Identification of a specific site required for rapid heterologous desensitization of the β -adrenergic receptor by cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Pharmacol.* **36**: 343-348

Cloptom, J.K., Gordon, J.H. (1986). In vivo effects of estrogen and 2-hydroxyestradiol on D₂ dopamine receptor agonist affinity states in rat striatum. *J. Neural Transm.* **66**: 13-20

Cotecchia, S., Leeb-Lundberg, L.M.F., Hagen, P.O., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1985). Phorbol ester effects on α_1 -adrenoceptor binding and phosphatidylinositol metabolism in cultured vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* **37**: 2389-2398

Chasin, M., Mamrak, F., Samaniego, S.G. (1974). Preparation and properties of a cell free hormonally responsive adenylyl cyclase from guinea pig brain. *J. Neurochem.* **22**: 1031-1038

Chen, C.Y., Dion, S.B., Kim, C.M., Benovic, J.L. (1993). β -adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation. *J. Biol. Chem.* **268**: 7825-7831

Cheng, J.-T., Sessler, F.M., Azizi, S.A., Chapin, J.K., Waterhouse, B.D. (1988). Electrophysiological actions of norepinephrine in rat lateral hypothalamus. II. An in vitro study of the effects of iontophoretically applied norepinephrine on LH neuronal responses to γ -aminobutyric acid (GABA). *Brain Res.* **446**: 90-105

Chien, E.J., Morril, G.A., Kostellow, A.B. (1991). Progesterone-induced second messengers at the onset of meiotic maturation in the amphibian oocyte: interrelationships between phospholipid N-methylation, calcium and diacylglycerol release, and inositol phospholipid turnover. *Mol. Cell. Endocrinol.* **81**: 53-67

Chik, C.L., Young, I., Ho, A.K. (1991). Differential involvement of the arachidonic acid cascade on the α -adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide- versus β -adrenergic-stimulated cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* **57**: 1534-1539

Daly, J.W., Padgett, W., Nimitkitpaisan, Y., Creveling, C.R., Cantacuzene, D., Kirk, K.L. (1980a). Fluoronorepinephrines: specific agonists for the activation of α and β adrenergic-sensitive cyclic AMP-generating systems in brain slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **212**: 382-389

Daly, J.W., McNeal, E., Partington, C., Neuwirth, M., Creveling, C.R. (1980b). Accumulations of cyclic AMP in adenine-labeled cell-free preparations from guinea pig cerebral cortex: role of α -adrenergic and H₁-histaminergic receptors. *J. Neurochem.* **35**: 326-337

Daly, J.W., Padgett, W., Creveling, C.R., Cantacuzene, D., Kirk, K.L. (1981). Cyclic AMP-generating systems: regional differences in activation by adrenergic receptors in rat brain. *J. Neurosci.* **1**: 49-59

Davis, G. A. (1978). The response of adenosine 3', 5' monophosphate to norepinephrine in the hypothalamus and pineal organ of female rats in proestrus or diestrus. *Endocrinology.* **103**: 1048-1053

De Kloet E.R. (1991). Brain corticosteroids balance and homeostatic control. *Frontiers in Neuroendocrinology* **12**: 95-164

Dluzen, D.E., Ramirez, V.D. (1984). Bimodal effect of progesterone on in vitro dopamine function of the rat corpus striatum. *Neuroendocrinology* **39**: 149-155

Dluzen, D.E., Ramirez, V.D. (1987). Intermittent infusion of progesterone potentiates whereas continuous infusion reduces amphetamine-stimulated dopamine release from ovariectomized estrogen primed rat striatal fragments superfused in vitro. *Brain Res.* **406**: 1-9

Donner, M.H., Silverstone, A., Nishiyama, K., DeSostoa, A., Munn, G., DeSousa, M. (1980). Gonadal steroids: effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. *Science* **209**: 1017-1020

Drouva, S.V., Laplante, E., Kordon, C. (1982). α_1 -adrenergic receptor involvement in the LH surge in ovariectomized oestrogen-primed rats. *Eur. J. Pharmacol.* **81**: 341-344

Drouva, S.V., Laplante, E., Kordon, C. (1983). Effects of ovarian steroids on in vitro release LH-RH from mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology* **37**: 336-341

- Drouva, S.V., Gormenne, I., Laplante, E., Rerat, E., Enjalbert, A., Kordon, C. (1990). Estradiol modulates protein kinase C activity in the rat anterior pituitary in vivo and in vitro. *Endocrinology* 126: 536-544
- Duman, R.S., Karbon, E.W., Harrington, C., Enna, S.J. (1986). An examination of involvement of phospholipase A₂ and C in the α -adrenergic and γ -aminobutyric acid receptor modulation of cyclic accumulation in rat brain slices. *J. Neurochem.* 47: 800-810
- Duman, R.S., Enna, S.J. (1987). Modulation of receptor-mediated cyclic AMP production in brain. *Neuropharmacology* 26: 981-986
- Emorine, L.J., Marullo, S., Delavier-Klutchko, C., Kaveri, S.V., Durieu-Trautmann, O., Strosberg, A.D. (1987). Structure of the gene for human β_2 -adrenergic receptor: expression and promoter characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6995-6999
- Etgen, A.M., Petitti, N. (1986). Norepinephrine-stimulated cyclic AMP accumulation in rat hypothalamic slices: effects of estrous cycle and ovarian steroids. *Brain Res.* 375: 385-390
- Etgen, A.M., Petitti, N. (1987). Mediation of norepinephrine-stimulated cyclic AMP accumulation by adrenergic receptors in hypothalamic and preoptic area slices: effects of estradiol. *J. Neurochem.* 49: 1732-1739
- Etgen, A.M., Karknias, G.B. (1990). Estradiol regulates the number of α_1 but not β or α_2 noradrenergic receptors in hypothalamus of female rats. *Neurochem. Int.* 16: 1-9
- Findell, P.R., Wong, K.H., Jackman, J.K., Daniels, D.V. (1993). β_1 -adrenergic and dopamine (Di)-receptors coupled to adenylyl cyclase activation in GT₁ gonadotropin-releasing hormone neurosecretory cells. *Endocrinology* 132: 682-688
- Furray, C.C., Richelson, E. (1985). Glucocorticoids potentiate the prostaglandin E-mediated cyclic AMP formation by a cultured murine neuroblastoma clone. *J. Neurochem.* 45: 79-85
- Foster, S.J., Harden, T.K. (1980). Dexamethasone increases β -adrenoceptor density in human astrocytoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 29: 2151-2153
- Fox, S.R., Harlan, R.E., Shivers, B.D., Pfaff, D.W. (1990). Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* 51: 276-283
- Foy, M.R., Teyler, T.J., Vardaris, R.M. (1982). THC and 17 β -estradiol in hippocampus. *Brain Res. Bull.* 8: 341-345
- Foy, M.R., Teyler, T.J. (1983). 17 α -estradiol and 17 β -estradiol in hippocampus. *Brain Res. Bull.* 10: 735-739

- Gallo, R.V., Johnson, J.H., Goldman, B.D., Whitmoyer, D.T., Sawyer, C.H. (1971). Effects of electrochemical stimulation of the ventral hippocampus on hypothalamic electrical activity and pituitary gonadotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 89: 704-713
- Garrity, M.J., Andreasen, T.J., Storm, D.R., Robertson, R.P. (1983). Prostaglandin E₁-induced heterologous desensitization of hepatic adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 258: 8692-8697
- Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649
- Gitler, M.S., Barraclough, C.A. (1987a). Locus Coeruleus (LC) stimulation augments LHRH release induced by medial preoptic stimulation. Evidence that the major LC stimulatory component enters contralaterally into the hypothalamus. *Brain Res.* 422: 1-10
- Gitler, M.S., Barraclough, C.A. (1987b). Effects of drugs which modify catecholamine activity on amplification of LH release induced by locus coeruleus electrical stimulation. *Brain Res.* 437: 332-338
- Gitler, M.S., Barraclough, C.A. (1988). Stimulation of the medullary A₁ noradrenergic system augments luteinizing hormone release induced by medial preoptic nucleus stimulation. *Neuroendocrinology* 48: 351-359
- Glowinski, J., Iversen, L.L. (1988). Regional studies of catecholamine in the rat brain. I. Disposition of ³H norepinephrine, ³H dopamine and ³H DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13: 655-669
- Gunaga, K.P., Kawano, A., Menon, K.M.J. (1974). In vivo effect of estradiol benzoate on the accumulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 16: 273-281
- Gusovsky, F., Gutkind, J.S. (1991). Selective effects of activation of protein kinase C isozymes on cyclic AMP accumulation. *Mol. Pharmacol.* 39: 124-129
- Hadcock, J.R., Malbon, C.C. (1988). Regulation of β -adrenergic receptors by "permissive" hormones: glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8415-8419
- Hadcock, J.R., Ross, M., Watkins, D.C., Malbon, C.C. (1990). Cross-regulation between G-protein-mediated pathways. Stimulation of adenylyl cyclase increases expression of the inhibitory G-protein, Gi. *J. Biol. Chem.* 265: 14784-14790
- Hadcock, J.R., Port, J.D., Malbon, C.C. (1991). Cross-regulation between G-protein-mediated pathways. Activation of the inhibitory pathway of adenylyl cyclase increases the expression of β -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 266: 11915-11922

- Han, C., Abel, P.W., Minneman, K.P. (1987). α_1 -adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{++} in smooth muscle. *Nature* **329**:333-335
- Harden, T.K. (1983). Agonist-induced desensitization of the β -adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacol. Rev.* **35**: 5-32
- Harrelson, A., McEwen, B. (1987). Gonadal steroid modulation of neurotransmitter-stimulated cAMP accumulation in the hippocampus of the rat. *Brain Res.* **404**:89-94
- Hausdorff, W.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990). Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor. *FASEB J.* **4**: 2881-2889
- Herbinson, A.E., Heavens, R.P., Dyer, R.G. (1989). Microdialysis of rat preoptic area: Evidence that noradrenaline stimulates release of GABA. *J. Neurosci. Methods* **29**: 290
- Herbinson, A.E., Heavens, R.P., Dyer, R.G. (1990). Oestrogen modulation of excitatory A_1 noradrenergic input to rat medial preoptic γ aminobutyric acid neurons demonstrated by microdialysis. *Neuroendocrinology* **52**: 161-168
- Ho, A.K., Klein, D.C. (1987). Activation of α -adrenoceptors, protein kinase C, or treatment with intracellular free Ca^{++} elevating agents increases pineal phospholipase A_2 activity. *J. Biol. Chem.* **262**: 11764-11770
- Hoffman, G.E., Wray, S., Goldstein, M. (1982). Relationship of catecholamines and LHRH: light microscopic study. *Brain Res. Bull.* **9**: 417-430
- Hollingsworth, E.B., Sears, E.B., Daly, J.W. (1985a). An activator of protein kinase C (phorbol-12-myristate-13-acetate) augments 2-chloroadenosine elicited accumulation of cyclic AMP in guinea pig cerebral cortical particulate preparations. *FEBS Lett.* **184**: 339-342
- Hollingsworth, E.B., McNeal, E.T., Burton, J.L., Williams, R.J., Daly, J.W., Creveling, C.R. (1985b). Biochemical characterization of a filtered synaptoneurosoma preparation from guinea pig cerebral cortex: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-generating systems, receptors, enzymes. *J. Neurosci.* **5**: 2240-2253
- Honma, K., Wuttke, W. (1980). Norepinephrine and dopamine turnover rates in the medial preoptic area and the mediobasal hypothalamus of the rat brain after various endocrinological manipulations. *Endocrinology* **106**: 1852-1853
- Houslay, M.D. (1991). "Cross-talk": a pivotal role for protein kinase C in the modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur. J. Biochem.* **195**: 9-27
- Jarrad, L.E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. Neural Biol.* **60**: 9-26

Jennes, L.E., Beckman, W.C., Stumpf, W.E., Grzanna, R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. *Exp. Brain Res.* **46**: 331-338

Jennes, L., Conn, P.M. (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in rat brain. *Frontiers in Neuroendocrinology* **15**: 51-77

Johnson, G.S., Jaworski, C.J. (1983). Glucocorticoids increase GTP-dependent adenylate activity in cultured fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* **23**: 648-652

Johnson, R.D., Minneman, K.P. (1985). α_1 -adrenergic receptors and stimulation of [3H] inositol metabolism in rat brain: regional distribution and parallel inactivation. *Brain Res.* **341**: 7-15

Johnson, R.D., Minneman, K.P. (1986). Characterization of α_1 -adrenergic receptors which increase cyclic AMP accumulation in rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* **129**: 293-305

Johnson, R.D., Minneman, K.P. (1987). Differentiation of α_1 -adrenergic receptors linked to phosphatidyl-inositol turnover and cyclic AMP accumulation in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **31**: 238-246

Johnson, R.A. and Toews, M.L. (1990). Protein kinase C activators sensitize cyclic AMP accumulation by intact 1321N1 human astrocytoma cells. *Mol. Pharmacol.* **37**: 296-303

Jones, B.E., Moore, R.Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiography study. *Brain Res.* **127**: 23-53

Jones, S.B., Toews, M.L., Turner, J.T., Bylund, D.B. (1987). α_2 -adrenergic receptor-mediated sensitization of forskolin-stimulated cyclic AMP production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 1294-1298

Kalra, P.S. (1986). Neural circuitry involved in the control of LHRH secretion: a model for preovulatory LH release. *Frontiers in Neuroendocrinology* **9**: 31-75

Kaplitt, M.G., Kleopoulos, S.P., Pfaff, D.W., Mobbs, C.V. (1993). Estrogen increases HIP-70/PLC- α messenger ribonucleic acid in the rat uterus and hypothalamus. *Endocrinology* **133**: 99-104

Karbon, E.W., Shenolikar, S., Enna, S.J. (1986). Phorbol esters enhance neurotransmitter-stimulated cyclic AMP production in rat brain slices. *J. Neurochem.* **47**: 1566-1575

Kassis, S., Fishman, P.H. (1982). Different mechanisms of desensitization of adenylate cyclase by isoproterenol and prostaglandin E₁ in human fibroblast. *J. Biol. Chem.* **257**: 5312-5318

Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Bauer, S., Jakobs, K.H. (1985). Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. *Eur. J. Biochem.* **151**: 431-437

Kawakami, M., Tercsawa, E., Kimura, F., Wakabayashi, K. (1973). Modulating effect of limbic structures on gonadotropin release. *Neuroendocrinology* **12**: 1-16

Kawakami, M., Kimura, F. (1975). Acute and chronic effects of the fornix section on cyclic gonadotropin secretion and ovulation in the rat. *Endocrinol. Jpn.* **22**: 43-48

Ke, F-Ch., Ramirez, V.D. (1987). Membrane mechanism mediate progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalami in vitro. *Neuroendocrinology* **45**: 514-517

Ke, F-Ch., Ramirez, V.D. (1990). Binding of progesterone to nerve cell membranes of rat brain using progesterone conjugated to ¹²⁵I-bovine serum albumin as a ligand. *J. Neurochem.* **54**: 467-472

Kim, K., Ramirez, V.D. (1982). In vitro progesterone stimulates the release of luteinizing hormone-release hormone from superfused hypothalamic tissue from ovariectomized estradiol-primed prepuberal rats. *Endocrinology* **111**: 750-757

Kirchick, H.J., Birnbaumer, L. (1983). Effects of estradiol treatment on rabbit luteal adenylate cyclase: loss of luteinizing hormone receptors and attenuation of the regulatory N component activity. *Endocrinology* **113**: 1629-1637

Kordon, C., Drouva, S.V., Martínez de la Escalera, G., Weiner, R.I. (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp 1621-1681

Kostellow, A.B., Chien, E.J., Morril, G.A. (1987). Calcium-dependent phosphorylation of the amphibian oocyte plasma membrane: an early event in initiating the meiotic divisions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**: 863-869

Kostellow, A.B., Ma, G.-Y., Morril, G.A. (1993). Steroid action at the plasma membrane: progesterone stimulation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C following release of the prophase block in amphibian oocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **92**: 33-44

Lacasa, D., Agli, B., Giudicelli, Y. (1988). Permissive action of glucocorticoids on catecholamine-induced lipolysis: direct "in vitro" effects on the fat cell β -adrenoceptor-coupled-adenylate cyclase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 489-497

Leatherbarrow, R.J. (1987). **Enzfitter. A non-linear regression data analysis program for the IBM PC.** Elsevier Sci., Amsterdam, 90 pp.

Leblanc, G.G., Ciaranello, R.D. (1984). α -noradrenergic potentiation of neurotransmitter-stimulated cAMP production in rat striatal slices. *Brain Res.* **293**: 57-65

Leeb-Lundberg, L.M.F., Cotecchia, S., Lomasney, J.W., DeBernardis, J.F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1985). Phorbol esters promote α_1 -adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 5651-5655

Lefkowitz, R.J., Hausdorff, W.P., Caron, M.G. (1990). Role of phosphorylation in desensitization of the β -adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**: 190-194

Leranth, C., MacLusky, N.J., Sakamoto, H., Shanabrough, M., Naftolin, F. (1985). Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* **40**: 536-539

Leranth, C., MacLusky, N., Shanabrough, M., Naftolin, F. (1988). Catecholaminergic innervation of luteinizing hormone releasing hormone and glutamic acid decarboxylase immunopositive neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* **48**: 591-602

Leung, P.C.K., Arendash, G.W., Whitmoyer, D.I., Gorski, R.A., Sawyer, C.H. (1982). Differential effects of central adrenoceptor agonists on luteinizing hormone release. *Neuroendocrinology* **34**: 207-214

Liu, A.Y.-C., Greengard, P. (1976). Regulation by steroid hormones of phosphorylation of specific protein common to several target organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 568-572

Liu, A.Y.-C., Walter, U., Greengard, P. (1981). Steroid hormones may regulate autophosphorylation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in target tissues. *Eur. J. Biochem.* **114**: 539-548

Liu, A.Y.-C. (1984). Modulation of the function and activity of cAMP-dependent protein kinase by steroid hormones. *Trends Pharmacol. Sci.* 106-108

Lohse, M.J., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990a). Multiple pathways of rapid β -adrenergic receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **265**: 3202-3209

Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990b). β -Arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science* **248**: 1547-1550

Lopes Da Silva, F.H., Witter, M.P., Boeijinga, P.H., Lohman, A.H.M. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol. Rev.* **70**: 453-511

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
- Loy, R., Koziell, D.A., Lindsey, J.D., Moore, R.Y. (1980). Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* **189**: 699-710
- Loy, R., Sheldon, R.A. (1987). Sexually dimorphic development of cholinergic enzymes in the rat septohippocampal system. *Dev. Brain Res.* **43**: 156-160
- Luine, V.N. (1985). Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. *Exp. Neurol.* **89**: 484-490
- Maggi, A., Perez, J. (1984). Progesterone and estrogens in rat brain: modulation of GABA (γ -aminobutyric acid) receptor activity. *Eur. J. Pharmacol.* **103**: 165-168
- Maggi, A., Perez, J. (1985). Role of female gonadal hormones in the CNS: clinical and experimental aspects. *Life Sci.* **37**: 893-906
- Maggi, A., Susanna, L., Bettini, E., Montero, G., Zucchi, I. (1989). Hippocampus: a target for estrogen action in mammalian brain. *Mol. Endocrinol.* **3**: 1165-1170
- Maizels, E.T., Miller, J.B., Cutler, R.E., Jackiw, V., Carney, E.M., Mizuno, K., Ohno, S., Hunzicker-Dunn, M. (1992). Estrogen modulates Ca^{++} -independent lipid-stimulated kinase in the rabbit corpus luteum of pseudopregnancy. *J. Biol. Chem.* **267**: 17061-17068
- Malbon, C.C., Rapiejko, P.J., Watkins, D.C. (1988). Permissive hormone regulation of hormone-sensitive effector systems. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**: 33-36
- Malbon, C.C., Hadcock, J.R. (1988). Evidence that glucocorticoid response elements in the 5'-noncoding region of the hamster β_2 -adrenergic receptor gene are obligate for glucocorticoid regulation of receptor mRNA levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 676-681
- Martínez de la Escalera, G., Choi, A.L.H., Weiner, R.I. (1992a). Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone pulses: intrinsic properties of the GT₁ GnRH neuronal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1852-1855
- Martínez de la Escalera, G., Choi, A.L.H., Weiner, R.I. (1992b). β_2 -adrenergic regulation of the GT₁ gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology* **131**: 1397-1402
- Martínez de la Escalera, G., Choi, A.L.H., Weiner, R.I. (1994). Biphasic gabaergic regulation GnRH secretion in GT₁-cell lines. *Neuroendocrinology* **59**: 420-425

- Maus, M., Homburger, V., Bockaert, J., Glowinski, J., Premont, J. (1990). Pretreatment of mouse striatal neurons in primary culture with 17 β -estradiol enhances the pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of $G\alpha_{o_i}$ protein subunits. *J. Neurochem.* **55**: 1244-1251
- McEwen, B.S., Biegon, A., Davis, P.T., Krey, L.C., Luine, V.N., McGinnis, M., Paden, C., M., Parsons, B., Rainbow, T.C. (1982). Steroid hormones: humoral signals which alter brain cell properties and functions. *Rec. Prog. Horm. Res.* **38**: 41-92
- McEwen, B.S., Parsons, B. (1982). Gonadal steroid action on the brain: neurochemistry and neuropharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**: 555-598
- McEwen, B. S. (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 141-147
- McPhail, L.C., Clayton, C.C., Snyderman, R. (1984). A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca^{++} -dependent protein kinase. *Science* **224**: 6622-625
- Mellon, P.L., Windle, J.J., Goldsmith, P.C., Padula, C.A., Roberts, J.L., Weiner, R.I. (1990). Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* **5**: 1-10
- Minneman, K.P. (1988). α_1 -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell calcium. *Pharmacol. Rev.* **40**: 87-119
- Mobbs, C.V., Harlan, R.E., Burrous, M.R., Pfaff, D.W. (1988). An estradiol-induced protein synthesized in the ventral medial hypothalamus and transported to the midbrain central gray. *J. Neurosci.* **8**: 113-118
- Mobbs, C.V., Fink, G., Pfaff, D.W. (1990a). HIP-70: a protein induced by estrogen in the brain and LHRH in the pituitary. *Science* **247**: 1477-1479
- Mobbs, C.V., Fink, G., Pfaff, D.W. (1990b). HIP-70: an isoform of phosphoinositol-specific phospholipase C- α . *Science* **249**: 566
- Mobbs, C.V., Kaplitt, M.G., Kow, L.M., Pfaff, D.W. (1991). PLC- α as a common mediator of estrogen and other hormones. *Mol. Cell. Endocrinol.* **80**: C187-C191
- Mobley, P.L., Sulser, F. (1980a). Adrenal corticoids regulate sensitivity of noradrenaline receptor-coupled adenylate cyclase in brain. *Nature* **286**: 608-609
- Mobley, P.L., Sulser, F. (1980b). Adrenal steroids affect the norepinephrine sensitive adenylate cyclase system in the rat limbic forebrain. *Eur. J. Pharmacol.* **65**: 322-323
- Mobley, P.L., Mannier, H., Sulser, F. (1983). Norepinephrine-sensitive adenylate cyclase system in rat brain: role of adrenal corticosteroids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**: 71-77

- Moore, R.Y., Bloom, F.E. (1979). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu. Rev. Neurosci.* 2: 113-168
- Morris, G.M., Hadcock, J.R., Malbon, C.C. (1991). Cross-regulation between G-protein-coupled receptors. Activation of β_2 -adrenergic receptors increases α_1 -adrenergic receptor mRNA levels. *J. Biol. Chem.* 266: 2233-2238
- Morrow, A.L., Creese, I. (1986). Characterization of α_1 -adrenergic receptor subtypes in rat brain: a re-evaluation of [3 H]-WB-4101 and [3 H]-prazosin binding. *Molec. Pharmacol.* 29: 321-330
- Morse, J.K., Scheff, S.W., DeKosky, S.T. (1986). Gonadal steroids influence axonal sprouting in the hippocampal dentate gyrus: a sexually dimorphic response. *Exp. Neurol.* 94: 649-658
- Munemura, M., Takahashi, A., Sibley, D.R. (1989). Chronic estrogen treatment promotes a functional uncoupling of the D₂ dopamine receptor in rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* 124: 346-355
- Murakami, K., Routtenberg, A. (1985). Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca⁺⁺. *FEBS Lett.* 192: 189-193
- Nakada, M.T., Stadel, J.M., Poksay, K.S., Crooke, S.T. (1987). Glucocorticoid regulation of β -adrenergic receptors in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol. Pharmacol.* 31: 377-384
- Negro-Vilar, A., Ojeda, S.R., McCann, S.M. (1979). Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals in vitro. *Endocrinology* 104: 1749-1757
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334: 661-665
- Norris, J.S., Brown, P., Cohen, J., Cornett, L.E., Kohler, P.O., MacLeod, S.L., Popovich, K., Robey, R.B., Sifford, M., Syms, A.J., Smith, R.G. (1987). Glucocorticoid induction of β -adrenergic receptors in the DDT MF-2 smooth muscle cell line involves synthesis of new receptor. *Mol. Cell. Biochem.* 74: 21-27
- Nowak, F.V., Swerdloff, R.S. (1985). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by superfused hypothalami in response to norepinephrine. *Biol. Reprod.* 33: 790-796
- Pelletier, G., Liao, N., Follea, N., Govindan, M.V. (1988). Mapping of estrogen receptor producing cells in the rat brain by in situ hybridization. *Neurosci. Lett.* 94: 23-28
- Petitti, N., Etgen, A.M. (1989). Progesterone depression of norepinephrine-stimulated cAMP accumulation in hypothalamic slices. *Mol. Brain Res.* 5: 109-119

Petitti, N., Etgen, A.M. (1990). α_1 -Adrenoceptor augmentation of β -stimulated cAMP formation is enhanced by estrogen and reduced by progesterone in rat hypothalamic slices. *J. Neurosci.* **10**: 2842-2849

Petitti, N., Etgen, A.M. (1992). Progesterone promotes rapid desensitization of α_1 -adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* **55**: 1-8

Petrovic, S.L., McDonald, J.K., Bedran De Castro, J.C., Snyder, G.D., McCann, S.M. (1985). Regulation of anterior pituitary and brain β -adrenergic receptors by ovarian steroids. *Life Sci.* **37**: 1563-1570

Pfaff, D.W., McEwen, B.S. (1983). Actions of estrogens and progestins on nerve cells. *Science* **219**: 808-814

Pilc, A., Enna, S.J. (1985). Synergistic interaction between α - and β -adrenoceptors in rat brain cortical slices: possible site for antidepressant drug action. *Life Sci.* **37**: 1183-1194

Pilc, A., Enna, S.J. (1986). Activation of α_2 -adrenergic receptors augments neurotransmitter-stimulated cyclic AMP accumulation in rat brain cerebral cortical slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237**: 725-730

Pitcher, J., Lohse, M.J., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992). Desensitization of the isolated β_2 -adrenergic receptor by β -adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry* **31**: 3193-3197

Port, J.D., Hadcock, J.R., Malbon, C.C. (1992). Cross-regulation between G-protein-mediated pathways. Acute activation of the inhibitory pathway of adenylyl cyclase reduces β_2 -adrenergic receptor phosphorylation and increases β -adrenergic responsiveness. *J. Biol. Chem.* **267**: 8468-8472

Port, R.L., Beggs, A.L., Patterson, M.M. (1987). Hippocampal Substrate of Sensory Associations. *Physiol. Behav.* **39**: 643-647

Premont, R.T., Iyengar, R. (1989). Heterologous desensitization of the liver adenylyl cyclase: analysis of the role of G proteins. *Endocrinology* **125**: 1151-1160

Premont, R.T., Jakobowitz, O., Iyengar, R. (1992). Lowered responsiveness of the catalyst of adenylyl cyclase to stimulation by Gs in heterologous desensitization: a role for adenosine 3',5'-monophosphate-dependent phosphorylation. *Endocrinology* **131**: 2774-2784

Ramón y Cajal, S. (1911). *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Paris: Maloine

Rance, N., Wise, P.M., Selmanoff, M.K., Barraclough, C.A. (1981). Catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated changes in median eminence luteinizing hormone-releasing hormone and serum gonadotropins on proestrous and diestrous day 1. *Endocrinology* **108**: 1795-1802

Rawlis, J.N.P. (1985). Associations across time: The hippocampus as a temporary memory store. *Behav. Brain Sci.* **8**: 479-496

Reithman, C., Gierschik, P., Werdan, K., Jakobs, K.H. (1991). Role of inhibitory G protein α -subunits in adenylyl cyclase-desensitization. *Mol. Cell. Endocrinol.* **82**: C215-C221

Reimer, R.K., Wu, Y.Y., Bottari, S.P., Jacobs, M.M., Goldfien, A., Roberts, J.M. (1988). Estrogen reduced β -adrenoceptor-mediated cAMP production and concentration of the guanyl nucleotide-regulatory protein, Gs, in rabbit myometrium. *Mol. Pharmacol.* **33**: 389-395

Robinson, J.P., Kendall, D.A. (1989a). No role for phospholipase A₂ and protein kinase C in the potentiation by α -adrenoceptors of β -adrenoceptor-mediated cyclic AMP formation in rat brain. *J. Neurochem.* **53**: 542-550

Robinson, J.P., Kendall, D.A. (1989b). Inositol phospholipids hydrolysis and potentiation of cyclic AMP formation by noradrenaline in rat cerebral cortex slices are not mediated by the same α -adrenoceptor subtypes. *J. Neurochem.* **52**: 690-698

Rodan, S.B., Fischer, M.K., Egan, J.J., Epstein, P.M., Rodan, G.A. (1984). The effect of Dexamethasone on parathyroid hormone stimulation of adenylate cyclase in ROS 17/2.8 cells. *Endocrinology* **115**: 951

Rodan, S.B., Rodan, G.A. (1986). Dexamethasone effects on β -adrenergic receptors and adenylate cyclase regulatory proteins Gs and Gi in ROS 17/2.8 cells. *Endocrinology* **118**: 2510-2518

Ros, M., Northup, J.K., Malbon, C.C. (1988). Steady-state levels of G-proteins and β -adrenergic receptors in rat fat cells. Permissive effects of thyroid hormones. *J. Biol. Chem.* **263**: 4362-4368

Ros, M., Northup, J.K., Malbon, C.C. (1989a). Adipocyte G-proteins and adenylate cyclase: effects of adrenalectomy. *Biochem. J.* **257**: 737-744

Ros, M., Watkins, D.C., Rapiejko, P.J., Malbon, C.C. (1989b). Glucocorticoids modulate mRNA levels for G-protein β -subunits. *Biochem. J.* **260**: 271-275

Roth, N.S., Campbell, P.T., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Lohse, M.J. (1991). Comparative rates of desensitization of β -adrenergic receptors by the β -adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 6201-6204

Saito, N., Guitart, X., Hayward, M., Tallman, J.F., Duman, R.S., Nestler, E.J. (1989). Corticosterona differentially regulates the expression of $G_{\beta\alpha}$ and $G_{i\alpha}$ messenger RNA and protein in rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 3906-3910

Sakaue, M., Hoffman, B.B. (1991). cAMP regulates transcription of the α_{2A} -adrenergic receptor gene in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 5743-5749

Salomon, Y., Londos, C., Rodbell, M. (1974). A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* **58**: 541-548

Sanchez-Andres, J.V., Olds, J.L., Alkon, D.L. (1993). Gated informational transfer within the mammalian hippocampus: a new hypothesis. *Behav. Brain. Res.* **54**: 111-116

Sanchez-Bueno, A., Sancho, J.M., Cobbold, H.P. (1991). Progesterone and oestradiol increase cytosolic Ca^{2+} in single rat hepatocytes. *Biochem. J.* **280**: 273-276

Schumacher, M., Coirini, H., Frankfurt, M., McEwen, B.S. (1989). Localized actions of progesterone in hypothalamus involve oxytocin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 6798-6801

Schumacher, M. (1990a). Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci.* **13**: 359-362

Schumacher, M., Coirini, H., Pfaff, D.W., McEwen, B.S. (1990b). Behavioral effects of progesterone associated with rapid modulation of oxytocin receptors. *Science* **250**: 691-694

Schwabe, U., Daly, J.W. (1977). The role of calcium ions in accumulations of cyclic adenosine monophosphate elicited by α and β -adrenergic agonists in rat brain slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **202**: 134-143

Sessler, F.M., Cheng, J-T., Watherhouse, B.D. (1988). Electrophysiological actions of norepinephrine in rat lateral hypothalamus. I. Norepinephrine-induced modulation of LH neuronal responsiveness to afferent synaptic inputs and putative neurotransmitters. *Brain Res.* **446**: 77-89

Shackelford, D.P., Jr., McConnaughey, M.M., Iams, S.G. (1988). The effects of estradiol on α -adrenoceptors in selected regions of the rat brain. *Brain Res. Bull.* **21**: 329-333

Shimizu, H., Daly, J.W., Creveling, C.R. (1969). A radioisotopic method for measuring the formation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in incubated slices of brain. *J. Neurochem.* **16**: 1609-1619

Shivers, B.D., Harlan, R.E., Morrell, J.I., Pfaff, D.W. (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* **304**: 345-347

- Sibley, D.R., Lefkowitz, R.J. (1985). Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature* **317**: 124-129
- Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987). Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell* **48**: 913-922
- Simmerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L.W. (1990). Distribution of androgen and estrogen-receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* **294**: 76-95
- Simmoteit, R., Schulzki, H.-D., Palm, D., Mollner, S., Pfeuffer, T. (1991). Chemical and functional analysis of components of adenylyl cyclase from human platelets treated with phorbol esters. *FEBS Lett.* **285**: 99-103
- Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Brown, K.O., Sternweis, P.C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* **251**: 804-807
- Stenstrom, S., Richelson, E. (1982). Acute effect of ethanol on prostaglandin E_1 -mediated cyclic AMP formation by a murine neuroblastoma clone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **221**: 334-341
- Stone, E.A., Herrera, A.S. (1986). α -adrenergic modulation of cyclic AMP formation in rat CNS: highest level in olfactory bulb. *Brain Res.* **384**: 401-403
- Stone, E.A., McEwen, B.S., Herrera, A.S. Carr, K.D. (1987). Regulation of α and β components of noradrenergic cyclic AMP response in cortical slices. *Eur. J. Pharmacol.* **141**: 347-356
- Strosberg, A.D. (1990). Biotechnology of β -adrenergic receptors. *Mol. Neurobiol.* **4**: 211-250
- Sugden, A. L., Klein, D.C. (1988). Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* **50**: 149-155
- Summers, R.J., McMartin, L.R. (1993). Adrenoceptors and their second messenger systems. *J. Neurochem.* **60**: 10-23
- Taleisnik, S., Sawyer, C.H., (1986). Activation of the CNS noradrenergic system may inhibit as well as facilitate pituitary luteinizing hormone release. *Neuroendocrinology* **44**: 265-268
- Terasawa, E., Kawakami, M. (1973). Effects of limbic forebrain ablation on pituitary gonadal function in the female rat. *Endocrinol. Jpn.* **20**: 277-290
- Teyler, T.J., Vadaris, R.M., Lewis, D., Rawitch, A.B. (1980). Gonadal steroids: effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. *Science* **209**: 1017-1019

Teyler, T., DiScenna, P. (1985). The role of hippocampus in memory: a hypothesis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **9**: 377-389

Thomas, P., Meizel, S. (1989). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{++} influx. *Biochem. J.* **264**: 539-546

Thomson, F.J., Johnson, M.S., MacEwan, D.J., Mitchell, R. (1993). Oestradiol-17 β modulates the actions of pharmacologically distinct forms of protein kinase C in rat anterior pituitary cells. *J. Endocrinol.* **136**: 105-117

Ungar, S., Makman, M.H., Morris, S.A., Etgen, A.M. (1993). Estrogen uncouples β -adrenergic receptor from the stimulatory guanine nucleotide-binding protein in female rat hypothalamus. *Endocrinology* **133**: 2818-2826

Vacas, M.I., Cardinali, D.P. (1980). Effect of estradiol on α and β -adrenoceptor density in medial basal hypothalamus, cerebral cortex and pineal gland of ovariectomized rats. *Neurosci. Lett.* **17**: 73-77

Vanacek, J., Sugden, D., Weller, J.L., Klein, D.C. (1985). Atypical synergistic α_1 - and β -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* **116**: 2167-2173

Velasco, M.E., Taleisnik, S. (1969). Effect of hippocampal stimulation on the release of gonadotropin. *Endocrinology* **85**: 1154-1159

Wagner, H. R., Crutcher, K.A., Davis, J.N. (1979). Chronic estrogen treatment decreases β -adrenergic responses in rat cerebral cortex. *Brain Res.* **171**: 147-151

Wagner, H.R., Davis, J.N. (1980). Decreased β -adrenergic responses in the female rat brain are eliminated by ovariectomy: correlation of [3H] dihydroalprenolol binding and catecholamine stimulated cyclic AMP levels. *Brain Res.* **201**: 235-239

Watanabe, Y., Horn, F., Bauer, S., Jakobs, K.H. (1985). Protein kinase C interferes with Ni-mediated inhibition of human platelet adenylate cyclase. *FEBS Lett.* **192**: 23-27

Watherhouse, B.D., Sessler, F.M., Cheng, J-T., Woodward, D.J., Azizzi, S.A., Moises, H.C. (1988). New evidence for a gating action of norepinephrine in central neuronal circuits of mammalian brain. *Brain Res. Bull.* **21**: 425-432

Weiland, N.G., Wise, P.M. (1987). Estrogen alters the diurnal rhythm of α_1 -adrenergic receptor densities in selected brain regions. *Endocrinology* **121**: 1751-1758

Weiland, N.G., Wise, P.M. (1989). Diurnal rhythmicity of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors in ovariectomized, ovariectomized estradiol-treated and proestrous rats. *Neuroendocrinology* **50**: 655-662

- Weesner, G.D., Krey, L.C., Pfaff, D.W. (1993). α_1 -adrenergic regulation of estrogen-induced increases in luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) mRNA levels and release. *Mol. Brain Res.* 17: 77-82
- Wilkinson, M., Herdon, H., Pearce, M., Wilson, C. (1979). Radioligand binding studies on hypothalamic noradrenergic receptors during the estrous cycle or after steroid injection in ovariectomized rats. *Brain Res.* 168: 652-655
- Wilkinson, M., Bhanot, R., Wilkinson, D.A., Brawer, J.R. (1983). Prolonged estrogen treatment induces changes in opiate, benzodiazepine and β -adrenergic binding sites in female rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 11: 279-281
- Wilson, K.M., Minneman K.P. (1990). Different pathways of [3 H]-inositol phosphate formation mediated by α_{1a} and α_{1b} -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 265: 17601-17606
- Wimer, R.E., Wimer, C.C. (1985). Three sexual dimorphisms in the granule cell layer of the hippocampus in house mouse. *Brain Res.* 328: 105-109
- Wirz-Justice, A. (1987). Circadian rhythms in mammalian neurotransmitter receptors. *Prog. Neurobiol.* 29: 219-259
- Wise, P.M., Rance, N., Barraclough, C.A. (1981). Effects of estradiol and progesterone on catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic regions in ovariectomized rats. *Endocrinology* 108: 2186-2193
- Witkin, J.W., Paden C. M., Silverman, A.J. (1982). The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology* 35: 429-428
- Wong, M., Moss, R.L. (1991). Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 β -estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Brain Res.* 543: 148-152
- Woodward, D.J., Moises, H.C., Waterhouse, B.D., Hoffer, B.J., Freedman, R. (1979). Modulatory actions of norepinephrine in the central nervous system. *Fed. Proc.* 38: 2109-2116
- Wu, D., Katz, A., Lee, C.H., Simon, M.I. (1992). Activation of phospholipase C by α_1 -adrenergic receptors is mediated by the α subunits of Gq family. *J. Biol. Chem.* 267: 25798-25802
- Yamamoto, K.R. (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* 19: 209-215
- Yoshimasa, T., Sibley, D.R., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1987). Cross-talk between cellular signaling pathways suggested by phorbol-ester-induced adenylate cyclase phosphorylation. *Nature* 327: 67-70

Zilles, K., Gross, G., Schleicher, A., Schildgen, S., Bauer, A., Bahro, M., Schwendemann, G., Zech, K., Kolassa, N. (1991). Regional and laminar distributions of α_1 -adrenoceptors and their subtypes in human and rat hippocampus. *Neuroscience* 40: 307-320

Zubin, P., Talcisnik, S. (1983). Hypothalamic cyclic-AMP throughout the 4-day estrous cycle of the male rat. *Brain Res.* 271: 273-277