

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**ESTUDIOS SOBRE EL EJE
HIPOFISO-TIMICO Y SUS CAMBIOS
DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.**

TESIS

Tesista: Bioquímico Oscar Alfredo Brown.

Director de Tesis: Doctor Rodolfo Gustavo Goya.

**Asesor Científico: Profesor Doctor Carlos Alberto
Fossati.**

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas (INIBIOLP) y Cátedra de Histología "B", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Expediente: código 700 N° 40868/93.

Año: 1997

PREFACIO

El plan de esta obra refleja el interés del autor en ofrecer al lector, que en general no será un especialista en los temas abordados, por una parte una introducción en la cual puedan encontrarse además del marco temático imprescindible para interpretar los resultados obtenidos, una revisión monográfica actualizada de distintos subtemas a los que, por su novedad y/o especialización, no resulta fácil acceder bibliográficamente en nuestro medio. En el mismo sentido apunta la extensa bibliografía presentada al final. Por otra parte, se ha decidido proveer una detallada descripción metodológica de las técnicas y procedimientos empleados en el presente trabajo. El autor confía en que en este aspecto, la obra pueda ser utilizada como un "manual de mesada" por aquellos interesados en repetir o expandir los estudios aquí descritos. Las secciones Resultados y Discusión se han diagramado en forma concisa tratando de incluir sólo aquellos experimentos que arrojaron resultados de razonable relevancia y, en lo referente a la Discusión, de no repetir conceptos o datos ya citados en la Introducción.

En resumen, se espera que esta Tesis Doctoral, además de constituir un trabajo original de nivel científico y académico satisfactorio, resulte una obra de utilidad teórica y práctica, en particular para aquellos jóvenes que comiencen su formación científica en temas relacionados.

CURRICULUM DE LA TESIS

A) PREMIOS

- Premio bienal "Federación Bioquímica 1993" por el trabajo: "Hormonas tímicas como mediadoras de la integración inmunogonadotropa" Oscar A. Brown, Yolanda E. Sosa, Rodolfo G. Goya publicado en Acta Bioquímica Latinoamericana.

B) PUBLICACIONES

1.- "Histones and related nuclear preparations stimulate prolactin release *in vitro*" O.A. Brown, Y.E. Sosa and R.G. Goya. Medical Science Research, 21: 799-780 (1993).

2.- "Hormonas tímicas como mediadoras de la integración inmunogonadotropa" O.A. Brown, Y.E. Sosa, R.G. Goya. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 28: 203-209 (1994).

3.- "*In vitro* studies on the thymus - pituitary axis in young and old rats" R.G. Goya, Y.E. Sosa, O.A. Brown and M. Dardenne. Annals of the New York Academy of Sciences 741: 108-114 (1994).

4.- "Hormonal modulation of antioxidant enzyme activities in young and old rats" A.D. Bolzan, O.A. Brown, R.G. Goya and M.S. Bianchi. Experimental Gerontology 30: 169-175 (1995).

5.- "Thymic hormones, histones and homeostasis" R.G. Goya, Y.E. Sosa, O.A. Brown, K. Golik. International Journal of Thymology 3(5): 278-281 (1995).

6.- "Age-dependent prolactin-releasing activity of nucleoproteins" O.A. Brown, Y.E. Sosa, G.M. Cónsole and R.G. Goya. Mechanisms of Ageing and Development 89: 103-111 (1996).

7.- "Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rat" Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Mechanisms of ageing and development 95: 157-166 (1997).

8.-"Thyrotropin-releasing activity of histone H2A, H2B and peptide MB-35" Brown OA, Sosa YE, Goya RG. Peptides. En Prensa

C) COMUNICACIONES A CONGRESOS

1.-"Hormonas tímicas como mediadoras de la integración inmunogonadotropia" Oscar A. Brown, Yolanda E. Sosa y Rodolfo G. Goya. XIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción Humana (ALIRH). Buenos Aires, Argentina, 23 al 26 de Mayo de 1993.

2.-"Descripción de un bioensayo de alta sensibilidad para el dosaje de sustancias con actividad hipofisotropa" Rodolfo G. Goya, Yolanda E. Sosa, Oscar A. Brown. VI Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial. Buenos Aires, Argentina, 30 de Mayo al 5 de Junio de 1993.

3.-"Hormone-releasing activity of thymic epithelial cell products on perfused pituitary cells from rats of different ages" Rodolfo G. Goya, Yolanda E. Sosa, Oscar A. Brown, Mireille Dardenne. 2nd International Congress of the International Society of Neuroimmunomodulation (ISNIM), Paestum (Salerno), Italy, September 12 - 17, 1993.

4.- "Hypophysiotropic activity of calf thymus histones *in vitro*: changes with age" O.A. Brown, Y.E. Sosa and R.G. Goya. 3rd International Congress of the ISNIM. Rio de Janeiro, Brazil. April 24-28, 1994.

5.-"Aging, pituitary hormones and antioxidant enzyme activities in immune and nonimmune organs of rats" O.A. Brown, A.D. Bolzan, M.S. Bianchi and R.G. Goya. 3rd International Congress of the ISNIM. Rio de Janeiro, Brazil. April 24-28, 1994.

6.-"Cambios en los niveles de ADN circulante durante el envejecimiento en roedores y su relación con el balance neuroendócrino" O.A. Brown, K.I. Golik, Y.E. Sosa, R.G. Goya. XXXIX Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Argentina, 25 al 30 de Noviembre de 1994.

7.-"Growth hormone-releasing activity of histones H2A and H2B". Brown OA, Sosa YE, Goya RG. 187th Meeting of the Society for Endocrinology with the Endocrine Section of the RSM, London, UK, November 26 - 28 1996.

D) SUBSIDIOS OBTENIDOS

1.- Grant otorgado a O.A. Brown por Sandoz Foundation for Gerontological Research de US\$ 8.000. Basilea, Suiza. 1995.

2.- Grant otorgado a O.A. Brown por The Sir Halley Stewart Trust de £ 2.000. Cambridge, U.K. 1995.

E) BECAS OBTENIDAS DURANTE EL TRANS-CURSO DEL PERIODO DE TESIS

1.- Beca de Iniciación de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires, desde Abril de 1993 hasta Abril de 1994. Obtenida por concurso.

2.- Beca de Iniciación del Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CONICET), desde Abril de 1994 hasta el presente. Obtenida por concurso.

3.- Beca del British Council - Fundación Antorchas para realizar trabajo de investigación en el Laboratorio de Neurobiología Molecular, Departamento de Fisiología de la Universidad de Wales, Reino unido. Desde el 1 de Enero al 1 de Julio de 1995. Obtenida por concurso. Autorizado por el CONICET.

4.- Beca de Perfeccionamiento del CONICET desde Abril de 1996 hasta el presente. Rankeado primero en la lista de solicitantes de Beca de Perfeccionamiento por la Com. de Cs. Medicas con un puntaje de 96/100. Obtenida por concurso.

F) CURSOS REALIZADOS DURANTE EL TRANS-CURSO DEL PERIODO DE TESIS

1.- "Biofísica de las membranas biológicas. Estructura e interacciones Moleculares". Organizado por el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP). Duración: 50 horas, del 7 al 21 de Junio de 1993, con evaluación final.

2.- "Espectrometría nuclear experimental". Organizado por el Departamento de Física de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Duración: 40 horas, del 9 al 14 de Agosto de 1993. Con evaluación final.

3.- "Cinética enzimática avanzada". Organizado por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Duración: un cuatrimestre con 8 horas semanales de teoría y 30 horas experimentales, del 10 de Agosto al 15 de Diciembre de 1993. Con evaluación final.

4.- "Desarrollo de la ciencia moderna". Organizado por la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP como requisito dentro de las carreras de Doctorado. Segundo semestre de 1994. Con evaluación final.

5.- "Neurobiología molecular". Realizado en el Laboratorio de Neurobiología Molecular, Universidad de Wales, Reino Unido. Duración: 2.000 horas, del 1 de Enero al 1 de Julio de 1995. Con evaluación final.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodolfo G. Goya, INIBIOLP-Cátedra de Histología “B” de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, quien me dirigió en este trabajo y otros trabajos de investigación, me brindó sus conocimientos y el apoyo y estímulo para realizarme a nivel humano y obtener la habilidad necesaria para desenvolverme en el futuro como científico. Bajo su dirección nunca me sentí “solo un par manos mas”, sino que tuve oportunidad de diseñar mis protocolos, discutir proyectos, escribir trabajos y desarrollar mi capacidad de autogestión que convergieron en la obtención de dos subsidios y numerosas donaciones. Tanto él cómo su esposa Yolanda E. Sosa me brindaron su cariño y comprensión haciéndome sentir como parte de la familia.

Al Dr. Carlos A. Fossati, Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por su consejo al final de mi carrera de grado acerca del porvenir y por aceptar ser mi Asesor Científico.

Al Dr. Pedro R. Lowenstein y la Dra. María G. Castro, Molecular Medicine Unit of the Univ. of Manchester UK; a la Dra. Mirelle Dardenne, Hôpital Necker Paris Francia; al Dr. Jorge Ronderos, Cátedra de Histología “B” y al Médico Federico Bolognani por la lectura crítica y sugerencias brindadas en esta Tesis.

Al Dr. Fernando Estivariz y las Dras. María I. Morano y María G. Castro, CEEN, y al Dr. Juan J. Gagliardino, CENEXA, por orientarme ya desde épocas tempranas de mi carrera de grado hacia la investigación.

A la Sra. Yolanda E. Sosa, la Lic. Mónica Carino, la Bqca. Karinne Golik y a la Srta. Carina Verzi, Cátedra de Histología “B”, por sus asistencias técnica y revisión de este material.

Al Lic. Eduardo Heras, INIBIOLP, por enseñarme los conceptos básicos de diseño editorial.

A los Dres. Cesar L Gómez Dum, Cátedra de Histología “B” y Rodolfo Brenner, INIBIOLP por brindarme el lugar de trabajo y todo el apoyo necesario para concretar mis aspiraciones.

A la Dra. Gloria Cónsole por brindarme gentilmente las fotos de histología presentadas en el corriente trabajo.

A todos los integrantes del plantel de investigación de la Cátedra de Histología “B” y del INIBIOLP quienes me brindaron un ambiente cálido de trabajo, me alentaron, criticaron y dieron consejos.

A mi madre y mis hermanos, Rodolfo, Yoli, Cesar, Gloria y el Dr. Oscar Pessino por brindarme su mas sincero apoyo en mis “momentos difíciles”.

Por último pido disculpas si alguien se siente omitido en mis agradecimientos, ya que no fue intencional (“...*nobody is perfect, I guess so...*” Panty Rap, In : TINSEL TOWN REBELLION, Frank Zappa).

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	1
CAPITULO 1: CLASIFICACION DE LOS MENSAJEROS QUIMICOS. RECEPTORES PARA MENSAJEROS PEPTIDICOS. LAS GLANDULAS ENDOCRINAS DEL ORGANISMO	1
<i>1) LOS TRES SISTEMAS DE COMUNICACIÓN DEL ORGANISMO</i>	1
<i>2) METODOS DE COMUNICACIÓN ENTRE LAS CELULAS</i>	2
<i>3) TIPOS DE MENSAJEROS QUIMICOS</i>	3
<i>4) RECEPTORES PARA HORMONAS PEPTIDICAS, NEUROPEPTIDOS Y NEUROTRANSMISORES</i>	6
<i>5) LAS GLANDULAS ENDOCRINAS Y SUS HORMONAS</i>	19
CAPITULO 2: LA ADENOHIPOFISIS Y SUS HORMONAS. CONTROL HIPOTALAMICO DE LA SECRECION ADENOHIPOFISARIA-FACTORES HIPOFISOTROPOS	22
<i>1) ESTRUCTURA MACROSCOPICA, ORIGEN EMBRIOLOGICO, DIVISIONES Y SUBDIVISIONES DE LA HIPOFISIS Y RELACIONES</i>	22
<i>2) IRRIGACION E INERVACION DE LA HIPOFISIS</i>	24
<i>3) POBLACIONES CELULARES ADENOHIPOFISARIAS: ESTRUCTURA, ULTRAESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN</i>	25
<i>4) HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS: ESTRUCTURA QUIMICA, SINTESIS Y FUNCION</i>	32
<i>5) CONTROL DE LA SECRECION DE HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS</i>	49
<i>6) FACTORES HIPOFISIOTROPOS</i>	58
CAPITULO 3: EL TIMO Y EL SISTEMA INMUNE. INTERCOMUNICACION ENTRE EL SISTEMA INMUNE Y EL ENDOCRINO	65
<i>1) EL TIMO</i>	65
<i>2) EL SISTEMA INMUNE</i>	66
<i>3) HORMONAS TIMICAS</i>	70
<i>4) COMUNICACION BIDIRECCIONAL ENTRE LOS SISTEMAS INMUNE Y NEUROENDOCRINO</i>	81
CAPITULO 4: HISTONAS: SUS FUNCIONES CLASICAS Y NO CLASICAS. APOPTOSIS	85
<i>1) COMPOSICION Y FUNCIONES NUCLEARES DE LAS HISTONAS</i>	85
<i>2) ACTIVIDADES EXTRACROMOSOMALES DE LAS HISTONAS</i>	87

3) HISTONAS Y HORMONAS TIMICAS	89
4) LAS HISTONAS Y NUCLEOHISTONAS COMO "SEÑALES APOPTOTICAS"	91
CAPITULO 5: ENVEJECIMIENTO: SUS TEORIAS. ALTERACIONES HORMONALES E INMUNES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	94
1) DEFINICION Y CONSECUENCIAS	94
2) TEORIAS DEL ENVEJECIMIENTO	95
3) ENVEJECIMIENTO ENDOCRINO	102
4) ENVEJECIMIENTO INMUNE	112
<u>OBJETIVOS</u>	118
RESUMEN DEL ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE EL TEMA	118
OBJETIVOS ESPECIFICOS	120
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	121
MATERIALES	121
1) REACTIVOS Y DROGAS	121
2) EQUIPOS	123
3) MISCELANEA	123
METODOS	124
1) ANIMALES	124
2) OBTENCION DE CELULAS DISPERSAS DE ADENOHIPOFISIS DE RATA	124
3) DETERMINACION DEL CONTENIDO DE DNA	127
4) PERIFUSION CELULAR	129
5) INCUBACION DE CELULAS DISPERSAS	131
6) PREPARACION DE LOS EXTRACTOS DE EMINENCIA MEDIA DE RATA	131
7) DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY	132
8) RADIOINMUNOANALISIS (RIA) DE LAS HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS: GH, PRL, LH, FSH Y TSH	133
9) ESTIMULOS UTILIZADOS	137
10) VERIFICACION DE LOS POSIBLES EFECTOS ADITIVOS O SINERGICOS DE TIMULINA E HISTONAS CON LOS FACTORES LIBERADORES DE LAS HORMONAS HIPOFISARIAS	138
11) INVESTIGACION DEL POSIBLE ROL DEL Ca^{+2} , INOSITOL-FOSFATO, DIACILGLICEROL Y AMPc EN LA ACCION DE LA TIMULINA Y LAS HISTONAS	139
12) ESTUDIOS CON RATAS CRONICAMENTE CANULADAS IN-TRAYUGULARMENTE	140

<i>13) ANIMALES TRATADOS CON DEXAMETASONA</i>	142
<i>14) ESTADISTICA</i>	143
<u>RESULTADOS</u>	144
A) IMPACTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA FUNCION HIPOFISARIA EN LA RATA	144
B) COMPORTAMIENTO DE LAS CELULAS HIPOFISARIAS FRENTE A LA TIMULINA : CAMBIOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	149
C) COMPORTAMIENTO SECRETORIO DE LAS CELULAS HIPOFISARIAS FRENTE A LAS HISTONAS Y NUCLEOHISTONAS	157
D) DNA CIRCULANTE Y MUERTE CELULAR SISTEMICA	169
<u>DISCUSION</u>	172
A) IMPACTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA FUNCION HIPOFISARIA	172
B) COMPORTAMIENTO DE LAS CELULAS HIPOFISARIAS FRENTE A LA TIMULINA : CAMBIOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	176
C) COMPORTAMIENTO DE LAS CELULAS ADENOHIPOFISARIAS FRENTE A LAS HISTONAS Y NUCLEOHISTONAS: CAMBIOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO. DNA CIRCULANTE Y MUERTE CELULAR SISTEMICA	182
<u>CONCLUSIONES</u>	187
<u>REFERENCIAS</u>	189

INTRODUCCION

CAPITULO 1: CLASIFICACION DE LOS MENSAJEROS QUIMICOS. RECEPTORES PARA MENSAJEROS PEPTIDICOS. LAS GLANDULAS ENDOCRINAS DEL ORGANISMO.

1) LOS TRES SISTEMAS DE INTEGRACION DEL ORGANISMO:

El organismo tiene tres sistemas diferentes de integración: el sistema nervioso, el endócrino y el inmune, cada uno de los cuales posee su propio tipo de mensajeros químicos. Las células nerviosas se comunican mediante neurotransmisores, las glándulas endocrinas mediante hormonas y el sistema inmune mediante citoquinas. Este concepto debe considerarse como una primera aproximación ya que existe creciente evidencia de que algunos tipos de células inmunes producen hormonas y de que células de los sistemas endocrino y nervioso producen citoquinas. Estos tres sistemas no son independientes entre sí, sino que interactúan unos con otros. En la fig. II se muestra un ejemplo de esto: la interacción del eje hormonal hipotálamo-hipofiso-adrenal, con el sistema nervioso e inmune y la influencia de los estímulos cognitivos y no cognitivos.

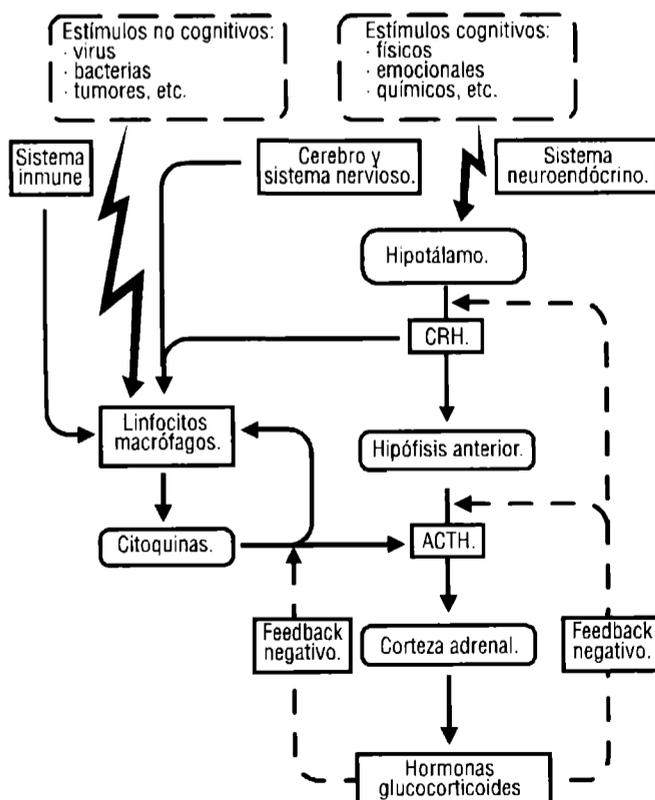


FIGURA II: Integración psicoinmunoneuroendócrina (modificada de: Smith EM and Blalock JE 1985).

Como estos tres sistemas interaccionan entre sí, al conjunto se lo designa como sistema inmunoneuroendocrino (Blalock JE 1989).

El sistema nervioso no sólo controla la liberación de hormonas, sino que además puede influenciar la liberación de citoquinas por el sistema inmune. Las hormonas y otros mensajeros químicos modulan la actividad del sistema nervioso e inmune. Además el sistema inmune modula la actividad nerviosa y hormonal por medio de las citoquinas. Los estímulos cognitivos afectan el sistema inmunoneuroendocrino a través del sistema nervioso, mientras que los estímulos no-cognitivos como las bacterias y virus, lo hacen a través del sistema inmune. Estos tres sistemas integran sus acciones en lenguaje común por medio de receptores (Kordon and Bihoreau 1989, Blalock 1989).

2) METODOS DE COMUNICACION ENTRE CELULAS:

La fig I2 muestra algunos de los diferentes modos que tienen los mensajeros químicos para comunicarse con sus células blanco.

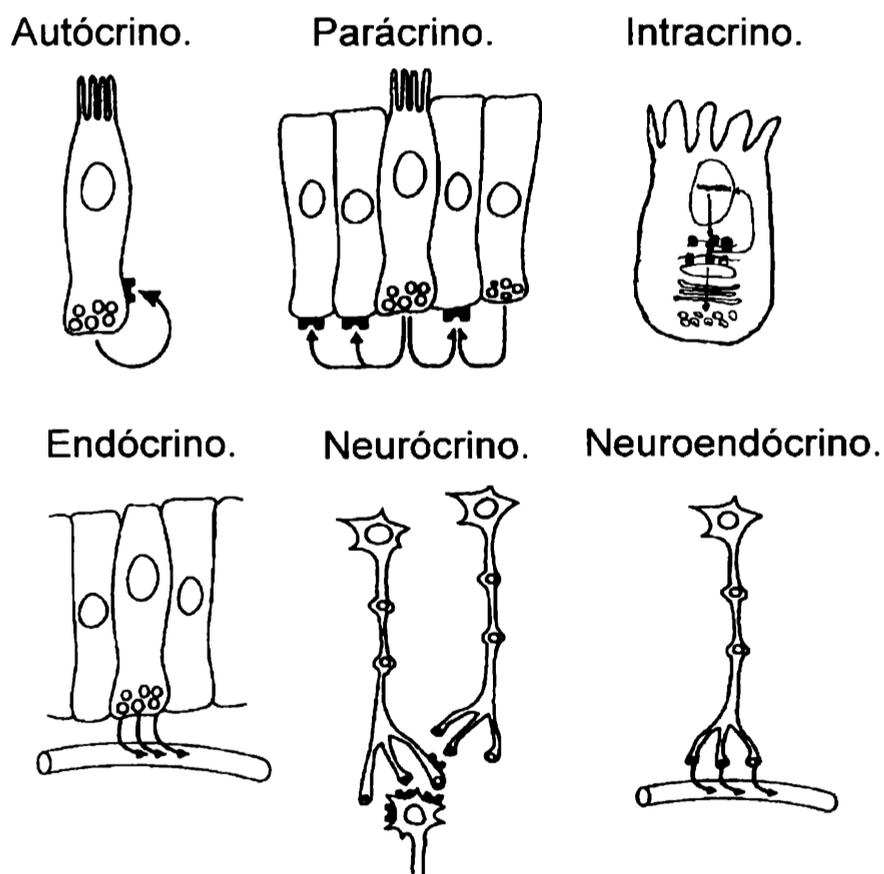


FIGURA I2: Los métodos de comunicación entre las células (Modificado de Kreiger 1993, Castro and Morrison 1995).

1) Comunicación endócrina: la célula endócrina libera la hormona al torrente sanguíneo, la cual viaja por este hasta llegar a la célula blanco, por ejemplo la hormona tiroideoestimulante (TSH) liberada por la hipófisis viaja a través del torrente sanguíneo hasta la glándula tiroidea.

II) Comunicación parácrina: la célula endocrina también libera hormonas, las cuales actúan sobre células adyacentes. Entonces la célula blanco debe estar cerca de la célula secretora y su acción se localiza dentro de un tejido particular u órgano, por ejemplo la acción inhibitoria que ejerce la somatostatina sobre la secreción de otras poblaciones celulares dentro de los islotes de Langerhans.

III) Comunicación autócrina: la célula secretora libera una hormona o neurotransmisor que actúa sobre ella misma modificando su actividad secretoria, por ejemplo un neurotransmisor que actúa presinápticamente modificando su propia liberación.

IV) Comunicación neuroendócrina: las células son neuronas modificadas, las cuales liberan neurohormonas a la circulación periférica y pueden estimular las células blanco a distancia, por ejemplo la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) liberada por el hipotálamo y que actúa sobre las células somatotropas, o la oxitocina liberada por la hipófisis posterior y actúa sobre las células del útero.

V) Comunicación neurócrina: las neuronas liberan mensajeros químicos que actúan a muy corta distancia, por ejemplo las neuronas liberan neurotransmisores como la acetilcolina dentro de las sinapsis que estimulan o inhiben a las células postsinápticas.

VI) Comunicación intracrina: en la célula secretora, el mensajero químico o su precursor son translocados al núcleo de la misma donde ejercen su efecto, por ejemplo el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2) se une en el núcleo a la histona H1 y estimula la transcripción basal de la célula (Radulescu and Wendtner 1993, Amabric *et al* 1994, Castro and Morrison 1995).

3) TIPOS DE MENSAJEROS QUIMICOS:

Existen muchos tipos de mensajeros químicos y la nomenclatura cambia constantemente a medida que se descubren nuevas substancias y nuevas funciones para las ya conocidas.

I) Fitohormonas: son los mensajeros químicos producidos por las plantas como las auxinas, quininas, giberelinas, etileno, etc., muchas son similares a las hormonas y neurotransmisores de los animales y otras son usadas como drogas capaces de actuar sobre el sistema neuroendocrino como por ejemplo: muscarina, nicotina, morfina, atropina y estriknina (Kreiger 1993).

II) Hormonas: poseen las siguientes características: a) son mensajeros químicos, efectivos en muy pequeñas cantidades, b) se sintetizan en glándulas endocrinas, c) se secretan al torrente circulatorio y se transportan por éste a través del cuerpo, d) se unen a receptores localizados en una célula blanco específica, la cual se encuentra lejos de la célula secretora, e) ejercen una acción fisiológica específica sobre la célula blanco. Esta es la definición "clásica" de hormona, la cual presenta algunos inconvenientes en todos sus puntos:

a) Mensajeros químicos efectivos en muy pequeñas cantidades: las hormonas son mensajeros químicos que regulan la acción fisiológica de la célula blanco, pero no todo regulador fisiológico es hormona (CO_2 , glucosa sanguínea, histamina, prostaglandinas, etc.). Además, aunque las hormonas son efectivas en muy pequeñas cantidades, el rango fisiológico varía enormemente por ejemplo las hormonas liberadoras de hormonas hipofisarias son activas en cantidades del orden de los pg/ml (aunque en la circulación portal puedan ser algo mayores), mientras que las hormonas hipofisarias lo son en cantidades del orden de los ng/ml.

b) Sintetizadas en glándulas endocrinas: las hormonas se sintetizan en glándulas endocrinas y algunas sustancias hormono-símiles se producen en otros lugares, como por ejemplo las neurohormonas (hormonas liberadoras de hormonas hipofisarias, oxitocina, vasopresina) que se sintetizan en células nerviosas modificadas o las citoquinas que son producidas por los linfocitos. Pero existen hormonas que, además de sintetizarse en glándulas endocrinas se producen en otros lugares por ejemplo la adrenocorticotrofina que además de en la hipófisis se produce en los linfocitos y otras células del sistema inmune.

c) Secretadas al torrente circulatorio y transportados por este a través del cuerpo: las hormonas se secretan al torrente circulatorio, pero además pueden tener una acción parácrina o autócrina. También las neurohormonas y neurotransmisores pueden ser transportados por el sistema circulatorio, aunque algunos se degraden rápidamente.

d) Se unen a receptores localizados en una célula blanco específica, la cual se encuentra lejos de la célula secretora: aunque las hormonas se definen por su acción sobre una célula blanco específica, existen hormonas que actúan sobre muchos tipos celulares diferentes como lo hacen la hormona de crecimiento (GH) y los glucocorticoides. Además, en la definición existe el problema de la lejanía al sitio de síntesis ya que algunas también actúan en forma autócrina o parácrina.

e) Ejercen una acción fisiológica específica sobre la célula blanco: aunque algunas hormonas pueden tener una función específica, otras como los estrógenos pueden tener efectos generales tales como afectar la respuesta de las células a otras hormonas o incrementar el crecimiento o la proliferación celular. Además, como pueden existir distintos tipos de receptores para la misma hormona, puede ser que

esta posea diferentes funciones en distintas células blanco. Por otro lado, muchas hormonas diferentes pueden inducir la misma respuesta celular como por ejemplo el aumento de AMPc (Hadley 1992).

III) Neurohormonas: se diferencian de las hormonas "clásicas" en que son producidas por una célula nerviosa modificada, como en el caso de la oxitocina que se sintetiza en el hipotálamo y se almacena en las terminales nerviosas que se encuentran en la neurohipófisis.

IV) Neurotransmisores: se diferencian de las hormonas "clásicas" en que se sintetizan en neuronas y se liberan dentro de la sinapsis en lugar de hacerlo al torrente sanguíneo. Tal es el caso de la acetilcolina y la dopamina.

V) Feromonas: se diferencian de las hormonas "clásicas" en que: a) se producen en glándulas exocrinas, b) se secretan fuera del organismo, c) actúan sobre otros organismos de la misma especie y d) estimulan los receptores sensoriales como gusto, olfato, etc. produciendo un cambio en la conducta y el sistema neuroendocrino del animal receptor.

VI) Parahormonas: se diferencian de las hormonas "clásicas" en que no se producen en una glándula endocrina, como por ejemplo las prostaglandinas que se producen en respuesta a hormonas y pueden tener funciones autócrinas.

VII) Prohormonas: son precursores de hormonas. Por ejemplo, el angiotensinógeno que es liberado por el hígado y en el torrente sanguíneo se convierte en angiotensina I y esta en angiotensina II la cual posee funciones hormono-símiles.

VIII) Factores de crecimiento: son mensajeros químicos que se sintetizan en varios tipos celulares y modulan el crecimiento de tejidos y diferenciación de las poblaciones celulares. Por ejemplo, el factor de crecimiento fibroblástico, el cual es sintetizado por los sistemas nervioso y endócrino.

IX) Citoquinas: son mensajeros químicos producidos por células del sistema inmune que regulan crecimiento, función y diferenciación de diferentes células blanco. En este grupo se encuentran: interferón, interleuquinas, factor de necrosis tumoral, los factores de crecimiento de células B y T y el factor activador plaquetario.

X) Vitaminas: la mayor parte de las vitaminas no se producen en el organismo y deben ser ingeridas. Las vitaminas A y D constituyen una excepción ya

que pueden sintetizarse en el organismo, la primera a partir de los carotenos y la segunda por la acción de los rayos solares sobre la piel. Además ambas poseen acciones hormono-símiles, por ejemplo la vitamina A interviene en la regulación del ciclo celular y la vitamina D interviene en la regulación de los niveles de calcio sérico.

Esta clasificación se está empezando a dejar de lado debido a la dificultad de decidir si una sustancia es hormona o no. Algunas hormonas sintetizadas en glándulas endocrinas también se producen en el cerebro y actúan como neurotransmisores por ejemplo la colecistoquinina. Muchos mensajeros químicos poseen receptores en el cerebro y por lo tanto pueden regular la actividad de las neuronas, conociéndolos colectivamente como neurorreguladores, los cuales se pueden subdividir en neurotransmisores y neuromoduladores. Un neurotransmisor es un mensajero químico liberado por la neurona presináptica que estimula vía sinapsis a la neurona postsináptica, como se mencionó anteriormente. Un neuromodulador es un mensajero químico que liberado por una neurona, célula endocrina u otro tipo celular, que al actuar sobre la neurona, modula su respuesta al neurotransmisor.

Retornando a la definición de hormona, esta se podría definir en un sentido amplio tomando la definición propuesta por Huxley en 1935, que pone más énfasis en la función biológica que en la forma de transporte o el tipo celular que la produce. Según ésta definición: "hormona es una molécula que transfiere información de un grupo de células a otro, para el bienestar de la población celular en su conjunto". Esta definición es acertada ya que integra todos los tipos de mensajeros químicos mencionados anteriormente y destaca como cualidad principal de estas moléculas la de ser agentes de transferencia de información y los diferencia de las vitaminas tales como la B. Las vitaminas intervienen en los procesos de producción de energía celular, mientras que las hormonas influyen en el control de esa producción, ordenando el sistema es decir, afectando la producción de entropía (Calvo *et al* 1985).

4) RECEPTORES PARA HORMONAS PEPTIDICAS, NEUROPEPTIDOS Y NEUROTRANSMISORES :

Las hormonas peptídicas, neuropéptidos y neurotransmisores estimulan la célula blanco uniéndose a receptores de membrana. Luego, para activar los cambios bioquímicos dentro de la célula deben activar la producción de segundos mensajeros dentro de ésta. La transducción de la información de primero a segundo mensajero es llevado a cabo por proteínas transductores como las proteínas -G y enzimas como la adenilato ciclasa.

A) Receptores de membrana

Mediante ingeniería genética se pudo caracterizar tres tipos de superfamilias de receptores (fig. I3) : I) receptores con canales iónicos, II) receptores enzimáticos y III) receptores acoplados a proteínas unidoras de nucleótidos de guanina (proteína-G). Todos ellos atraviesan la bicapa lipídica de la membrana plasmática, poseyendo así, un dominio extracelular, otro transmembrana y otro intracelular (Hollenberg 1991).

I) Receptores con canales iónicos : entre estos se encuentra el receptor nicotínico de Ach que posee cinco subunidades (2α , β , γ y δ) que forman un canal iónico que es abierto al unirse el ligando y causan un influjo iónico por ejemplo de Na^+ o Ca^{+2} que cambia el potencial de membrana y desencadena los fenómenos citoplasmáticos, el receptor GABA/benzodiazepina y el receptor de glutamato (fig. I3A).

II) Receptores enzimáticos : entre ellos se encuentran los receptores de tirosina quinasa para insulina y factor de crecimiento epidérmico o el receptor ligado a la guanilato ciclasa para el factor atrial natriurético. Este receptor consta de cuatro subunidades (2α y 2β). Las subunidades α inhiben la actividad enzimática de las β . Cuando el ligando se une a las subunidades α , deshinibe las subunidades β que se fosforilan una a otra y adquieren actividad enzimática de tirosina quinasa o guanilato ciclasa, lo que conduce a la transducción de la señal dentro de la célula (fig. I3B).

III) Receptores acoplados a proteínas-G o metabotrópicos: entre ellos se encuentran el receptor β_2 -adrenérgico (fig I3C), el receptor para LH (fig. I3D) y el receptor para TSH que es similar al de LH. Las proteínas-G acoplan la señal de unión del ligando en el dominio extracelular a la producción intracelular del segundo mensajero por ejemplo AMPc al activar la adenilato ciclasa.

El número de receptores de membrana no es fijo y pueden ser up- o down-regulados en al menos cuatro formas : a) las hormonas pueden regular el número de sus propios receptores (regulación homoespecífica), b) las hormonas pueden regular los niveles de receptores para otras hormonas (regulación heteroespecífica), c) factores no hormonales como sodio, agentes virales, etc. pueden regular el número de receptores y d) programación genética de la síntesis *de novo* de receptor en estadios específicos de la diferenciación celular durante la embriogénesis (Hollenberg 1991).

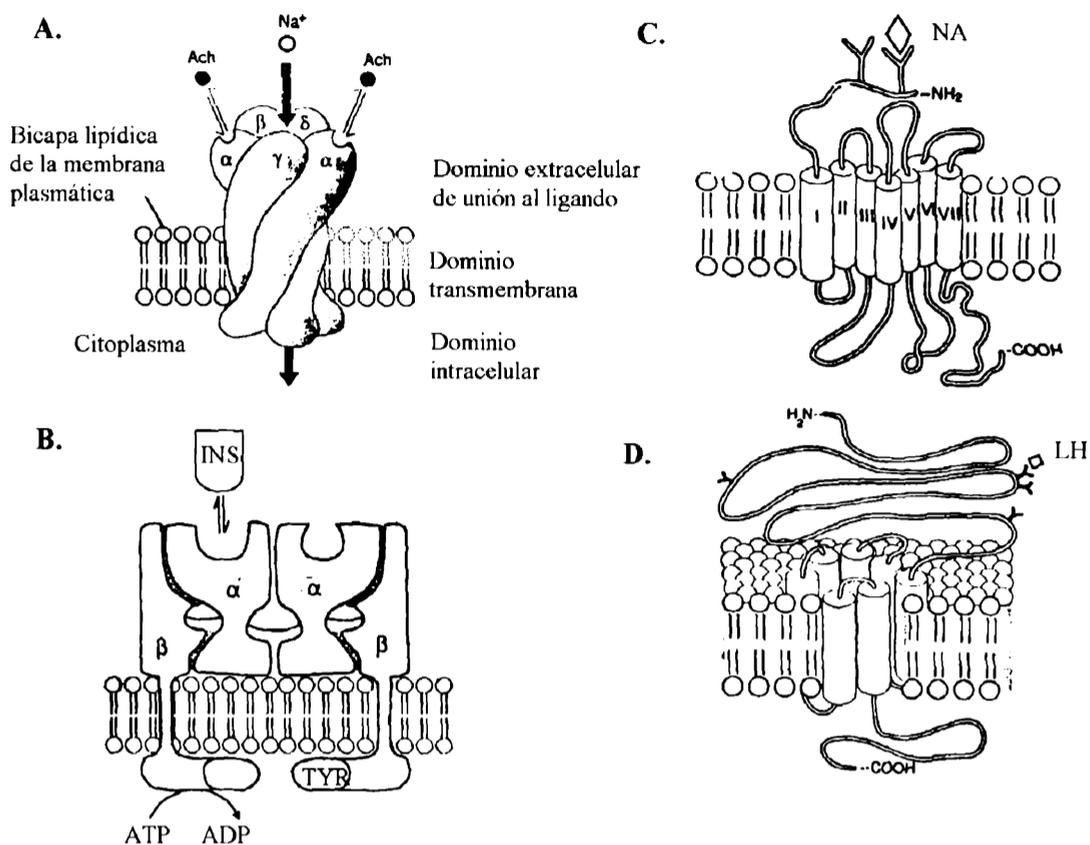


FIGURA I3: Ejemplos de receptores de membrana. (A) receptor nicotínico para Ach, cuando la Ach se une al receptor se abren canales de Na^+ que generan un potencial de acción, (B) receptor de insulina, cuyas subunidades β se desinhiben al unirse la insulina (INS) a las subunidades α y adquieren actividad de tirosina quinasa (TYR) causando fosforilación de las proteínas de membrana, (C) y (D) receptores de NA y LH respectivamente, capaces de acoplarse a proteínas-G y cuyos dominios intracelulares poseen siete secciones polipeptídicas.

Las hormonas peptídicas unidas a su receptor son internalizadas por endocitosis mediada por receptor para desactivar la hormona, pero en algunos casos los péptidos internalizados pueden ejercer efectos a largo plazo como por ejemplo división y diferenciación celular (Hollenberg 1991).

B) Transducción de señales por proteínas-G

La mayor parte de los receptores para neurotransmisores, hormonas peptídicas y neuropéptidos están acoplados a proteínas-G. Como se muestra en la fig. I4, las proteínas-G se activan cuando el ligando se une a su receptor de membrana y luego estimulan o inhiben la síntesis de segundos mensajeros (Spiegel 1989).

Se conocen al menos 12 miembros diferentes dentro de la superfamilia de proteínas-G. Cuatro de ellos estimulan la síntesis de segundos mensajeros (G_s) y

tres la inhiben (G_i). Otras proteínas-G regulan canales de calcio (G_o), canales de potasio (G_k) los sistemas de fosfolipasa A (G_{pla}) y fosfolipasa C (G_{plc}), etc. Las proteínas-G tienen tres componentes (α , β y γ), de diferente estructura y función, que se disocian para activar las enzimas necesarias para la síntesis de segundos mensajeros (Spiegel 1989, Taylor 1990).

Cada hormona puede tener diferentes efectos sobre diferentes células blanco debido a que los receptores pueden estar acoplados a diferentes proteínas-G en cada célula blanco. Además, sobre una misma célula blanco cada hormona puede activar diferentes proteínas-G y así actuar vía diferentes segundos mensajeros como se observa en la figura I14 (Spiegel 1989, Taylor 1990).

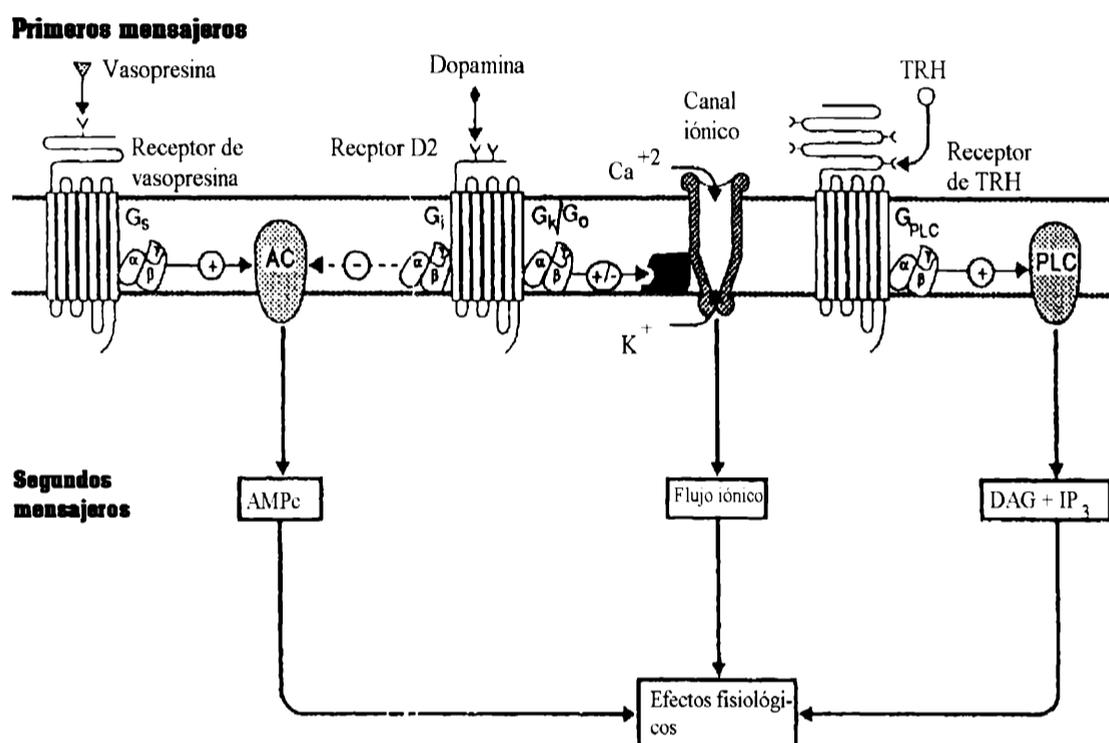


FIGURA I4: El rol de las proteínas-G en la transducción de señales a partir de la unión del ligando. Ejemplo de cómo tres diferentes primeros mensajeros pueden actuar sobre la misma célula blanco (Modificada de: Spiegel 1989).

C) Segundos mensajeros

Luego que el ligando se une a su receptor, la proteína-G específica acoplada al receptor determina que sistema de segundo mensajero será activado en la célula blanco: AMPc, GMPC, calcio, fosfoinositósidos, tirosinaquinasa y derivados del ácido araquidónico. Ejemplos de sistemas de segundo mensajeros activados se muestran en la tabla I1.

Los segundos mensajeros (fig. I5) estimulan cambios bioquímicos en la célula al activar proteínasquinasa específicas (terceros mensajeros), las cuales fosforilan proteínas específicas (llamadas fosfoproteínas) que actúan como cuartos mensajeros y regulan los cambios fisiológicos de la célula.

TABLA II: Ejemplos de segundos mensajeros activados, su primer mensajero, el blanco y actividad afectada sobre la célula blanco. El sentido de la flecha a la izquierda del AMPc indica si éste aumenta o disminuye por acción del primer mensajero.

SEGUNDO MENSAJERO	PRIMER MENSAJERO	BLANCO	ACTIVIDAD AFECTADA
↑ AMPc	Catecolaminas	Receptor β-adrenérgico del corazón	Aumento de la frecuencia cardíaca
↑ AMPc	Dopamina	Receptor D ₁ del cerebro	Actividad neuronal
↑ AMPc	TRH	Tirotrofas	Secreción de TSH
↑ AMPc	Vasopresina	Riñón	Resorción de agua
↑ AMPc	TSH	Tiroides	Secreción de T ₃ y T ₄
↑ AMPc	ACTH	Corteza adrenal	Secreción de glucocorticoides
↑ AMPc	LH	Células de Leydig Células lúteas	Secreción de testosterona Secreción de progesterona
↑ AMPc	FSH	Células de la granulosa	Secreción de estrógenos
↓ AMPc	Dopamina	Receptor D ₂ en lactotropas	↓ secreción de PRL
↓ AMPc	Somatostatina	Somatotropas	↓ secreción de GH
↓ AMPc	Acetilcolina	Receptor muscarínico del corazón	Reducción de la frecuencia cardíaca
GMPc	Angiotensina II	Corazón	Regula la contracción cardíaca
Calcio-DAG	Acetilcolina	Receptor muscarínico	Contracción del músculo liso
Calcio-DAG	TRH	Tirotropas	Secreción de TSH
Calcio-DAG	GnRH	Gonadotropas	Secreción de LH y FSH
Calcio-DAG	Angiotensina II	Corteza adrenal	Secreción de aldosterona
Tirosinquinasa	Epidermal growth factor (EGF)	Receptores de EGF	Crecimiento de fibroblastos

Un ejemplo de fosfoproteína es la sinapsina 1 que se une a las vesículas sinápticas regulando la liberación de neurotransmisores. Estas fosfoproteínas proveen un camino común a través del cual los diferentes ligandos al actuar sobre diferentes receptores y activar diferentes proteínas-G y segundos mensajeros pueden afectar la misma respuesta dentro de la célula blanco (Hemmings *et al* 1989).

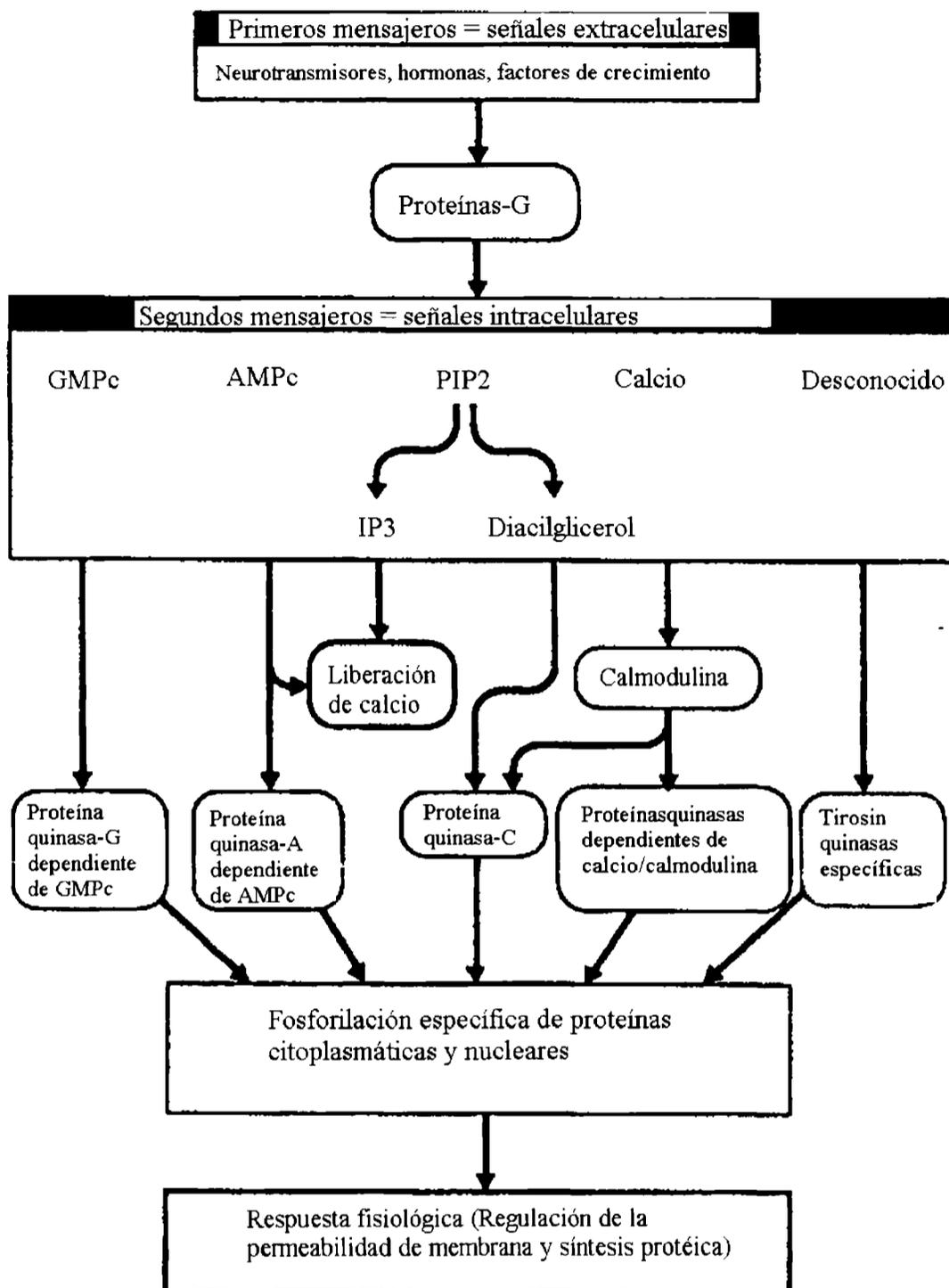


FIGURA I5: La cascada de primeros, segundos, terceros y cuartos mensajeros que al interactuar alteran la respuesta fisiológica de la célula blanco (Modificada de : Hemmings et al 1989).

1) El sistema del AMPc :

Este sistema conduce a la síntesis de AMPc como segundo mensajero. La estimulación de esta vía se produce mediante la activación de la proteína-G_s, mientras que, su inhibición se produce por estimulación de la proteína-G_i (fig. I4). La función de esta ruta se ilustra en la fig. I6 Cuando el ligando se une al receptor (1), se estimula la proteína G, (2) y se activa la adenilato ciclasa (AC) (3) la cual convierte el ATP en AMPc y pirofosfato (PP). La hidrólisis del PP en 2P proporciona la energía libre necesaria para la síntesis del AMPc. Al generarse el AMPc se producen dos series de eventos en paralelo : uno a nivel de la membrana plasmática y otro a nivel citoplasmático. La unión de AMPc a las subunidades regulatorias

(R) de las proteinquinasa A (PKA) de membrana (5a) y soluble (5b) causa la disociación de sus respectivas subunidades catalíticas (C) (6a y 6b). La subunidad C de membrana activada fosforila a partir del ATP una proteína sustrato (SP) (7a), la que abre canales iónicos permitiendo que los iones difundan dentro o fuera de la célula (8a).

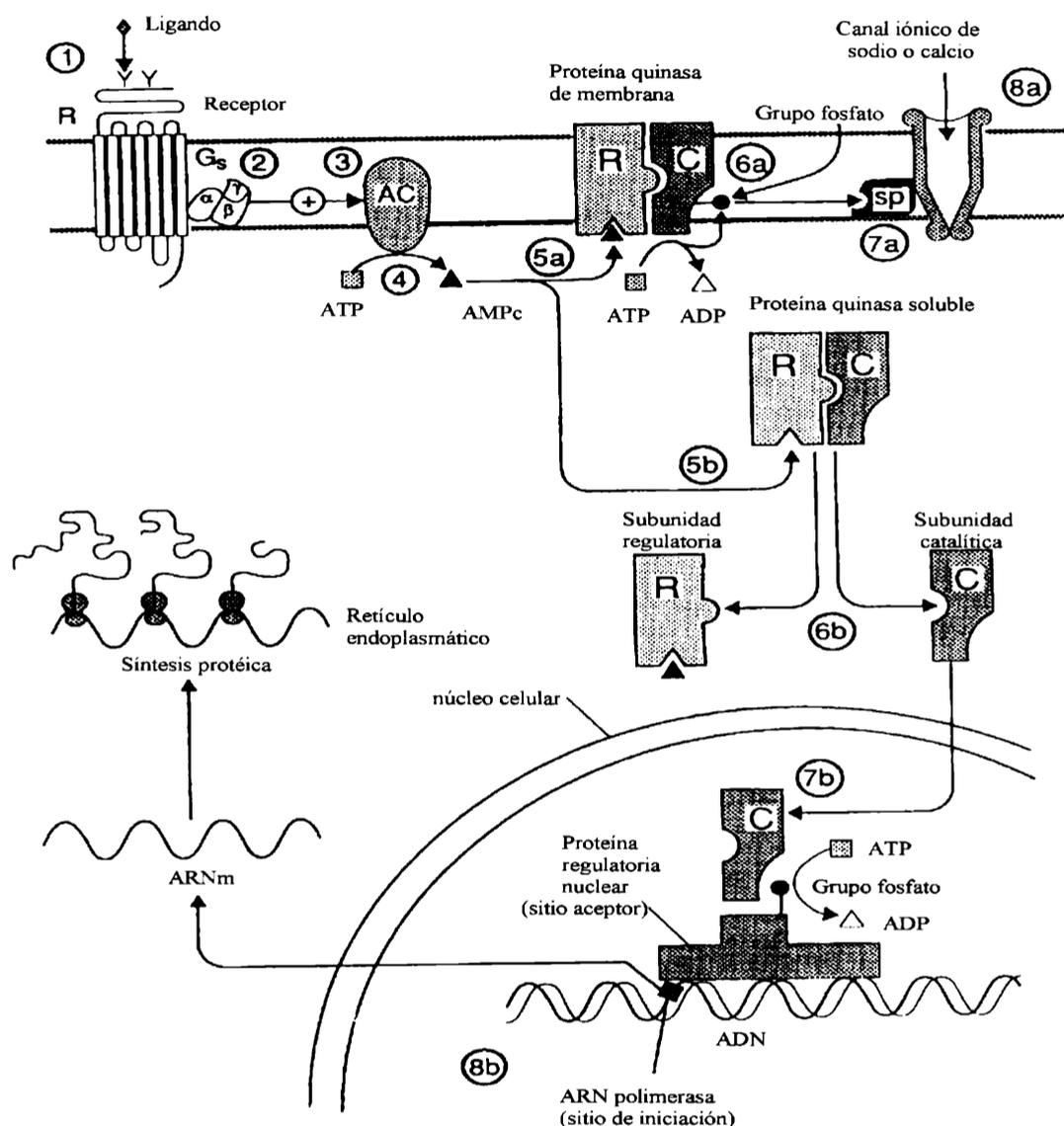


FIGURA I6: *Cascada del AMPc como segundo mensajero (Modificada de: Nathanson and Greengard 1977).*

La subunidad C soluble activada entra al núcleo donde fosforila a partir del ATP una proteína nuclear reguladora de naturaleza no histónica en su sitio aceptor (7b). La fosforilación de esta proteína altera sus propiedades de unión al DNA permitiendo la unión de la ARN polimerasa y facilitando así la síntesis proteica (hormonas, proteínas estructurales, enzimas, etc.). Además, la subunidad C de la PKA soluble fosforila una serie de enzimas y proteínas estructurales citoplasmáticas desencadenando una serie de eventos en cascada que conducen también, a la respuesta fisiológica. El AMPc también puede liberar calcio intracelular de sus reservorios. Cuando el ligando se separa del receptor, se desactiva la proteína-G y se frena la síntesis de AMPc, siendo el remanente intracelular de AMPc desactivado por las fosfodiesterasas FDE₂ y FDE₃ mientras que la fosfoproteínfosfatasa eli-

mina los grupos fosfato de las proteínas citoplásmicas y nucleares fosforiladas (Nathanson 1977, Nathanson and Greengard 1977).

Existen cuatro grupos de fosfodiesterasas, las tres primeras poseen formas citosólicas y particuladas y del último grupo sólo se conoce la forma particulada:

a) Mononucleótido cíclico fosfodiesterasa activada por calcio y calmodulina: estimula la hidrólisis de tanto AMPc como GMPc.

b) AMPc-fosfodiesterasa activada por GMPc: se activa por concentraciones μM de GMPc e hidroliza específicamente AMPc.

c) AMPc-fosfodiesterasa específica: hidroliza sólo AMPc y se divide en I) fosfodiesterasa inhibible por GMPc y II) fosfodiesterasa inhibible por Ro-20-1724.

d) GMPc-fosfodiesterasa dependiente de retinal: se estimula por el blanqueo luz dependiente de la rodopsina (Siddle and Hutton 1990).

TABLA I2 : Agentes utilizados para el estudio de la vía del AMPc (Tomada de: Siddle and Hutton 1990).

<u>SUBSTANCIA</u>	<u>CONCENTRACION USUAL</u>	<u>MECANISMOS DE ACCION RECONOCIDOS</u>
Toxina colérica (<i>V. cholerae</i>)	1 $\mu\text{g/ml}$	proteína que activa la subunidad G_s
Toxina pertúsica (<i>B. pertusis</i>)	100 mg/ml	proteína que inactiva la subunidad G_i
Forskolin	30-100 μM	diterpeno que activa la adenilato ciclasa
1,9-dideoxiforskolin	30-100 μM	control negativo del forskolin
NaF	10 mM 15-150 mM	activa la proteína G_s inhibe las fosfoproteínasas
Glicerofosfato	10 mM	inhibe las fosfoproteínasas
3-isobutil-1-metilxantina (IBMX)	1 mM	xantina que inhibe inespecíficamente pero en diferente grado todas las fosfodiesterasas
teofilina	10 mM	xantina que inhibe inespecíficamente pero en diferente grado todas las fosfodiesterasas
cafeína	10 mM	xantina que inhibe inespecíficamente pero en diferente grado todas las fosfodiesterasas
carbazeran	1 mM	xantina que inhibe inespecíficamente pero en diferente grado todas las fosfodiesterasas
ICI 118233	0,5 mM	inhibe la fosfodiesterasa AMPc-específica particulada
Ro-20-1724	2 mM	inhibe las fosfodiesterasas citosólica y particulada AMPc-específica inhibible por Ro-20-1724 y en un orden de magnitud menor la estimulada por GMPc
Amriona	1 mM	inhibe la fosfodiesterasa AMPc-específica particulada
Milriona	1 mM	inhibe las fosfodiesterasas citosólica y particulada AMPc-específica
GMPc	2 mM 5 μM	inhibe la fosfodiesterasa AMPc-específica particulada inhibible por GMPc estimula la AMPc-fosfodiesterasa activada por GMPc

Para estudiar esta vía se puede recurrir a la determinación de los niveles de AMPc mediante ensayo de union de proteína o RIA o a la utilización de métodos farmacológicos con el fin de inhibir o estimular ciertos pasos de la vía del AMPc. Algunos de los estudios farmacológicos recurren al uso de las sustancias citadas en la tabla I2 (Siddle and Hutton 1990).

II) El sistema GMPc

Este sistema posee menor distribución que el de AMPc, pero existe una alta distribución del sistema de GMPc en pulmón, corazón, intestino y músculo liso. El mecanismo de activación de este sistema es similar al de AMPc, cuando el ligando se une al receptor se acopla a una proteína-G y activa la guanilatociclasa que convierte el GTP en GMPc y PP. Luego, el GMPc activa la proteínquinasa G que fosforila proteínas de membrana, citoplasmáticas y nucleares. Alternativamente, la guanilato ciclasa puede ser parte del dominio intracelular del receptor. Al igual que en el caso del AMPc, el GMPc es desactivado por fosfodiesterasas FDE₁ y FDE₂ (Nathanson 1977).

III) El sistema fosfoinositósidos-calcio

Muchos péptidos y neurotransmisores usan este sistema que se muestra en la fig. I7. Cuando el ligando se une a su receptor se activa la proteína-G_{plc}, la cual activa la enzima fosfolipasa C (PLC) en la membrana celular. La PLC convierte el fosfatidil inositol difosfato (PIP₂) de la membrana en diacilglicerol (DAG) y en inositoltrifosfato (IP₃). El DAG actúa en la membrana celular junto con calcio para activar la proteínquinasa C (PKC), la cual activa una proteína substrato (Sp) que regula la entrada de calcio a través de sus canales. El IP₃ actúa en el citosol donde regula la salida de calcio desde sus reservorios (retículo endoplasmático liso y mitocondrias). Luego, el calcio libre se une a proteínas de unión como la calmodulina activa una PKC soluble que fosforila proteínas citosólicas y nucleares. Además, la PKC de membrana puede fosforilar el receptor alterando su afinidad por el ligando (Guy and Kirk 1988).

El inositol trifosfato, I(1,4,5)P₃ se degrada mediante un mecanismo complejo que conduce a inositol, I, como producto final como se indica en la figura I8 (Bansal *et al* 1990, Batty and Nahorski 1992, Jenkinson *et al* 1992, Batty and Nahorski 1992, Challis *et al* 1994, Jenkinson *et al* 1994, Lynch *et al* 1997).

Para el estudio de esta vía se puede administrar a las células un precursor radiactivo como por ejemplo ³H- o ¹⁴C-miinositol y separar los productos generados mediante cromatografía en capa fina, de intercambio aniónico o líquida de alta presión. También se pueden separar los fosfoinositósidos por los métodos indicados y determinar sus estructuras. Pero si sólo se desea saber si una sustancia estimula una respuesta por intermedio de esta vía se puede utilizar el LiCl. El ion Li⁺ estimula la vía del IP₃ debido a que inhibe sus vías degradativas. La acción de este catión se produce luego de un período lag (retraso) de 5 min, llega al máximo a los 20 min y se mantiene en el máximo por un espacio de 30 min luego de alcanzado el

mismo y posteriormente decae la producción de IP_3 ya que éste polifosfoinositol inhibe la degradación del PIP_2 (y en este punto se inhibiría también la vía del DAG). A una concentración de 1 mM el LiCl inhibe la 15Pasa y a una de 5-10 mM inhibe las mono, bis y 1,3,4-trisfosfatasa pero en diferentes grados. La IP_4 Pasa no es inhibida por Li^+ , pero si por Ca^{+2} o Mg^{+2} 10 mM o Mn^{+2} 1,5 mM (Bansal *et al* 1990, Siddle and Hutton 1990, Batty and Nahorski 1992, Jenkinson *et al* 1992, Batty and Nahorski 1992, Challis *et al* 1994, Jenkinson *et al* 1994, Lynch *et al* 1997).

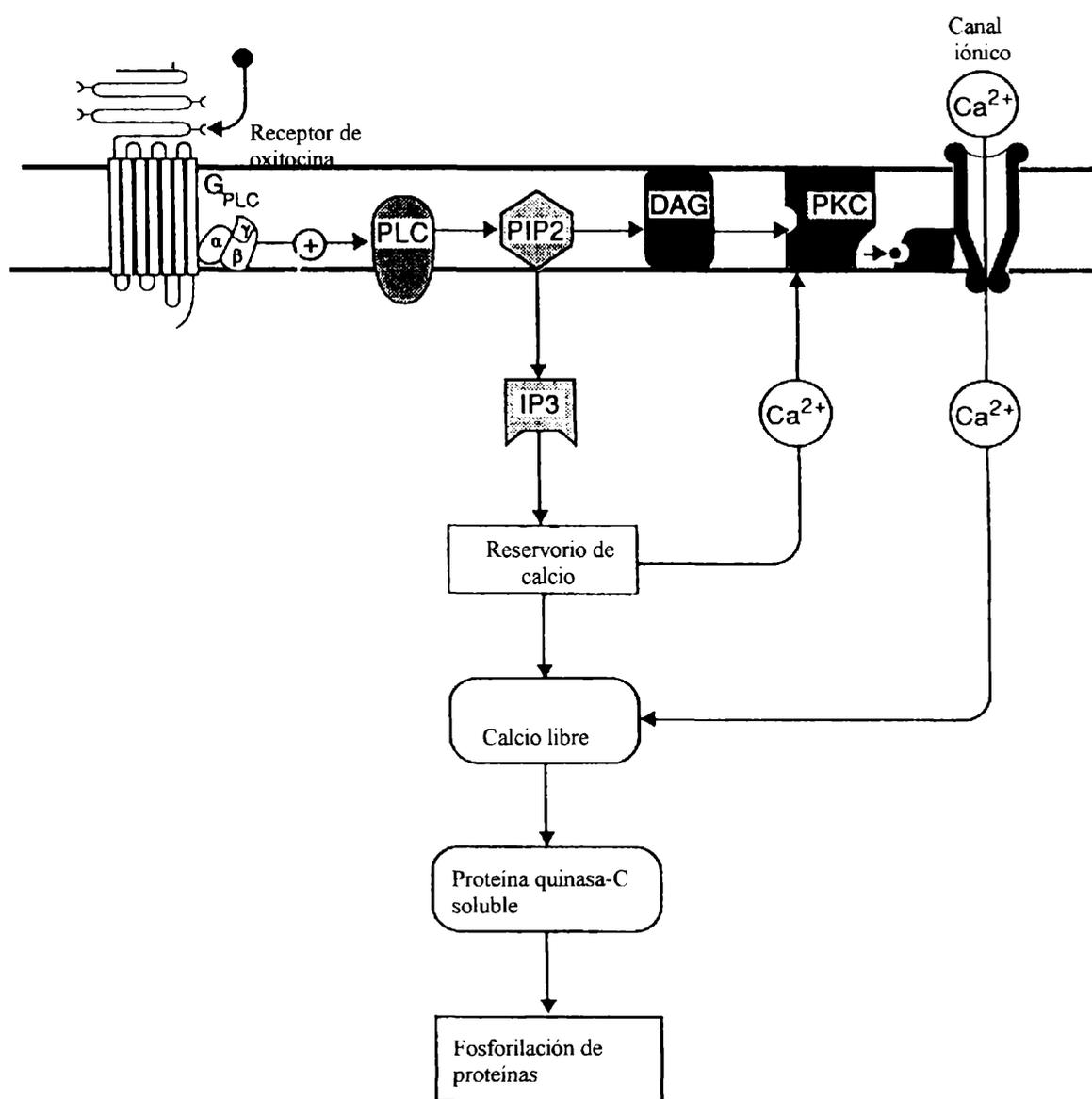


FIGURA I7: *El sistema fosfoinositósidos/calcio (Modificada de Guy and Kirk 1988).*

Para estudiar si la vía del DAG está involucrada en una respuesta fisiológica se puede administrar 3H -glicerol y separar el 3H -DAG (o su producto acetilado en posición 3 con anhídrido acético, más estable) por cromatografía líquida de alta presión y cuantificar la radiactividad. Alternativamente, se puede estudiar esta vía usando estimulantes o inhibidores de la misma. Los ésteres de forbol probablemente actúen sobre la PKC pero se conoce que poseen muchos otros efectos que inclu-

yen alteración en la actividad de las proteínas-G, el potencial de membrana, el transporte de iones a través de membrana, la actividad de fosfolipasa C, de la adenilato ciclasa, de la fosfolipasa A₂, la síntesis proteica, de ARN y de ADN, además de actuar en forma distal a la PKC modificando la actividad enzimática, la densidad de receptores y proteínas del citoesqueleto que son sustratos de la PKC. Se suele comparar el paralelismo en la acción de la hormona con la de los ésteres de forbol, si las respuestas son diferentes se puede excluir ésta vía, pero si son idénticas sólo se puede considerar cómo evidencia sugestiva de su participación ya que la respuesta observada puede lograrse por la convergencia de las rutas finales.

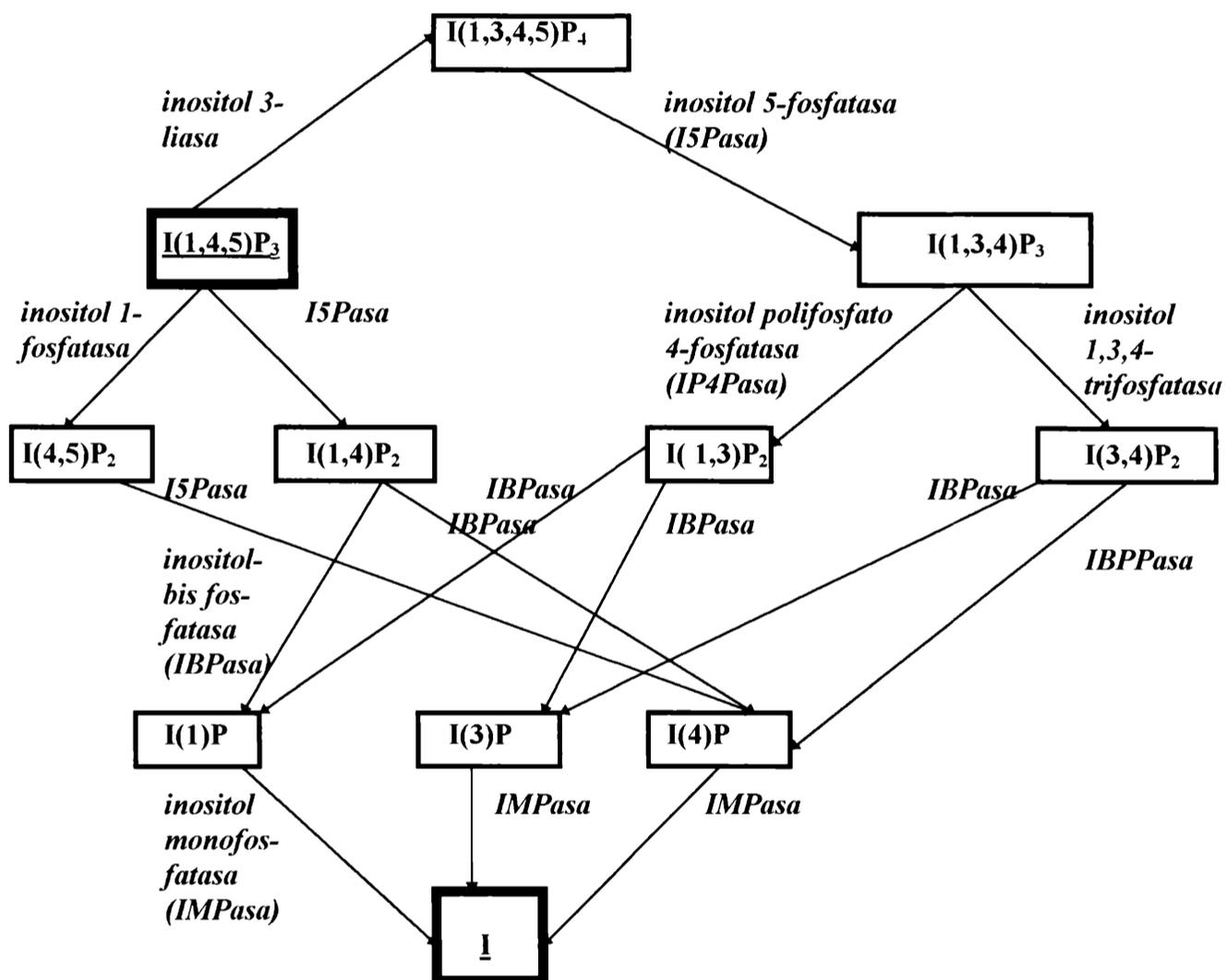


FIGURA I8 : *Mecanismos posibles de degradación del inositol trifosfato que conducen a inositol como producto final. Los productos de cada etapa se indican dentro de los recuadros mientras que las enzimas involucradas se indican en itálica (Obtenida de: Bansal et al 1990, Batty and Nahorski 1992, Jenkinson et al 1992, Batty and Nahorski 1992, Challis et al 1994, Jenkinson et al 1994, Lynch et al 1997).*

Los inhibidores de la PKC se indican en la tabla I3, se utilizan para estudiar ésta vía pero tampoco son específicos ya que sus efectos se determinaron por medio de ensayos *in vitro*, lo cuál no significa que se comporten de la misma manera *in vivo*. Por ejemplo, uno de ellos, la trifluoropreazina (TFP) a concentraciones entre 10 y 20 mM inhibe la PKC, pero a concentraciones superiores a los 30 mM también inhibe la PKA dependiente de AMPc y además posee un efecto inhibitorio

sobre la calmodulina en un rango de concentración que se superpone al de la PKC. Por esta razón la falta de inhibición de la TFP puede indicar la no participación de ésta vía, pero la inhibición sólo la sugiere (Siddle and Hutton 1990).

TABLA I3 : Algunos inhibidores de la PKC (Siddle and Hutton 1990).

<u>INHIBIDORES</u>		
Trifluoroperazina	Polimixina B	Sangivamicinasta
Amiloride	Gosipol	Staurosporina
Retinal	Esfingosina	Tetracaina
Mellitina	Esfingonina	H-7

IV) El calcio cómo segundo mensajero

El calcio es necesario para la acción de AMPc, DAG y otros segundos mensajeros y puede funcionar él mismo cómo segundo mensajero. En la mayor parte de las funciones mediadas por AMPc se requiere calcio. El calcio unido a calmodulina se necesita para activar la adenilato ciclasa luego de la estimulación de la corteza adrenal por ACTH y en otros casos como el de la estimulación de la médula adrenal por Ach facilita la activación de la adenilato ciclasa. El calcio frecuentemente se requiere para activar la PKA, pero además, éste activa sus específicas proteínquinas cómo por ejemplo la proteínquina dependiente de calcio-calmodulina.

El calcio se almacena dentro de la célula y es bombeado fuera por una bomba de calcio ya que los niveles de calcio libre son menores dentro que fuera de la célula. El nivel de calcio libre se regula mediante dos mecanismos : abriendo canales que permiten su entrada del medio extracelular o liberándolo desde sus depósitos intracelulares. El nivel de calcio libre citosólico varía según el tipo celular pero en general es de alrededor de 0,1 μM en reposo y de 1-5 μM en la célula activada, concentraciones mayores de éste catión pueden dañar las proteínas y organoides. Un aumento del calcio libre es siempre de corta duración ya que es rápidamente bombeado al exterior de la célula o a sus reservorios intracelulares (Rasmussen 1989, Siddle and Hutton 1990).

Las estrategias para el estudio del calcio cómo segundo mensajero abarcan:

- a) Medida directa del calcio libre celular.
- b) Medida del flujo de calcio a través de la membrana plasmática u organoides, su liberación al citosol y determinación de canales sensitivos de voltaje o entrada mediada por receptores activados por segundos mensajeros cómo por ejemplo IP_3 .
- c) Modificaciones farmacológicas.

Los métodos más usados se basan en:

1) Detección de calcio

- a) Mediante proteínas activadas por calcio (aequorina, obelina, etc.).
- b) Mediante el uso de indicadores, los cuales pueden ser de tres tipos: I) espectrofotométricos (murexida, antipiril azo III, arsenoazo III, etc.), II) fluorescentes (quin-2, fura-2, indo-1, etc.) o III) resonancia magnética nuclear para ^{19}F (FBAPTA).
- c) Microelectrodos sensitivos para el calcio.

2) Flujo o influjo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$.

- 3) Uso de agentes para manipular la concentración de calcio, algunos de los cuáles se indican en la tabla I4 junto con su rango de concentración útil.

TABLA I4: Algunos agentes útiles para manipular el Ca^{+2} citoplasmático.

<u>ACCION</u>	<u>AGENTE</u>	<u>RANGO DE CONCENTRACION</u>
<u>IONOFOROS</u>		
	Ionicina	1-5 μM
	A23187	1-10 μM
	Br-A23187	1-10 μM
<u>QUELANTES</u>		
	EGTA *	1-10 mM
	BAPTA-AM	1-10 μM
	Metil-BAPTA-AM	1-10 μM
<u>BLOQUEADORES DE LOS CANALES DE CALCIO</u>		
	Ni^{+2}	mM
	Co^{+2}	mM
	D600	10-100 nM
	Nifedipina	10-100 nM
	Verapamil	μM
	Cromoglicato	1-10 μM
<u>OTROS AGENTES CON ACCION DIRECTA A LA MENCIONADA</u>		
	TMB-8	10-100 μM
	Nitr 5-AM	μM
	BAYK 8644	1-100 μM
	Dantrolenato sódico	10-100 μM

* el ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetileter)tetraacético (EGTA) no puede reemplazarse por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ya que el último es poco selectivo y quela tanto el calcio como el magnesio (Hutton and Siddle 1990, Siddle and Hutton 1990).

V) Tirosinquinasa como segundo mensajero

Cómo se mencionó anteriormente la actividad tirosinquinasa se encuentra en el dominio β del receptor con actividad enzimática.

VI) Derivados del ácido araquidónico como segundos mensajeros

Las prostaglandinas se producen a partir del ácido araquidónico en la membrana celular y estimulan la producción de AMPc o GMPc (Hadley 1992).

Cada uno de los segundos mensajeros pueden actuar simultáneamente en la misma célula blanco, como en el caso de la fig. I9 en que CRH y vasopresina actúan a través de diferentes segundos mensajeros sobre la corticotropa para regular la síntesis y liberación de ACTH.

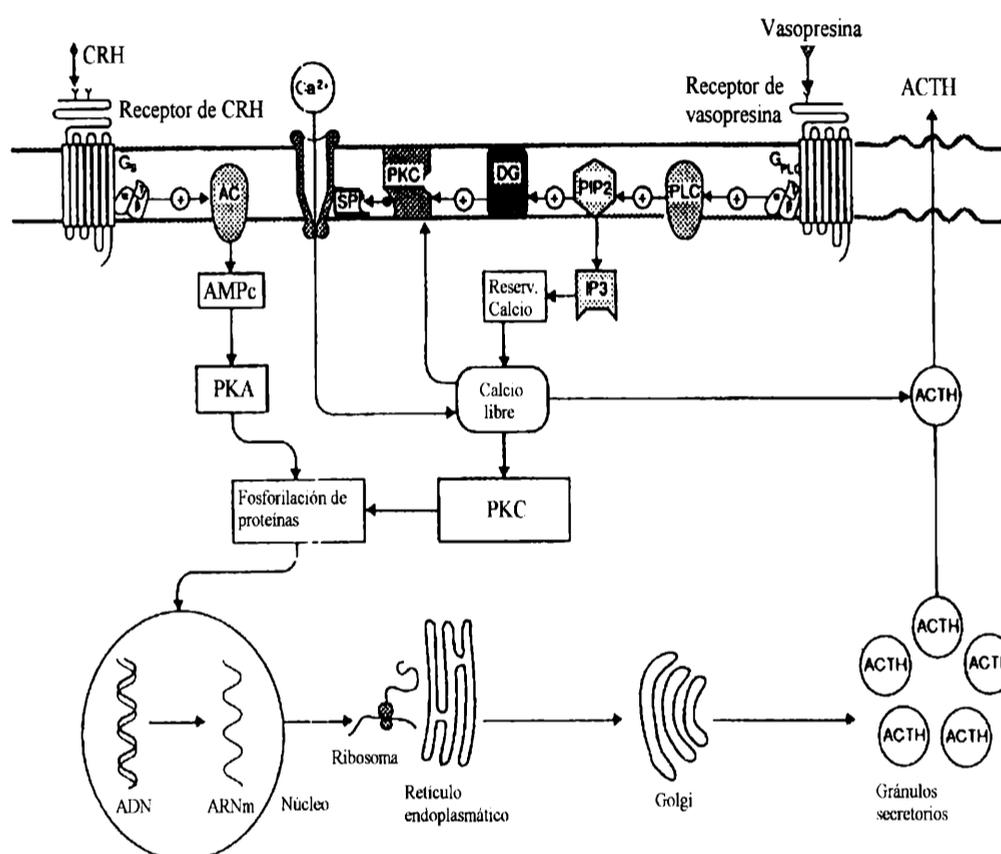


FIGURA I9: Interacción entre CRH y vasopresina para regular la síntesis y liberación de ACTH (Modificado de : King and Baertschi 1990).

5) LAS GLANDULAS ENDOCRINAS Y SUS HORMONAS:

En la tabla I5 se indican las glándulas endocrinas del organismo, sus principales hormonas (no todas) y la función primaria de cada una de ellas. Su localización anatómica se indica en la fig. I10.

TABLA I5: Las principales hormonas del organismo y sus funciones primarias.

GLANDULA	HORMONA	FUNCION PRIMARIA
PINEAL	Melatonina	Modula la actividad gonadal ; media la respuesta a la luz
ADENOHIPOFISIS	Se verán en el próximo capítulo	
NEUROHIPOFISIS	Oxitocina Vasopresina	Estimula la contracción uterina y eyección de leche Eleva la presión sanguínea y promueve la absorción renal de agua
TIROIDES	Tiroxina y triiodotironina Calcitonina	Regulan el crecimiento celular , la diferenciación, y la actividad metabólica Disminuye el Ca plasmático
PARATIROIDES	Hormona paratiróidea	Eleva el Ca plasmático
TIMO	Se verán en el capítulo 3	
CORAZON	Factor atrial natriurético	Regula la presión, volumen y balance electrolítico de la sangre.
ESTOMAGO	Gastrina	Estimula la secreción de HCl y la motilidad intestinal
DUODENO	Secretina Colecistoquinina	Estimula la secreción de jugo pancreático Estimula la secreción de enzimas pancreáticas y la contracción de la vesícula biliar
PANCREAS (Islotes de Langerhans)	Insulina Glucagon	Disminuye la glucemia y promueve la síntesis de lípidos y proteínas Incrementa la glucemia y la degradación de lípidos y proteínas
CORTEZA ADRENAL	Glucocorticoides Mineralocorticoides	Anabólica, anti-inflamatoria, inmunosupresora Incrementa la retención de Na y pérdida renal de K
MEDULA ADRENAL	Adrenalina Noradrenalina	Incrementa el ritmo cardíaco el consumo de oxígeno y movilización de glucógeno Vasoconstricción, incremento de la presión sanguínea
TESTICULOS Células de Leydig Células de Sertoli	Testosterona Inhibina	Androgenizante, anabólica Inhibe la secreción hipofisaria de FSH
OVARIOS Foliculos Cuerpo lúteo	Estrógenos Progesterona Inhibina	Estrogenizante, anabólica Facilita el desarrollo uterino y mamario y mantiene el embarazo Inhibe la secreción hipofisaria de FSH
PLACENTA	Gonadotrofina coriónica humana Lactógeno placentario humano Progesterona	Mantiene la síntesis ovárica de progesterona Estimula el crecimiento mamario y desarrollo mantiene el embarazo

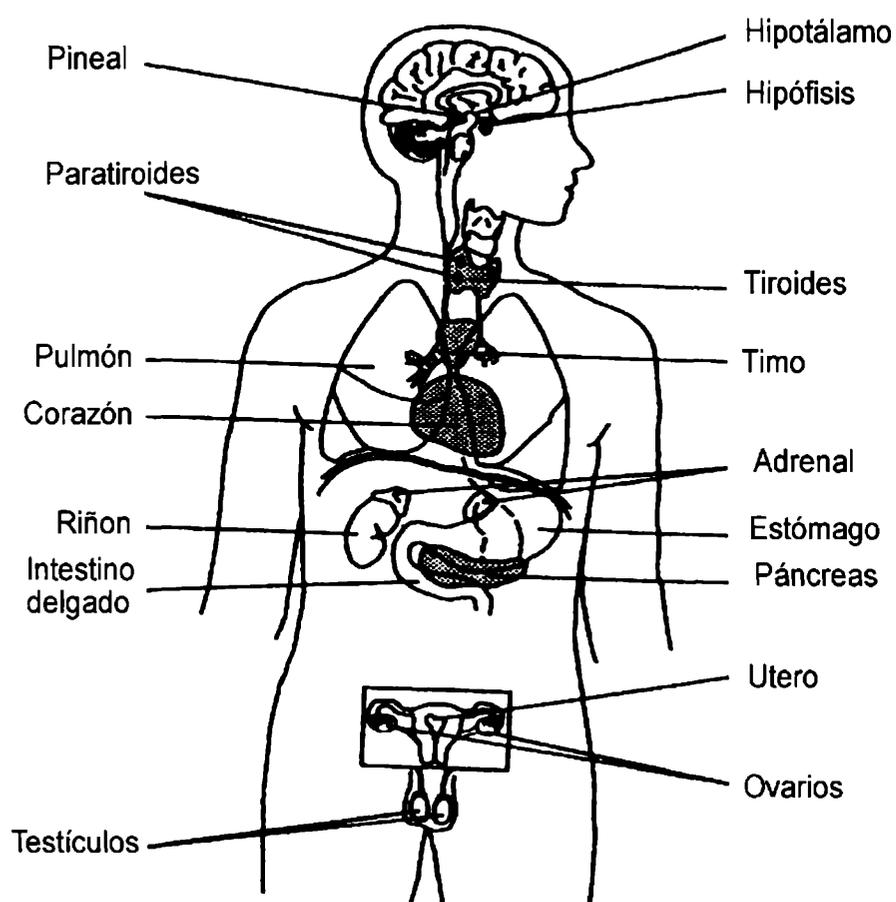


FIGURA I10: *Las principales glándulas endocrinas del organismo.*

CAPITULO 2: LA ADENOHIPOFISIS Y SUS HORMONAS. CONTROL HIPOTALAMICO DE LA SECRECION ADENOHIPOFISARIA-FACTORES HIPOFISOTROPOS.

1) ESTRUCTURA MACROSCOPICA, ORIGEN EMBRIOLOGICO, DIVISIONES Y SUBDIVISIONES DE LA HIPOFISIS Y RELACIONES:

La hipófisis es una glándula endocrina situada en la base del cerebro. Es un órgano relativamente pequeño, que en el ser humano mide 1,3 cm de diámetro aproximadamente y pesa entre 600 y 1000 mg en un adulto, obteniéndose los mayores pesos en las mujeres. En la rata su diámetro es de unos 3 mm y su peso es aproximadamente de 10 mg en la rata joven dependiendo de la cepa y sexo. Su importancia es capital ya que mantiene relaciones mutuas con otras glándulas endocrinas. También posee relaciones neurales y vasculares con el cerebro, al que se halla unido por un delgado tallo (Halmi and Moriarty 1982).

La hipófisis se divide en 2 partes principales, de acuerdo a su origen embriológico: la adenohipófisis y la neurohipófisis. Esta glándula posee un doble origen embriológico. El ectodermo genera una evaginación a nivel de la futura cavidad bucal, que se dirige hacia atrás y arriba, la bolsa de Rathke, que originará la adenohipófisis. Mientras que, la neurohipófisis se origina a partir de una evaginación del piso, el infundíbulo, diencéfalo. Ambos esbozos entran en contacto entre sí; el pedículo que une el lóbulo neural con el cerebro persiste en el adulto como tallo pero la unión de la bolsa de Rathke con el techo de la cavidad bucal desaparece muy temprano durante la vida embrionaria. De la bolsa de Rathke se originan 3 porciones: 1) la pared rostral de la bolsa aumenta de espesor para formar la pars distalis, 2) la pared caudal forma una capa de células que se fusiona con la evaginación neural y se conoce como pars intermedia, y 3) en las porciones dorsolaterales de la bolsa, se forman 2 prolongaciones que rodean el tallo infundibular formando un collar de tejido llamado pars tuberalis (Turner and Bagnara 1971).

Por lo mencionado anteriormente, a la adenohipófisis se la subdivide en: pars distalis, pars tuberalis y pars intermedia. A la neurohipófisis se la subdivide en: proceso infundibular o pars nervosa y tallo neural o infundíbulo; al infundíbulo a su vez se lo subdivide en tallo infundibular y en eminencia media. El tallo infundibular une la pars nervosa a la eminencia media. La eminencia media se encuentra entre el tallo infundibular y el encéfalo y contiene el receso infundibular del tercer ventrículo. La pars distalis y la pars tuberalis constituyen el lóbulo anterior de la hipófisis, la pars intermedia y la pars nervosa constituyen el lóbulo poste-

rior de la hipófisis y el infundíbulo forma el tallo de la hipófisis. La fig. I11 representa la estructura típica de la hipófisis de un mamífero en forma simplificada así como el hipotálamo y sus núcleos.

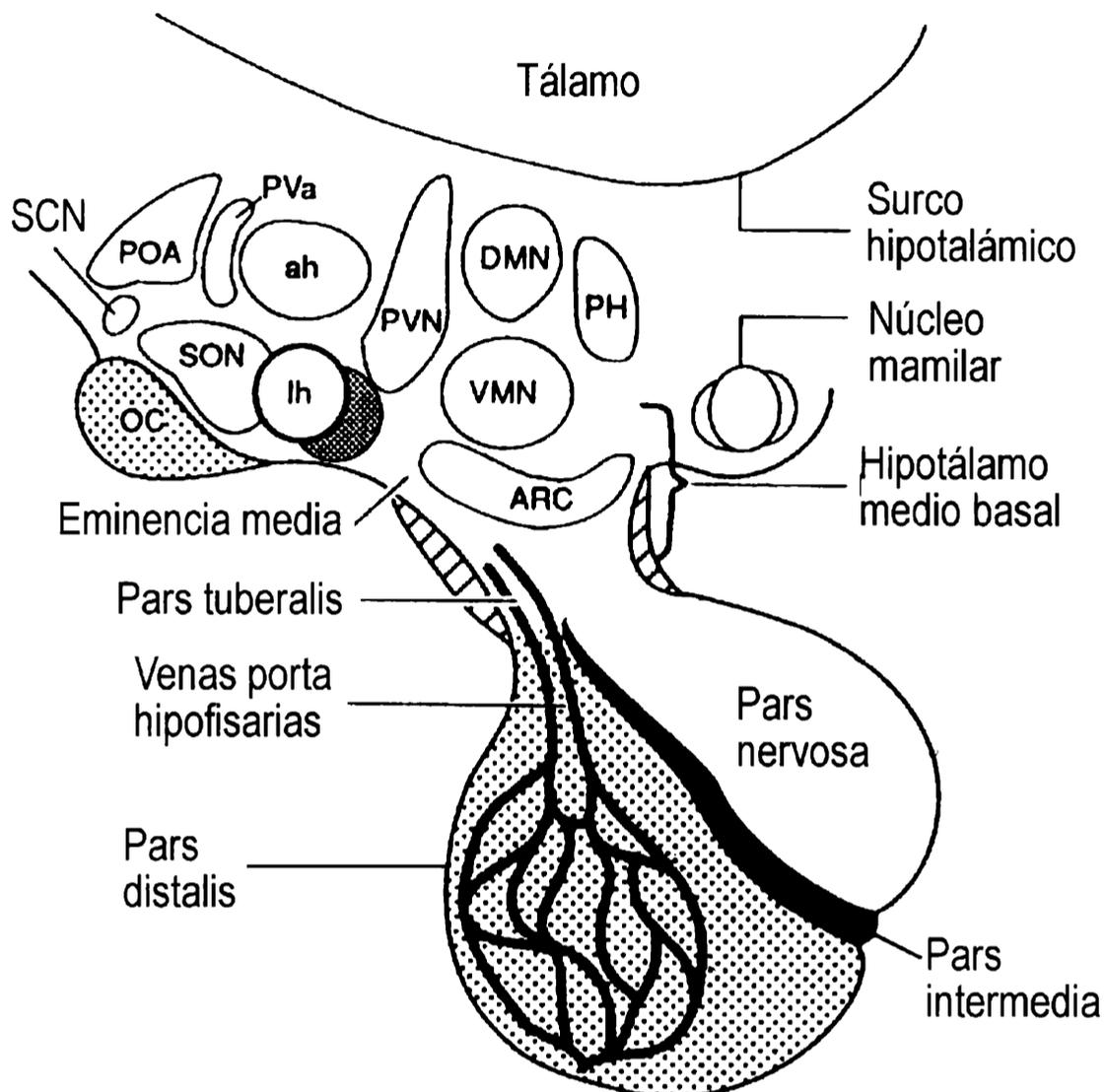


FIGURA I11: La glándula hipófisis y el hipotálamo. Referencias : OC = quiasma óptico, ah = hipotálamo anterior, ARC = núcleo arcuato, DMN = núcleo dorsomedial, lh = hipotálamo lateral, PH = hipotálamo posterior, POA = área preóptica, Pva = núcleo periventricular anterior, PVN = núcleo paraventricular, SCN = núcleo supraquiasmático, SON = núcleo supraóptico, VMN = núcleo ventromedial. (Modificada de Martin 1985).

La hipófisis descansa en una depresión del esfenoides llamada silla turca. La duramadre del cerebro se extiende recubriendo a la hipófisis formando el diafragma de la silla que se fusiona con el periostio del esfenoides. El diafragma de la silla turca constituye una barrera entre la silla turca y la cavidad intracraneal, presentando un orificio que es atravesado por el tallo hipofisario. Parte del piaracnoides puede pasar a través de la abertura y ocupar el espacio entre el diafragma y la cápsula de tejido conjuntivo de la glándula. En otras partes una capa de colágeno separa la cápsula de la glándula del periostio del esfenoides.

2) IRRIGACION E INERVACION DE LA HIPOFISIS

La hipófisis está irrigada por vasos conectados entre dos lechos capilares, uno en la zona externa de la eminencia media y otro en la adenohipófisis, denominado sistema porta-hipofisario. En este sistema el sentido de circulación es descendente, es decir desde el hipotálamo hacia la adenohipófisis y se da en una enorme variedad de especies de vertebrados. Esta disposición y sentido de flujo permiten que las neurohormonas liberadas por el hipotálamo actúen sobre la adenohipófisis (control neurohumoral del lóbulo anterior). Las arterias hipofisarias superiores, que se originan en las carótidas internas o en las arterias comunicantes anteriores del polígono de Willis, convergen a la altura de la eminencia media y se capilarizan constituyendo el plexo capilar primario del sistema porta-hipofisario. Estos capilares vuelven a unirse formando los vasos porta largos que atraviesan el tallo hipofisario y vuelven a capilarizarse en la pars distalis constituyendo el plexo capilar secundario del sistema porta-hipofisario. Otra arteria, la arteria loral que se origina en las arterias hipofisarias superiores, irriga las porciones posteriores de la adenohipófisis (Green and Harris 1947, Green 1966).

La neurohipófisis está irrigada por las arterias hipofisarias inferiores las cuales se capilarizan constituyendo los vasos porta cortos y sobre estos capilares terminan los axones del sistema supraóptico-paraventrículo-neurohipofisario. Las arterias de la trabécula, que se originan en las arterias hipofisarias superiores, atraviesan la adenohipófisis sin capilarizarse y convergen también a los vasos porta cortos. Existen anastomosis entre los capilares de la pars nervosa y los del lóbulo anterior, pero no son abundantes.

Tanto el drenaje venoso de la pars distalis como el de la pars nervosa se realiza por medio de las venas hipofisarias que terminan en los senos cavernosos.

Sólo se encontraron fibras nerviosas en la pars tuberalis pero no en la pars distalis, excepto en algunos peces. En cambio, la pars intermedia está inervada en casi todas las especies estudiadas con fibras peptidérgicas y aminérgicas (Green 1966, Enemar 1967).

La mayor peculiaridad de la pars nervosa es el gran número de axones secretorios que terminan en ella; los cuerpos neuronales correspondientes a esos axones se localizan en los núcleos hipotalámicos. Algunos de los axones de esos núcleos terminan en la eminencia media y en la pars intermedia, pero es dudoso que alguno de ellos penetre en la pars distalis (Green 1947).

3) POBLACIONES CELULARES ADENOHIPOFISARIAS: ESTRUCTURA, ULTRAESTRUCTURA Y LOCALIZACION

Las células de la adenohipófisis poseen las características citológicas asociadas a su función: la síntesis de proteínas o polipéptidos. Los rasgos característicos son: en el núcleo, presencia de un nucleolo prominente. A nivel citoplasmático, predominio de los organoides implicados en la síntesis de proteínas o polipéptidos de exportación, esto es del retículo endoplasmático rugoso (RER) y de los complejos de Golgi, así como también por la presencia de gránulos de secreción. El péptido o proteína inicia su síntesis en los ribosomas citosólicos, pero la señal proveniente del péptido señal detiene la síntesis proteica por interacción entre el ribosoma, el péptido señal y proteínas de reconocimiento de señal (SRP), lo que conduce a que el ribosoma se una al RER y se reactive la síntesis. El péptido señal posee una secuencia de aminoácidos hidrofóbica que permiten que el péptido sea transportado al lumen del RER, en donde el péptido señal es clivado por una peptidasa señal, pudiendo ocurrir posteriormente una N- y/o O- glicosilación. Luego el péptido es transportado hacia el complejo de Golgi, donde el producto es modificado, condensado y posteriormente empaquetado en vesículas rodeadas por membranas, constituyendo los gránulos secretorios que pueden resultar ulteriormente modificados en la red transgolgi. Estos gránulos se acumulan dentro de la célula hasta que son eliminados hacia los capilares. En condiciones basales el material secretorio liberado pierde su estado de agregación y no se observan productos secretorios en el espacio perivascular. Pero si la liberación es masiva, por ejemplo luego de la inyección de factores liberadores el producto se acumula en el espacio perivascular en forma condensada. Los lisosomas (LIS) participan en la regulación de la secreción de la pars distalis, degradando los gránulos secretorios citoplasmáticos. Este fenómeno se observó en las células de ratas hembras estimuladas por succión mamaria de las crías cuyos niveles séricos de prolactina eran elevados, pero caían con rapidez al retirar las crías de la madre y fue en ese momento cuando se observó reactivación lisosomal (Smith 1966).

A) Pars distalis

Desde el momento en que se encontró que la pars distalis producía al menos seis hormonas con acción diferente, se planteó el problema de saber si cada hormona era producida por un tipo celular diferente. Este problema fue abordado por diferentes técnicas, que culminaron con la inmunohistoquímica óptica y electrónica que permitieron identificar cada célula desde un punto de vista funcional, concluyendo que cada hormona es secretada en la pars distalis por un tipo celular definido, teoría de “una hormona una célula”. Así, desde este punto de vista se ha clasi-

ficado a las poblaciones celulares según la hormona segregada (figs. I12 e I13) (clasificación funcional) en:

- I) Células somatotropas: son aquellas que producen somatotrofina (GH).
- II) Células prolactotropas, prolactínicas o mamotropas: son aquellas que producen prolactina (PRL).
- III) Células córticotropas: son aquellas que producen adrenocorticotrofina (ACTH).
- IV) Células foliculoestimulantes son aquellas que producen hormona foliculoestimulante (FSH).
- V) Células luteinizantes son aquellas que producen hormona luteinizante (LH).
- VI) Células tirotropas son aquellas que producen tirotofina (TSH).
- VII) Células cromóforas: son aquellas que no producen las hormonas mencionadas y entonces no pueden ser inmunomarcadas con anticuerpos contra los tipos celulares mencionados arriba.

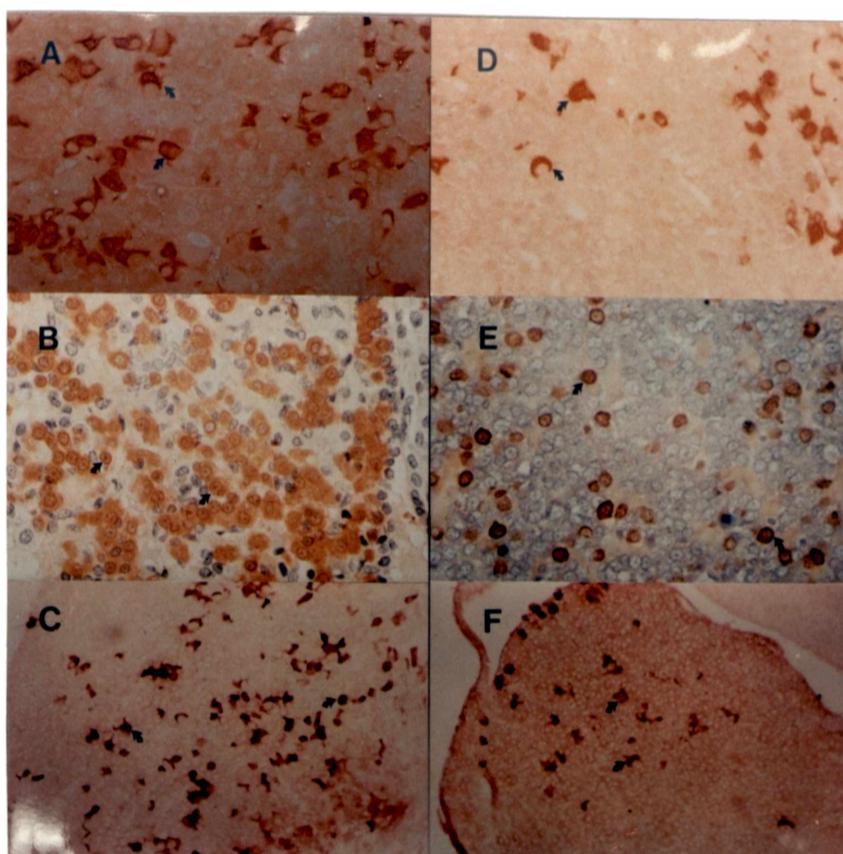


FIGURA I12: Morfología observada con inmunohistoquímica en ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de las poblaciones corticotropas (A: jóvenes, D: senescentes), somatotropas (B: jóvenes, E: senescentes) y tirotropas (C: jóvenes, F: senescentes) tomadas a un grado de magnificación de 400X. El sistema inmunohistoquímico usado utilizó un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa y se reveló con H_2O_2 -diaminobencidina. Tanto B como E recibieron como colorante de contraste hematoxilina. Las flechas señalan células típicas. (Gentileza de la Dra. Gloria Cónsole, Cátedra de Histología "B", Facultad de Ciencias Médicas, UNLP).

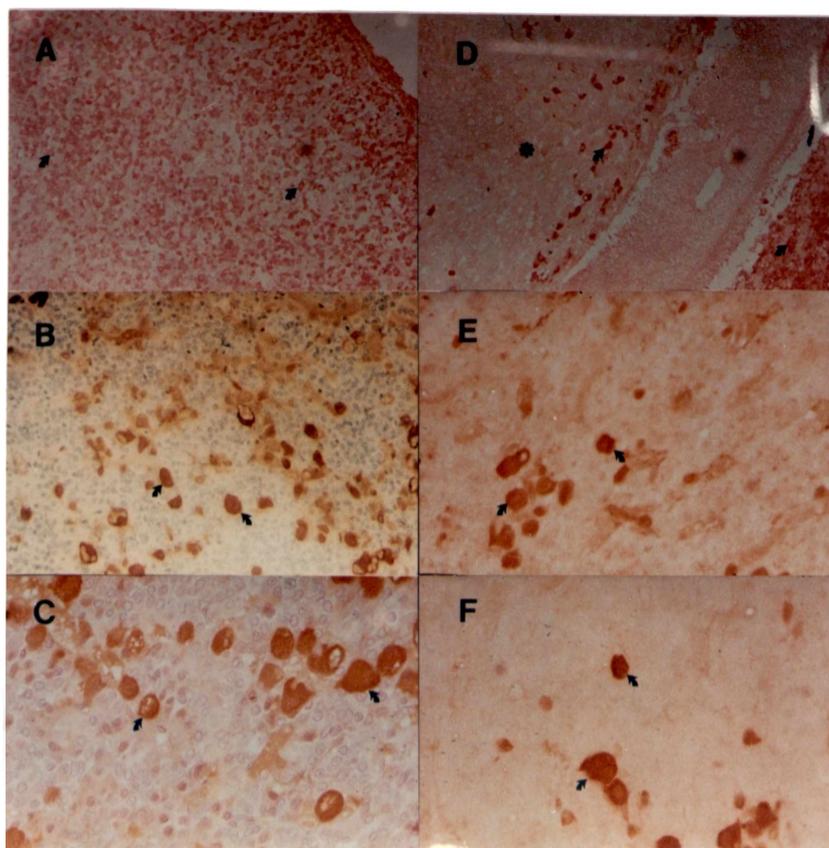


FIGURA I13: *Morfología observada con inmunohistoquímica en ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de las poblaciones lactotropas (A: jóvenes, D: senescentes), folículotropas (B: jóvenes, E: senescentes) y luteotropas (C: jóvenes, F: senescentes) tomadas a un grado de magnificación de 400X excepto A y D que se muestra a 200X. El sistema inmunohistoquímico usado utilizó un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa y se reveló con H₂O₂-diaminobencidina. Tanto B como C recibieron como colorante de contraste hematoxilina. Las flechas señalan células típicas, el asterisco en D muestra una zona con adenoma prolactotrófico. (Gentileza de la Dra. Gloria Cónsole, Cátedra de Histología “B”, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP).*

Sin embargo, recientes hallazgos muestran colocalización de Prl y de GH y por eso se las llamó mamosomatotrofas y podrían representar una forma transicional bidireccional entre somatotropas y prolactotropas, probablemente un progenitor celular común a estos dos tipos celulares (Nikitovitch-Winer *et al* 1987, Takahashi 1992).

Las poblaciones celulares de la adenohipófisis no son estáticas sino dinámicas. Bajo condiciones normales la adenohipófisis mantiene una renovación continua de células a volumen constante excepto durante el crecimiento, donde la actividad proliferativa adenohipofisaria decrece con la edad del animal hasta los tres meses de edad. Existen diferencias proliferativas en relación al sexo, siendo la hembra la que tiene el mayor grado de renovación. En las hembras esa actividad proliferativa también depende de la etapa del ciclo reproductivo en que se encuen-

tran siendo menor en el diestro y máximo en el estro (Nouët and Kujas 1975, Shirasawa and Yoshimura 1982, Sakuma *et al* 1984, Carbajo-Pérez and Watanabe 1990, Oishi *et al* 1993).

Células somatotropas (fig I12 B y E):

Constituyen una población celular distribuida de modo bastante homogéneo aunque con mayor densidad en las regiones laterales. Su proporción depende de la edad y sexo: 22,7 y 20,3 % para machos y hembras de 3 meses en la cepa Jc1: Sprague-Dawley, respectivamente; 68,3, 59,7, y 40,5 % para machos de 6, 12 y 18 meses y de la cepa Wistar/Tw y 40,6, 34,8 y 23,4 % para hembras de las mismas edades y cepa (Nakane 1970, Takahashi *et al* 1990, Oichi *et al* 1993).

Las células somatotropas son ovoideas, de 12 a 16 μm , con núcleos ovoides algo excéntricos eucromáticos y uno o dos nucleólos.

Con microscopía inmunoelectrónica se ha clasificado a las células en tres subgrupos en base a sus gránulos secretorios. Las somatotropas de tipo I contienen grandes gránulos secretorios (250 a 350 nm), las de tipo III contienen pequeños gránulos secretorios (100 a 150 nm) y las de tipo II contienen ambos tipos de gránulos. En las de tipo I y II su forma es poligonal u oval con núcleo oval o esférico, el RER y el aparato de golgi se hallan medianamente desarrollados, ocasionalmente se ven LIS, existen numerosos gránulos secretorios pero algunas veces aparecen degranuladas. Las de tipo III son menores que los otros dos grupos, tienen forma oval o a veces irregular con pequeños procesos, el núcleo es oval, el RER no es prominente pero está vesiculado. Tanto en machos como en hembras predominan las de tipo I, le siguen las de tipo II y finalmente las de tipo III. Para cada tipo celular existe una variación de los porcentajes que está asociada a la edad. En los tres grupos, las mitocondrias son abundantes, alargadas o esféricas, también se observan centriolos, microtúbulos y algunas cilias (Kurosumi *et al* 1986).

En las hembras la mayor actividad proliferativa (20,3 % de las somatotrofas se hallan en mitosis) se da en el metestro y la menor en el estro (10,0 %) en ratas de 3 meses, mientras que en los machos permanece constante (9,4 %) a la misma edad.

Células lactotropas (fig. I13 A y D):

Es una población distribuida de un modo difuso pero con predominio en las porciones laterales cercanas al lóbulo intermedio. Su proporción depende de la edad y el sexo: 49,8 y 52,4 % para machos y hembras, respectivamente, de 3 meses de la cepa Jc1: Sprague-Dawley y 15,5, 22,1, y 18,9 % para machos de 6, 12 y 18

meses de la cepa Wistar/Tw y 34,0, 48,7 y 52,1 % para hembras de las mismas edades y cepa (Nakane 1970, Takahashi and Kawashima 1990, Oichi *et al* 1993).

El tamaño difiere entre machos y hembras y la forma es heterogénea, el diámetro promedio es de unos 13 μm , pueden ser poligonales, elongadas y frecuentemente con forma de copa rodeadas por grandes células gonadotrofas (Sato 1980).

La ultraestructura de las prolactotrofas ha sido extensamente estudiada, encontrándose tres subtipos de células los cuales fueron clasificados según el diámetro de sus gránulos secretorios. Las de tipo I poseen gránulos de forma irregular de 300 a 700 nm, las de tipo II poseen gránulos esféricos de 150 a 250 nm y las de tipo III poseen gránulos esféricos de menos de 100 nm. Las de tipo I son poligonales y a veces irregulares con procesos finos, el núcleo es excéntrico, los gránulos se observan sobre la perifería de la célula y puede observarse exocitosis de los gránulos secretorios, el aparato de Golgi y el RER están bien desarrollados y las cisternas del RER se ordenan en láminas paralelas. Las de tipo II son elongadas, ovales o poligonales, el número de gránulos es el mayor de los tres tipos, el aparato de Golgi y el RER están moderadamente desarrollados. Las de tipo III son ovales o irregulares, el tamaño es el menor de los tres tipos, el RER está pobremente desarrollado y el aparato de Golgi se observa muy raramente. Las de tipo I se consideran las células más maduras, las de tipo III las más inmaduras y las de tipo II intermedias. El cambio en el tamaño y forma de los gránulos secretorios se explica por la fusión y degradación lisosomal de los gránulos secretorios preexistentes. Los porcentajes de cada tipo dependen del sexo y la edad del animal. En los tres grupos, las mitocondrias presentan crestas espaciadas y matriz densa, se observan los centriolos y microtúbulos (Farquar *et al* 1978, Nogami 1984, Takahashi and Miyatake 1991).

La máxima actividad proliferativa de las prolactotropas en hembras se observa en el estro (63,7 %) y la menor en el diestro (37,9), siendo constante en los machos (27,4 %) de 3 meses de edad. Estas células aumentan en número y tamaño durante la preñez y la lactancia.

Células corticotropas (fig. 112 A y D):

Las células corticotropas predominan en la región dorsal, encontrándose en menor grado en otras zonas. Su proporción depende de la edad y el sexo: 2,9 y 2,5 % para machos y hembras (excepto en estro, en que la proporción se acerca a la de los machos) de 3 meses de la cepa Jc1: Sprague-Dawley respectivamente. Su número aumenta durante el estrés crónico. (Oichi *et al* 1993).

Las corticotropas son globulares con contornos irregulares y de unos 13 μm de diámetro, con núcleos ligeramente excéntricos y un nucleólo pequeño. Al microscopio electrónico se observan gránulos de 150 a 250 nm, con un centro denso a los electrones. El RER está regularmente desarrollado, el complejo de Golgi se ha-

lla también muy desarrollado, pudiéndose además observar algunos LIS. Las mitocondrias son esféricas o alargadas, pueden verse también microtubulos.

Células foliculotropas (fig. 113 B y E):

Las células foliculotropas predominan en la perifería de la glándula, frecuentemente junto a los capilares sanguíneos y su proporción es de 4,1 % para machos y hembras de 3 meses de la cepa Jc1: Sprague-Dawley (Oichi *et al* 1993).

Son células esféricas con un diámetro de unos 15 μm , los núcleos son a veces excéntricos. Los gránulos secretorios son esféricos, numerosos y de baja densidad electrónica de 200 a 300 μm de diámetro. El RER está dilatado y el complejo de Golgi está discretamente desarrollado. Las mitocondrias son alargadas y densas a los electrones, poseyendo diminutos gránulos mitocondriales. Ni la actividad replicativa ni el tamaño cambian durante el estrus pero la inmunoreactividad aumenta, detectándose también en el aparato de Golgi y el RER. Estas células aumentan de tamaño en la castración. (Osamura *et al* 1981).

Células luteinizantes (fig. 113 C y F):

Las células luteinizantes predominan en la periferia de la glándula sobre todo en la zona ventral, frecuentemente junto a los capilares sanguíneos y su proporción es de 5,0 % para machos y 5,9 % para hembras de 3 meses de la cepa Jc1: Sprague-Dawley respectivamente (Oichi *et al* 1993).

Son células pequeñas, poligonales u ovals de menos de 9 μm de diámetro. Sus núcleos son redondeados y a veces excéntricos. Los gránulos de secreción son redondos y electrodensos de unos 200 a 250 nm de diámetro. El RER presenta cisternas irregulares y moderada cantidad de ribosomas en su cara citosólica. El aparato de golgi está medianamente desarrollado. Las mitocondrias se observan densas a los electrones con crestas y numerosos gránulos intramitocondriales. También se observan los centriolos, ribosomas libres y microtúbulos. Ni la actividad replicativa ni el tamaño cambian durante el estrus pero la inmunoreactividad aumenta, detectándose también en el aparato de Golgi y el RER (Osamura *et al* 1981).

Tanto LH como FSH se producen en la misma célula, por lo que a las células luteinizantes y a las foliculotropas se las denomina gonadotropas. Existen células que contienen un sólo tipo de gonadotropina, pero también células en donde se colocalizan ambas hormonas. El uso de antisueros contra las subunidades β permitió determinar que la mayor parte de las gonadotropas contienen LH y que FSH es sintetizada por la mayor parte de las mismas. Luego, con el aislamiento de fracciones de células secretoras de LH por medio de anticuerpos anti-LH unidos a partículas magnéticas se corroboró la idea de que LH y FSH se secretan por las mis-

mas células (Nakane 1970; Phifer *et al* 1973; Tixier-Vidal *et al* 1975; Dada *et al* 1984; Kurosumi *et al* 1991; Flaws and Suter 1993).

Células tirotropas (fig. I12 C y F):

Las células tirotropas predominan en la región ventromedial pero también pueden encontrarse en otras regiones, aunque siempre lejos de los vasos. Es la población hipofisaria menos numerosa, siendo su proporción 2,1 % para machos y 2,4 % para hembras de 3 meses de la cepa Jc1: Sprague-Dawley respectivamente (Oichi *et al* 1993).

Son las células más pequeñas de la población hipofisaria (menos de 6 μm de diámetro), sus contornos son irregulares y sus núcleos esféricos. Sus gránulos secretorios también son los más pequeños, con un diámetro de 50 a 100 nm; son escasos y de densidad variable. El RER posee cisternas alargadas y paralelas. El aparato de Golgi es pequeño y los LIS son grandes y frecuentes. Poseen un reducido número de mitocondrias.

Células cromófobas:

Las células que no resultan inmunoteñidas con los anticuerpos contra las hormonas mencionadas anteriormente se denominaron cromófobas. Esta población representa un 17,5 % para machos y 16,5 % para hembras de 3 meses de la cepa Jc1: Sprague-Dawley respectivamente (Oichi *et al* 1993).

Hasta 1972 se pensó que estas células representaban o bien células degranuladas o bien células precursoras de las poblaciones celulares mencionadas anteriormente. Pero en esa época se pudo reconocer un grupo de células que por sus capacidades mitóticas, su disposición y morfología se diferenciaban marcadamente del resto de las células inmunonegativas para las hormonas hipofisarias conocidas en esos tiempos y se las denominó células foliculo estelares. Actualmente se conocen una serie de marcadores para estas células y se les están asignando funciones particulares, por lo que conviene ubicarlas en un grupo aparte (Vila-Porcile 1972, Yoshimura *et al* 1977).

Las células cromófobas son irregulares, carecen de gránulos de secreción, el núcleo es de gran tamaño y los organoides citoplasmáticos relacionadas con la secreción proteica no están desarrollados.

Células foliculo estelares:

Estas células se presentan como un epitelio columnar o cuboidal en las ratas de 10 días de edad; al mes se observan desmosomas (que le confieren fuerza mecánica a las uniones intercelulares) y “gap junctions” (que permiten el intercambio de pequeñas moléculas como por ejemplo AMPc y purinas, facilitando la integración metabólica de las células del foliculo) y recién a los 2 meses se forman microfoliculos. En este momento las células adquieren formas estrelladas con finas prolongaciones que pueden entrar en contacto con los capilares sanguíneos. Estas son las únicas células hipofisarias que se comunican mediante gap junctions y permitirían un rápido intercambio de información a través del complejo sistema de interconexión de los foliculos (Soji and Herbert 1989, Soji *et al* 1990, Soji and Herbert 1990).

Estas células poseen una serie de proteínas que permiten su inmunomarcación: proteína S-100, factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento del endotelio vascular y follistatina. El bFGF se detectó en el núcleo de las células foliculoestelares degranuladas, lo que sugeriría un posible control intracrino de la diferenciación de estas células. También se ha vinculado a la liberación de bFGF por las células foliculoestelares a la regulación de la capilarización de la adenohipófisis. Estas células son también inmunorreactivas para interleukina-6 (IL-6), la cual se secretaría cuando la célula es estimulada con el péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) o por el péptido vasoactivo intestinal (VIP) (Nakajima *et al* 1980, Ferrara *et al* 1987, Gospodarowics and Lau 1989, Amano *et al* 1993, Matsumoto *et al* 1993, Schechter *et al* 1993).

Con el uso de los anticuerpos monoclonales anti-S-100 α y anti-S-100 β , las células foliculoestelares fueron clasificadas en 3 grupos: α , β y $\alpha\beta$, cuyos porcentajes relativos dependen de la cepa; por ejemplo para la cepa Sprague-Dawley son 26, 53 y 21%, mientras que para la cepa “Spontaneous Dwarf” son 55, 12 y 33 %, respectivamente. Las de tipo α se ubican en la periferia y área ventral de la adenohipófisis formando los acúmulos mas grandes; es el tipo celular que presenta citoplasma mas abundante. Las de tipo β se distribuyen difusamente a través de la misma, son las células mas pequeñas y sus procesos son los mas finos. Las células $\alpha\beta$ se distribuyen por toda la adenohipófisis pero formando pequeños acúmulos y sus características morfológicas son intermedias entre las α y las β (Watanabe and Hashimoto 1993).

B) Pars tuberalis

Constituye un collar de células de 25 a 60 μm de espesor alrededor del tallo neural. Es más gruesa por delante y frecuentemente incompleta en su cara posterior. Las células se disponen en cordones cortos formando pequeños folículos. En los vertebrados superiores los tipos celulares son idénticos a los de la pars distalis.

C) Pars intermedia

La pars intermedia no existe en el hombre adulto, pero está bien desarrollada en el feto humano y en otros mamíferos. Sus células secretoras son las melanotropas cuyos gránulos contienen la hormona melanocito estimulante (α -MSH y β -MSH), el péptido córticotrofin-simil del lóbulo intermedio (CLIP), β -endorfina y γ -lipotropina. Las células son poligonales y contienen numerosos gránulos secretorios de 200 a 350 nm de diámetro. Estos gránulos se observan pálidos al microscopio electrónico, aunque existe un pequeño número de gránulos densos en cada célula. Tanto el RER como el golgi están poco desarrollados. Las mitocondrias son ovoides y poseen una matriz densa (Kobayashi 1974).

Esta región de la adenohipófisis está profusamente innervada por fibras nerviosas originadas en el hipotálamo y en el tallo cerebral, las que contienen catecolaminas, fundamentalmente dopamina (DA) y serotonina (5-HT). Algunos autores también encontraron neuronas donde se colocalizaban DA y 5-HT, esto se explicaría parcialmente como resultado de la recaptación de los mismos lo que se logró comparando la distribución de inmunorreactividad contra tirosina hidroxilasa, TH, (enzima involucrada en la síntesis de catecolaminas) con la distribución de inmunorreactividad contra 5-HT. Recientemente sin embargo, estudiando la colocalización de TH con la de triptofanohidroxilasa, TpOH, (enzima involucrada en la síntesis de 5-HT) y la colocalización de TH con la de 5-HT luego de tratar los animales con 5-hidroxitriptofano, 5-HTP, (su precursor inmediato) se encontró que un pequeño número de neuronas producen ambos neurotransmisores (Tilders *et al* 1979, Westlund and Childs 1982, Friedman *et al* 1983, Davis *et al* 1984, Saland *et al* 1987, Saland *et al* 1988, Saland *et al* 1993).

4) HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS: ESTRUCTURA QUIMICA, SINTESIS Y FUNCION:

A) Adrenocorticotrofina (ACTH) y su familia de péptidos

Todos los péptidos relacionados con ACTH derivan de una glicoproteína de 31-34 kDa denominada pro-opiomelanocortina (POMC) como muestra la fig. I14 (Krieger *et al* 1980):

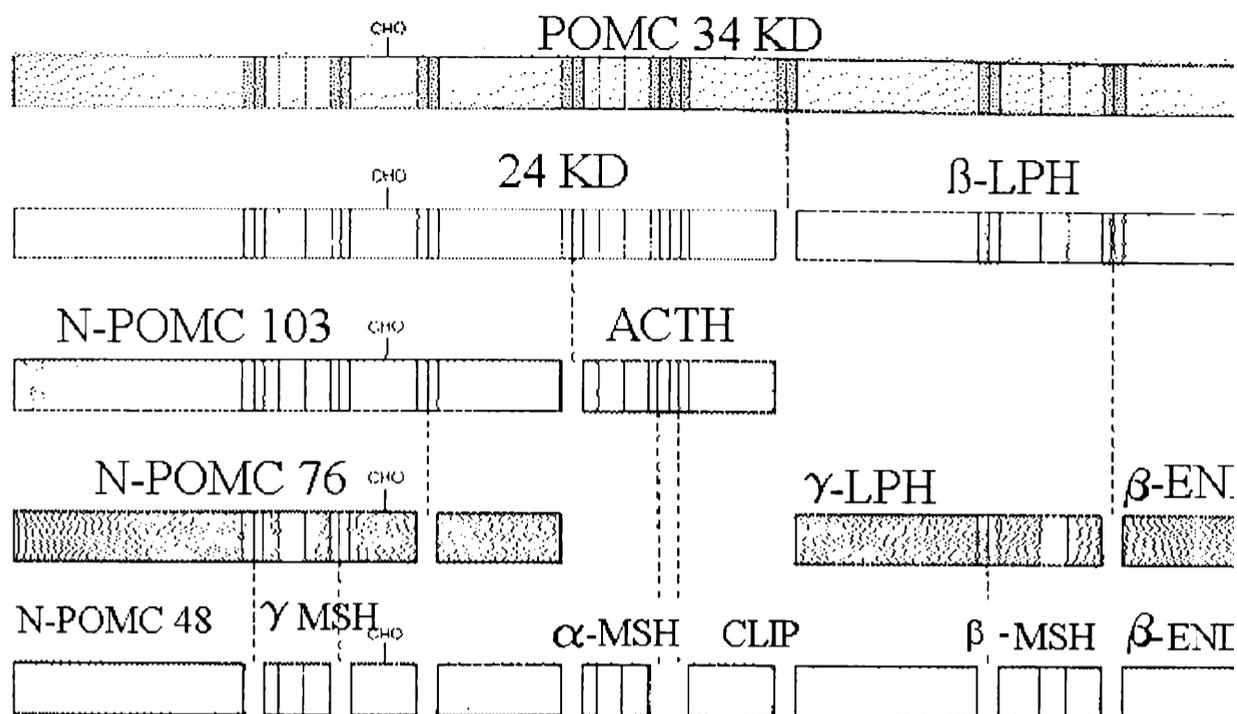


FIGURA I14: *Procesamiento de POMC (Tomada de : Estivariz 1985).*

Cuando el mRNA que codifica para POMC llega al citosol se une al ribosoma y comienza la síntesis proteica de una molécula llamada pre-proopiomelanocortina (p-POMC) de 265 residuos aminoacídicos (aa). La región N-terminal de p-POMC posee una secuencia altamente hidrofóbica de 26 aa, el péptido señal, que le permite a la molécula entrar a las cisternas del RER y luego es clivado por una peptidasa señal originando un péptido de 28 kDa cuyo aa N-terminal suele ser Trp. Dentro del RER este péptido es N-glicosilado por incorporación de glucosamina sobre el residuo de Asn en dos regiones que contienen una secuencia Asn-x-Ser (donde x es cualquier aa) y se encuentran en la región contigua a γ -MSH y en la correspondiente a CLIP, originando la molécula llamada POMC I. En la pars distalis se produce POMC I de 34 kDa, mientras que en la pars intermedia se produce además de POMC I, otra molécula que carece de glicosilación en la región CLIP de 31 kDa llamada POMC II (Nakanishi *et al* 1979, Jenks *et al* 1985).

En la siguiente etapa, la maduración ocurre en el aparato de Golgi donde el precursor se cliva secuencialmente por sitios donde existen 2 aa dibásicos consecutivos mediante enzimas específicas; el glúcido protegería al precursor del ataque de enzimas menos específicas. El primer corte origina β -LPH (91 aa) y una proteína de 24 kDa (178 aa) la que inmediatamente sufre otro corte para originar la región N-terminal completa (N-POMC 103) y ACTH (39 aa). Estos 3 péptidos son los productos de secreción mayoritarios de las células córticotrofas. En estas células, algunas moléculas de N-POMC 103 y de β -LPH pueden escindirse originando el primero N-POMC 76 y un residuo C-terminal de 30 aa, mientras que el segundo

origina γ -LPH (58 aa) y β -endorfina (31 aa). Este es el máximo procesamiento que puede ocurrir en las córticotrofas.

En las células melanotrofas el procesamiento prosigue en mayor o menor grado. N-POMC 76 origina N-POMC 48, γ -MSH (12) y un péptido que contiene la cadena glicosídica N-terminal. ACTH origina α -MSH (13 aa) y CLIP (21 aa) (péptido del lóbulo intermedio corticotrofin-simil) que puede o no estar glicosilado denominándose CLIP I o CLIP II según provenga de POMC I o de POMC II respectivamente. γ -LPH se escinde en β -MSH (18 aa) y el fragmento N-terminal de γ -LPH.

También se producen otras modificaciones post-traduccionales, por ejemplo la N-acetilación de la Tyr de la endorfina, ACTH puede estar acetilado o amidado, α -MSH puede sufrir O- o N-acetilación en su Ser N-terminal y amidación del C-terminal.

Las moléculas de ACTH, α -MSH, β -MSH, γ -MSH, β -LPH, γ -LPH, N-POMC 76 y 103 y el péptido de 24 kDa contienen la siguiente secuencia heptapeptídica común: Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly denominada secuencia melanotrófica que sería necesaria para conferir a estas moléculas actividad biológica, mientras que el entorno biológico que rodea a esta secuencia es esencial para determinar la especificidad hormonal de cada péptido, además, la repetición de este heptapéptido en la molécula de POMC sugiere que el gen se originó mediante duplicaciones sucesivas de un gen ancestral de menor tamaño. Como ejemplo, en la tabla I6 se muestra la estructura de algunos de ellos, indicándose en negrita el número del primer y último aa, las modificaciones que sufre α -MSH en sus aa inicial y final y la secuencia heptapeptídica común. Este heptapéptido es esencial para conferirle a la molécula su actividad biológica (en realidad el tetrapéptido His-Phe-Arg-Trp posee cierta actividad melanotrófica pero es un millón de veces menos potente que α -MSH) ya sea sobre la síntesis de esteroides, lipólisis o dispersión de la melanina; la región posterior a éste permite reconocer su receptor específico y así le otorga a las moléculas diferentes actividades biológicas. La secuencia heptapeptídica de estas hormonas se encuentra altamente conservada entre los vertebrados. La región 1-19 de ACTH es la más conservada de la molécula (Ramachandran 1974, Lowry *et al* 1976, Eberle and Schwyzer 1976, Estivariz *et al* 1980, Hope and Lowry 1981, Chrétien and Seidah 1981).

La molécula de ACTH posee una vida media de 20 a 25 min y su aclaramiento sigue una cinética monoexponencial. La corteza adrenal degrada una pequeña cantidad de la hormona plasmática, mientras que la mayor parte de ésta se degrada en hígado y riñón. Además presenta un patrón de secreción pulsátil y un ritmo de secreción circadiano. En el humano los niveles séricos mínimos se alcanzan entre las 22 y las 2 hs (menos de 10 pg/ml) y los pulsos se producen cada 10 - 25

min., luego los niveles séricos hormonales ascienden hasta alcanzar el máximo alrededor de las 8 hs, momento en el cual la frecuencia es de un pulso cada 5 - 10 min.

TABLA I6: Estructura primaria de ACTH y MSH (tomada de: Ramachandran 1974).

<u>HORMONA</u> (origen)	<u>ESTRUCTURA</u>
α -MSH (porcino, equino, vacuno)	1 CH ₃ CO-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂ 13
β -MSH (porcino)	1 Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys- Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp 18
ACTH (porcino)	1 Ser-Tyr-Ser- Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe 39

Luego del pico, los niveles caen hasta regresar al mínimo. La β -LPH posee una vida media dos veces mayor que ACTH, se secreta en forma episódica y con un ritmo circadiano coincidente con el de ACTH. Como la concentración de β -LPH es equimolar con la de ACTH y como además se sintetizan en el mismo tipo celular y a partir del mismo precursor, se sugirió que ambos se liberan a partir de los mismos gránulos secretorios (Tanaka *et al* 1978; Veldhuis and Johnson 1992; De Nicolao and Liberati 1993).

La ACTH no sólo controla la función de la corteza adrenal aumentando la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en el hombre o corticosterona en la rata), sino que además regula el crecimiento y replicación de las células corticales de la zona fascicular. La constante de asociación de los receptores corticales por ACTH es del orden de 10^{12} M^{-1} lo que permite concentrar el ACTH del plasma. En presencia de calcio, el complejo ACTH-receptor acelera el recambio de fosfatidilinositol e incrementa el AMPc de la célula adrenal, lo que conduce a la fosforilación de proteínas claves en la conversión del colesterol en pregnenolona (por activación de la unión del colesterol al citocromo P₄₅₀) y fosforilación de histonas (síntesis de DNA, enzimas esteroideogénicas, enzimas de la vía de las pentosas). Como consecuencia de esto, aumenta la síntesis y liberación de cortisol y la síntesis proteica incrementando el peso de la glándula. Ratas tratadas con altas dosis diarias de ACTH incrementan la conversión de desoxicorticosterona a corticosterona y 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona, lo cual se acompaña con una reducida conversión a 18-hidroxycorticosterona y aldosterona. También, interviene en la maduración de las células de la zona fasciculata y la expresión de los genes de las enzimas esteroideogénicas P-450_{17 α} y P-450_{SCC} de animales en gestación. Además, ACTH moviliza los ácidos grasos no esterificados y las grasas neutras desde el tejido adiposo y aumenta la tasa tisular de oxidación de lípidos. Estimula la captación de glucosa y de aa por el músculo, también la secreción de insulina y hormona de crecimiento (GH). La administración de ACTH inhibe la maduración reproductiva de ratas

hembras a través de la secreción de esteroides adrenales (Baumann and Müller 1974, Macfarland and Mann 1977, Podestá *et al* 1979, Perry *et al* 1992).

Las moléculas de α y β MSH intervienen en el control de la pigmentación de la piel de los vertebrados inferiores, los cuales junto con las catecolaminas modifican la dispersión de los gránulos de melanina dentro de los melanóforos al estimular la adenilato ciclasa, en algunos mamíferos regula la deposición de melanina en el folículo piloso en forma dependiente de la estación del año debido a la duración del fotoperíodo. En los mamíferos β MSH, γ LPH y β LPH estimulan la producción de mineralocorticoides por la zona glomerulosa de la corteza adrenal. α -MSH mantiene el peso de la adrenal y restaura parcialmente los niveles de aldosterona de ratas hipofisectomizadas y con restricción de sodio, lo que no se logra con ACTH, GH o ACTH mas tiroxina. Se observó actividad lipolítica de α -MSH sobre los adipocitos de conejo (Palmore and Mulrow 1967, Hadley and Goldman 1969, Page *et al* 1974, Ramachandran *et al* 1976, Logan and Weatherhead 1979).

Los péptidos N-terminal de POMC que poseen una secuencia heptapeptídica en su molécula, son capaces de potenciar la acción de ACTH sobre la zona fasciculada de producir glucocorticoides. Además, también son capaces de potenciar la acción de β MSH y β LPH sobre la zona glomerulosa de producir mineralocorticoides.

Tanto ACTH como α MSH producidos por la hipófisis y cerebro son potentes antipiréticos. α MSH inhibe la liberación de CRH cuando se incuban hipotálamo medio basal con interleukinas 1 o 6, lo que soporta la idea de que este péptido posee actividad anticitoquina. El péptido N-POMC 48 posee actividad mitogénica sobre la corteza adrenal y CLIP estimula la liberación de insulina por las células β de los islotes de Langerhans. La β -endorfina inhibe el comportamiento sexual de machos y hembras. Inhibe la liberación de noradrenalina de las neuronas hipotálamicas, lo cual inhibe la liberación hipotalámica de GnRH y así se reduce la liberación de gonadotrofinas. Inhibe la secreción de dopamina y entonces aumenta la liberación de PRL. También incrementa la secreción de GH, ACTH y α MSH, así se mobilizan recursos físicos y mentales tendientes a reducir el estrés y promover un comportamiento adaptativo. Produce analgesia aunque no atraviesa la barrera hematoencefálica. (Imura *et al* 1985, Genazzani *et al* 1993, Lyson and McCann 1993).

B) Hormona de crecimiento o somatotrofina (GH):

La hormona de crecimiento (GH), somatotrofina coriónica (CS) y prolactina (PRL) son tres polipéptidos emparentados. Todos están constituidos por una cadena polipeptídica de 191 aa para GH y CS con dos enlaces disulfuro y de 199 aa

para PRL con tres enlaces disulfuro. El grado de homología entre GH y CS es del 85 %, mientras que el grado de homología entre GH y PRL es del 16 % (Li 1961; Li 1969).

Estas proteínas derivaron de la duplicación genética y evolución divergente de un gen ancestral común. La duplicación génica separó en etapas tempranas de la evolución de los vertebrados los genes de GH y PRL. Posteriormente, durante la evolución de los primates, se originó el gen de CS a partir del gen de GH. Los genes de GH y CS humanos se encuentran en el cromosoma 17, sus ARNm transcrito primarios poseen 5 exones separados por 4 intrones, ambos son homologos en 4 de los 5 exones. El ARNm transcrito primario posee un sitio alternativo de corte que genera una proteína con 32 a 46 aa menos y un peso molecular de 20 kDa, en lugar de los 22 kDa de la hormona normal, pero constituye una fracción muy pequeña de la GH secretada. Esta hormona no se sintetiza como prohormona y el péptido señal de pre-GH se cliva en el RER (Zanini *et al* 1974, Lingappa *et al* 1977, Moore *et al* 1982).

Las propiedades fisicoquímicas como punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (PM) y las inmunológicas de GH muestran una amplia diversidad interespecie. Por ejemplo, las GH de rumiantes tienen un PM de 45-50 kDa (dímero) y un pI de ≈ 6.8 , los primates tienen un PM de 20-22 kDa y un pI de ≈ 5.0 y los roedores un PM de 22-25 kDa y pI ≈ 6.0 . La reactividad cruzada indica similitud química entre las moléculas. La actividad biológica da otra idea de la similitud química entre las moléculas, además se observó que una hidrólisis suave permitía conservar la actividad biológica, lo que condujo a la hipótesis de la existencia de un núcleo común a las moléculas de GH de las distintas especies el que sería responsable de la actividad biológica (Geschwind 1959, Li 1961, Li *et al* 1962, Papkoff *et al* 1962, Andrews and Folley 1963).

Los PM indicados arriba corresponden a las variantes de GH secretadas mayoritariamente, ya que pueden existir muchas formas, algunas de las cuales son diméricas y glicosiladas, por ejemplo la rata posee 11 formas en un rango de PM de 11 a 88 kDa y el ser humano contiene isoformas de 20, 22, 45, 50 y > 60 kDa. Estas formas poseen distinta actividad biológica (Sinha and Jacobsen 1988; Bollengier *et al* 1989, Brostedt *et al* 1990).

El contenido de GH de la adenohipófisis humana es de 5-10 mg y el de la rata 0,1-0,3 mg. La GH se libera siguiendo un patrón pulsátil, en ratas machos se produce un pulso cada 3-4 hs, mientras que en la hembra es de uno cada 70 min. La amplitud del pulso es mayor en ratas machos que en hembras, pero mientras en los machos el patrón pulsátil no cambia, en la hembra se incrementa durante la noche. La GH plasmática basal en la rata joven es de alrededor de 10 ng/ml, la amplitud en el macho alrededor de 600 ng/ml y en la hembra de alrededor de 180 ng/ml dependiendo de la cepa. En humanos los pulsos ocurren a lo largo de todo el

día pero dos horas luego de iniciado el sueño ocurre una marcada onda de GH, lo que da cuenta de la mayor parte de la GH secretada en 24 hs. Además del sueño, la frecuencia y amplitud de los pulsos de GH dependen de: edad, sexo, estatus puberal, fase del ciclo menstrual, composición corporal, estado nutricional y ejercicio y de existencia o no de enfermedades. La vida media de esta hormona es de 9-25 min según diversos autores, su aclaramiento sigue una cinética monoexponencial y se degrada en hígado, riñón y músculo esquelético. En sangre circula unida a dos tipos de proteínas transportadoras de GH (GHBPs), una de alta y otra de baja afinidad (Takahashi *et al* 1968, Sassin *et al* 1969, Tannenbaum and Martin 1976, Saunders *et al* 1976, Fryklund 1982, Takahashi *et al* 1987, Takahashi *et al* 1990, Veldhuis and Johnson 1992, De Nicolao and Liberati 1993, Corpas *et al* 1993, Hartman *et al* 1993).

Los efectos resultantes de la acción de GH son anabólicos, pero estos pueden ser directos o indirectos. Esta hormona estimula el crecimiento de todos los tejidos excepto el nervioso. Interviene en el metabolismo de proteínas, glúcidos y lípidos. Posee una acción indirecta sobre el tejido óseo, induciendo su crecimiento a través de la liberación de somatomedinas por el hígado y riñón.

La GH estimula el transporte de aa a través de la membrana plasmática, la síntesis de aminoácidos, aumenta el número de polisomas unidos al RER, eleva la actividad de la ADN-polimerasa y de la ARN-polimerasa, incrementando por ejemplo el ARNm de la cadena pesada de miosina en el músculo. GH posee un papel importante no sólo en el crecimiento y desarrollo del músculo, sino también en el músculo en regeneración a partir de células satélites que migran de regiones del músculo no dañadas para generar fibras *de novo* sobre las cuales actúa esta hormona aumentando la síntesis proteica, la producción de IGF-2 y la del receptor de IGF-2. También hay un aumento del receptor de GH, aunque no se sabe si es por acción de la propia GH. En seres humanos el efecto agudo sobre la síntesis proteica que ejerce GH estaría restringido al músculo esquelético. La hormona induce un balance positivo de nitrógeno, calcio, fósforo, potasio y magnesio y reduce la producción de urea. También induce retención plasmática de sodio, cloruro y agua e incrementa el flujo sanguíneo y tasa de filtración renal (Russel 1957, Knobil and Hotchkiss 1964, Hjalmarson 1968, Schultz *et al* 1985, Fong *et al* 1989, Hirschberg *et al* 1989, Tollefsen *et al* 1989, Ulman *et al* 1989, Fryberg *et al* 1991, Jennische and Andersson 1991, Lundeberg *et al* 1991, Moller *et al* 1991, Fryberg and Barrett 1993).

Actúa sobre el metabolismo glucídico, aumentando la glucemia, inhibiendo el efecto hipoglucemiante de la insulina por reducir la sensibilidad del tejido a la insulina con la consecuente disminución en transporte de glucosa, disminuyendo la utilización de glucosa por parte de los tejidos, ya que inhibe la glucólisis debido al incremento en el metabolismo de ácidos grasos y al aumento de la actividad de la

glucógeno sintetasa. Aumenta la gluconeogénesis hepática y liberación de la glucosa a sangre. Un aumento crónico de GH produce efectos diabetogénicos (Russel 1956, Russel 1957, Weil 1965, Clark *et al* 1985, Bak *et al* 1991).

A nivel lipídico, la GH administrada en forma aguda inhibe la síntesis de ácidos grasos, mientras que en forma crónica moviliza los ácidos grasos libres, disminuye la síntesis de glicerol y la reesterificación de los triglicéridos, favorece la utilización de triglicéridos incrementando su oxidación e inhibe la lipogénesis. La GH aumenta la cetogénesis y formación de cuerpos cetónicos; también disminuye el colesterol plasmático. La acción lipolítica de GH es potenciada por teofilina o glucocorticoides. El receptor de GH (GHR) podría actuar estimulando la producción de AMPc aunque los resultados obtenidos son contradictorios. Recientemente se caracterizó como una proteína de 134 kDa N-glicosilada que al activarse por unión de GH adquiere actividad de tirosinquinasa y fosforila proteínas celulares. También se halló que el fragmento 108-129 de GH puede unirse a una proteína diferente a GHR, IGF-I o insulina y ejercer una actividad mitogénica similar a IGF-I y mayor que insulina (Goodman 1963, Knobil and Hotchkiss 1964, Swislocki and Szego 1965, Winkler *et al* 1969, Clark *et al* 1985, Salomon *et al* 1989, Bak *et al* 1991, Silva *et al* 1993, Jeoung *et al* 1993).

Se ha sugerido que GH posee algunos efectos psicotrópicos: produce trastornos del sueño ya que aumenta el sueño de movimientos oculares rápidos por alterar el tono colinérgico que lo regula. Mejora la memoria en los test de reconocimiento facial, el sentimiento de bienestar, la vitalidad, el rendimiento y el estado de alerta. GH también posee una acción directa sobre el sistema inmune que se tratará posteriormente (Mendelson *et al* 1980, Almqvist *et al* 1986, Jorgensen *et al* 1989, Degerbiad *et al* 1990, Astrom *et al* 1990).

Esta hormona también puede ejercer su influencia en forma indirecta. Las somatomedinas son péptidos sintetizados bajo la influencia de GH, estimulan la incorporación de sulfatos a los proteoglicanos en cartilago, poseen actividad mitogénica sobre fibroblastos y actividad insulínica sobre el tejido adiposo y muscular (ya que tienen cierta afinidad por el receptor de insulina, así como ésta lo tiene por los receptores de somatomedinas). Las somatomedinas se sintetizan en hígado, riñón y fibroblastos de pulmón fetal, aunque también pueden existir otros sitios de síntesis como el músculo esquelético en regeneración y fibroblastos adyacentes donde actúan en forma autócrina y parácrina. En cultivos de osteoblastos GH estimula la síntesis local de IGF-I. Estas condiciones las cumplen las somatomedinas A, el factor estimulante de la mitogénesis (MSA) y los factores de crecimiento insulino-simil I (antes llamado somatomedina C) y II (IGF-I y -II) Su actividad depende del estado nutricional del organismo. Estas sustancias reconocen al receptor de insulina, pero, sus afinidades y actividades metabólicas son mucho menores que la de esta y además no son reconocidos por los anticuerpos anti-insulina aunque sus

estructuras primarias muestran cierta relación con la insulina, lo que haría pensar que derivan de un gen ancestral común. Su liberación se encuentra estimulada no solo por GH sino también por PRL, CS, e insulina. La producción de IGFs es inhibida por estrógenos por disminuir su producción hepática y por glucocorticoides y malnutrición a través de la síntesis hepática de inhibidores de somatomedinas. Recientes estudios muestran que los glucocorticoides disminuyen los niveles de ARNm-IGF-I en cultivos de osteoblastos. Además de poseer actividad estimuladora de la síntesis de colágeno y proteoglicano y de la actividad mitogénica en el cartilago, estas sustancias poseen otras acciones: estimulan la captación de glucosa e inhiben la lipólisis en los adipocitos, estimulan el transporte de glucosa y aa, la gluconeogénesis, la actividad de la ornitina decarboxilasa y la síntesis de proteínas en el músculo, transporte de aa, la incorporación de prolina, la síntesis proteica y de ADN en el cartilago, aumenta la captación de glucosa, y el crecimiento global de todo el animal y del feto; las IGFs son hipoglucemiantes. Sobre algunos fibroblastos no inician la mitosis, sino que facilitan la finalización de la mitosis iniciada por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Las IGFs circulan unidas a proteínas unidoras de IGF (IGFBPs), de las cuales se conocen 6 (siendo predominante la IGFBP-3) que son sintetizadas por los osteoblastos estimulados por diferentes factores (hormona paratiroidea, vitamina D, GH, IGFs, etc) y modulan la actividad de IGFs (por ejemplo IGFBP-3 exalta la actividad mitogénica de IGF-I sobre osteoblastos, mientras que IGFBP-4 la inhibe) y reducen la sensibilidad de las IGFs a las proteasas. El IGF-I es responsable de la apnea obstructiva del sueño que presentan algunos pacientes acromegálicos. Se ha mostrado que las IGF-I, junto con la GH, participan en el crecimiento, desarrollo muscular y posiblemente en la regeneración muscular. La IGF-II se produce en grandes cantidades en el tejido conectivo fetal y en el músculo en regeneración donde actúa en forma autócrina o parácrina. Sus niveles no son detectables en tejido conectivo adulto. La IGFII estaría involucrada en el procesamiento y mantenimiento de las enzimas lisosomales necesarias durante el desarrollo y regeneración de tejidos, también esta asociada a la estimulación de la proliferación de células tumorales especialmente las de fenotipos poco diferenciados. (Clemmons and van Wyk 1981, Daughaday 1981, Schoenle *et al* 1982, D'Ercole *et al* 1984, Dodson *et al* 1985, Han *et al* 1987, Isgaard *et al* 1989, Sara and Hall 1990, Grunstein *et al* 1991, Kornfeld 1992, Levinovitz *et al* 1992, Marcus *et al* 1993, Wang *et al* 1994, Manolagas and Jilka 1995, Swolin *et al* 1996, Toretsky and Helman 1996).

C) Prolactina (PRL):

Como se mencionó anteriormente, la PRL es una hormona relacionada ancestralmente con GH y CS. Está formada por una cadena polipeptídica de 199 aa

que posee tres enlaces disulfuro. De la misma, al igual que para GH, se han reportado varias formas en diversas especies (humana, rata, ratón, etc.). La descripción de los PM de cada variante depende del laboratorio, pero las formas encontradas son: una forma clivada de 16 kDa, una forma monomérica de 23 kDa (o 24 kDa), formas glicosiladas de 25 kDa (o 26 kDa), formas poliméricas y formas que difieren en carga. Las formas poliméricas se generan por unión de los monómeros por uniones disulfuro; se conocen isoformas big PRL de alrededor de 50 kDa y bigbig de entre 150 y 170 kDa, aunque también existen formas monoméricas altamente glicosiladas de 60 - 64 kDa que persisten luego del tratamiento con β -mercapto-etanol. La forma clivada de 16 kDa se formaría por acción de una serina proteasa sobre la forma monomérica. Existen isoformas del monómero de 24 kDa llamada isoforma 2 que corresponde a la forma madura y es la mas abundante, las isoformas 3 y 3' están mas fosforiladas y la 1 esta mono o no fosforilada. Estas formas difieren en actividad biológica, son secretadas en diferentes estados metabólicos del organismo y podrían tener células blanco y roles fisiológicos específicos. Las formas predominantes son el monómero de 23 kDa y su forma glicosilada de 25 kDa. Cuando la secreción de PRL es baja o está inhibida aumenta la proporción de las formas poliméricas, por lo que probablemente sean formas de almacenamiento de baja actividad biológica. La forma de 16 kDa posee, a diferencia de las formas intactas, actividad angiogénica que podría ser importante en la inhibición de la vascularización y crecimiento de tumores hipofisarios. Las células tumorales GH₃, secretan en forma constitutiva la isoforma 2 que además actúa en forma autócrina estimulando la proliferación celular, pero el agregado de la isoforma 3 actúa en forma autócrina estimulando la producción de gránulos de secreción. La isoforma 1 defosforilada promueve el crecimiento de células de linfoma Nb₂. Durante el embarazo o en pacientes con hiperprolactinemia se encontró un aumento relativo de las isoformas menos fosforiladas. Además, la proporción de isoformas también varía con las etapas del ciclo sexual en la rata. Estos datos condujeron a proponer que el grado de fosforilación determinaría la actividad biológica de las distintas isoformas, las formas defosforiladas serían promotoras de la división celular, mientras que las mas fosforiladas la inhibirían. En la rata, los siete aa N-terminal y el residuo tirosina-42, se encuentran altamente conservados entre las diferentes variantes y se demostró que el heptapéptido contribuye a la unión al receptor y el residuo 42 sería esencial para la actividad mitogénica y muchas otras funciones de PRL. Se ha sugerido que las diferencias en actividad de PRL, se debería a la competición de las diferentes formas por el receptor, aunque no se ha descartado la existencia de diferentes receptores específicos para el tipo de señal transducida ya que se ha encontrado dos formas para el ARNm del receptor, una corta y otra larga, cuya localización es tejido específica. (Asawaroengchai *et al* 1978, Mitra 1980, Shiu *et al* 1983, Oetting and Walker 1986, Sinha and Jacobsen 1988, Ho *et al* 1989,

Bollengier *et al* 1989, Andries *et al* 1992, Kelly *et al* 1992, Stroud *et al* 1992, Bollengier *et al* 1993, Clapp *et al* 1993, Ho *et al* 1993, Rao *et al* 1993, Larrea *et al* 1993, Ouhtit *et al* 1993, Maruyama *et al* 1994).

El contenido de PRL en la hipófisis humana es de 0,1-0,4 mg, mientras que en la rata es de 10-50 µg. En la mujer los niveles séricos de PRL son de entre 10 y 20 ng/ml; los mayores niveles se asocian a la mitad del ciclo reproductivo, siendo algo menor en el hombre y prepúberes, durante el embarazo crece progresivamente hasta alcanzar los 100-300 ng/ml en el tercer trimestre. Luego del parto, si no hay succión de los pezones los niveles caen a los valores normales en dos o tres meses, si hay succión se produce un reflejo nervioso que causa un pico secretorio de PRL. En la rata macho los niveles séricos de PRL se hallan entre 12 y 15 ng/ml, mientras que en la hembra varía entre 12 y 70 ng/ml siendo los mayores niveles hallados en el proestro y al igual que en el humano estos valores aumentan durante la preñez. Los niveles séricos de esta hormona aumentan durante el sueño. La vida media de PRL en plasma es de 20 a 37 min, su aclaramiento sigue una cinética monoexponencial catabolizándose en riñón. (Hwang *et al* 1971, Jacobs *et al* 1972, Mallampati and Johnson 1974, Aguado *et al* 1977, Macfarland and Mann 1977, Frantz 1978, Takahashi *et al* 1979, Vaughan *et al* 1979, Lu *et al* 1979, Takahashi *et al* 1980, Takahashi *et al* 1982, Goya *et al* 1987, Takahashi *et al* 1990, Lafuente *et al* 1992, Schiavi *et al* 1992, Veldhuis and Johnson 1992, De Nicolao and Liberati 1993, Park *et al* 1996).

La PRL es una de las hormonas responsables de la iniciación y mantenimiento de la lactación, pero además posee muchas otras acciones, algunas de las cuales están relacionadas a su homología con GH.

En la glándula mamaria y vasos sanguíneos, esta hormona estimula la producción de prostaglandina F₂-α, la cual aumenta la concentración de proteína quinasa disponible para ser activada por el AMPc. El receptor de PRL como miembro de la superfamilia de receptores citoquina/GH/PRL está asociado a una tirosinquinasa citoplasmática que se autofosforila y fosforila una tirosina C-terminal del receptor. La fosforilación del receptor sería necesaria para la activación de la transcripción. La PRL estimula la síntesis de las proteínas, glúcidos y lípidos de la leche, entre ellos, estimula la síntesis de la lactosa sintetasa, galactosil transferasa, caseína y lactoalbúmina. Activa el ciclo de las pentosas y la síntesis de ácidos grasos de 8-10 átomos de carbono. Durante la lactación se incrementa el contenido lácteo de Na⁺, Ca⁺², Cl⁻, lípidos y proteínas mientras que decrece el contenido de K⁺, lactosa y citrato. Los cambios en la concentración iónica de la leche se atribuyen al movimiento paracelular de iones y pequeñas moléculas entre el fluido extracelular y la leche a través de las uniones estrechas y PRL se relaciona con estos cambios mediante la estimulación de la actividad de la bomba de sodio. El cortisol y otras hormonas pueden modular la acción de PRL sobre la glándula mamaria; la insuli-

na lo haría en forma positiva, las hormonas tiroideas en forma negativa, mientras que progesterona inhibe la síntesis de α -lactoalbúmina, caseína y la forma larga del receptor de PRL (PRL-RL). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) inhibe la síntesis de caseína y PRL-RL. Los receptores prolactínicos se localizan mayoritariamente en el polo basal de la célula alveolar (Nicoll 1974, Peaker *et al* 1975, Nishikawa *et al* 1994, Tourkine *et al* 1995, Lebrun *et al* 1995).

Esta hormona modula la retención renal de agua, Na^+ y K^+ estimulando la producción de AMPc y la actividad de la bomba de sodio, encontrándose los receptores en los túbulos proximales y distales y el canal colector. En algunos peces posee acción osmorreguladora modulando la actividad de la bomba de sodio (Lockett and Nail 1965).

En los machos posee acciones sobre el sistema reproductor. Los niveles adecuados de PRL estimulan el crecimiento de los testículos, la producción de testosterona y la espermatogénesis, mientras que su exceso se asocia a disminución de testosterona, hipogonadismo e impotencia. En las células de Leydig la PRL poseería algún rol en la regulación de la esteroideogénesis. En la próstata favorece la retención y metabolismo de la testosterona, estos efectos se producen en todos los lóbulos de la glándula. Los efectos de PRL sobre la próstata son al menos en parte andrógeno-independientes, por ejemplo incrementando en forma directa la transcripción del gen de la subunidad C_3 de prostateína y probasina en toda la glándula y en la región lateral incrementa la producción de citrato al aumentar los niveles de piruvato deshidrogenasa (mientras que en la región ventral este efecto se debería a la acción de la testosterona). Potencia la acción de los andrógenos sobre las glándulas sexuales accesorias. La hiperprolactinemia disminuye la libido y a nivel del cuerpo cavernoso inhibe la erección del pene. La hiperprolactinemia inducida por trasplante de hipófisis en la cápsula renal, suprime los niveles de LH y FSH (Chase *et al* 1957, Dowd and Bartke 1972, Negro-Vilar *et al* 1973, Aragona and Friesen 1975, Bartke *et al* 1977, Reiter *et al* 1995, Aoki *et al* 1995, Costello *et al* 1995).

En la hembra, en bajas concentraciones estimula la producción de progesterona por parte de las células de la granulosa, mientras que concentraciones mayores a 20 ng/ml la inhiben. En las células de la granulosa no diferenciadas no hay receptor para prolactina, pero aparecen por acción de FSH entonces PRL inhibe la actividad de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta 5$ -4 isomerasa mediada por la hidrólisis de un glicosil-fosfatidilinositol. Es también responsable de la transformación del cuerpo lúteo del estro a la preñez donde interviene en su mantenimiento y secreción. Esta hormona estimula la producción de sus propios receptores y la de los estrógenos. Durante el último mes del embarazo el desarrollo folicular y la secreción de LH están deprimidas, luego del parto la secreción de LH se incrementa, pero es inhibida otra vez al establecerse la lactación y a medida que la lactación progresa y los niveles de PRL decrecen LH comienza a aumentar y la foliculogéne-

sis se restablece. Las hormonas modificadas por la lactación como PRL, insulina, GH e IGF-I podrían influenciar la foliculogénesis a nivel de ovario, modificando la secreción de gonadotrofinas. La hiperprolactinemia inducida por trasplante de hipófisis en la cápsula renal, incrementa la amplitud y duración de los pulsos de PRL y la amplitud de los picos de LH. En algunos peces reduce los efectos tóxicos de los estrógenos. En las aves favorece el comportamiento de incubación de los huevos y la alimentación de los pichones (Bern and Nicoll 1968, Nicoll 1974, Smith *et al* 1975, Lu *et al* 1979, Lafuente *et al* 1992, Fanjul *et al* 1993, Quesnel and Prunier 1995).

Además, en mamíferos, la administración de altos niveles de PRL estimula la producción de IGF-I en animales hipofisectomizados. La PRL posee efectos anabólicos, estimulando la eritropoyesis, deposición de lípidos e hiperglucemia. A nivel hepático estimula la producción de ornitina decarboxilasa y β -actina y actúa como mitógeno, mediado este último efecto por la acumulación de diacilglicerol. En el islote de Langerhans se detectaron receptores de PRL en células α y β pero no δ . También se encontró un incremento mediado por PRL en la proliferación de las células acinares del páncreas y en su contenido en enzimas digestivas tales como quimiotripsina y lipasa. A nivel adrenal, la PRL estimularía la producción de progesterona, corticosterona y aldosterona (Nicoll 1974, Crowe *et al* 1991, Buckley and Buckley 1991, Sorenson and Stout 1995, Matsuda *et al* 1995).

Los efectos sobre el sistema inmune se discutirán mas adelante.

D) Hormona luteinizante (LH) y hormona foliculo estimulante (FSH):

Las hormonas LH, FSH, tirotrófina (TSH) y la gonadotrofina coriónica (CG) son glicoproteínas estructuralmente similares, posiblemente derivadas de una molécula ancestral común. Cada hormona tiene un PM de alrededor de 30 kDa, está formada por dos cadenas glicopeptídicas unidas por puentes de hidrógeno, ninguna de las cadenas es activa por separado. La cadena α de cada hormona posee una secuencia común de 96 aa, con un alto grado de homología entre sí y estructuras terciarias similares. Su gen consiste en cuatro exones y tres intrones, posee alto grado de homología entre el humano, el bovino, la rata y el ratón ; en el humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 6. La cadena β le confiere a la hormona especificidad de unión al receptor. En el humano el gen β LH se localiza en el brazo largo del cromosoma 19 y el de β FSH en el brazo corto del cromosoma 11, pero ambos productos génicos constan de tres exones y dos intrones. FSH β y LH β contienen 115 aa, hCG β contiene 147 aa y TSH β contiene 110 aa. Las subunidades α presentan cinco puentes disulfuro y están N-glicosiladas en dos residuos de asparagina. La cadena β de hCG posee cinco y las cadenas β de las otras tres hormonas poseen dos residuos de asparagina N-glicosiladas. El ácido siálico termi-

nal se encuentra frecuentemente en las cadenas glicosídicas de hCG β y en menor medida en FSH β . El ácido siálico no es necesario para la unión al receptor pero aumenta la vida media de la hormona en circulación. TSH β y LH β poseen cadenas glicosídicas sulfatadas. Existe gran heterogeneidad entre los oligosacáridos de cada hormona, lo que conduce a diferentes variantes, con diferente afinidad y potencia biológica. La proporción entre las isoformas de LH y FSH en la hipófisis y en circulación varía con la edad y el sexo. La sustitución de las asparaginas por otros aa mediante mutagénesis dirigida en la subunidad β evita la N-glicosilación y la molécula resultante se ensambla mas lentamente con la subunidad α . (Pierce and Parsons 1981, Roberston *et al* 1982, Chin 1985, Sardanons *et al* 1987, Matzuk and Boime 1988, Matzuk *et al* 1989, Sairman 1989, Wide 1989).

El contenido hipofisario de LH es de alrededor de 700 IU y el de FSH de 200 IU para el hombre o la mujer menstruante, luego de la menopausia el contenido de LH sube a cerca de 1700 UI, mientras que el contenido de FSH no cambia. Los niveles plasmáticos de LH para hombres jóvenes es de alrededor de 3,5 IU/l mientras que el de FSH es de unas 4,5 IU/l. Excepto para el pico ovulatorio, los niveles de LH y FSH de la mujer mestruante son ligeramente superiores al hombre, pero durante el pico los niveles de FSH pueden llegar a 30 IU/l y los de LH a 70 IU/l. Durante la menopausia los niveles plasmáticos de ambas gonadotrofinas se mantienen elevados. La secreción de gonadotrofinas es pulsatil correlacionándose la amplitud del pulso con la duración del sueño REM. El contenido hipofisario de LH en la rata es de 1,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido y 0,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para FSH. La concentración plasmática de los machos o hembras en metestro para LH es de alrededor de 1,5 ng/ml y para FSH de 5,0 ng/ml, mientras que en las hembras en proestro el nivel de LH es de 16 ng/ml y el de FSH es de 6,5 ng/ml. La vida media de LH se ha estimado entre 30 y 47 min y la de FSH entre 240 y 400 min según el autor, poseyendo ambas gonadotrofinas un aclaramiento biexponencial lo que indica la existencia de dos etapas en la depuración de estas hormonas, la última de las cuales, de una duración de sólo unos minutos, correspondería a la degradación de las formas asialo. Estas hormonas se metabolizan en hígado, además, debido a su naturaleza glicoproteica, no se reabsorben totalmente del filtrado glomerular y aparecen en orina (Baghdassarian *et al* 1970, Geschwind 1972, Mallampati and Johnson 1974, Macfarland and Mann 1977, Vaughan *et al* 1979, Lafuente *et al* 1992, Schiavi *et al* 1992, Veldhuis and Johnson 1992, Bauer-Dantoin *et al* 1993, Campos *et al* 1993, De Nicolao and Liberati 1993, Mikuma *et al* 1994).

La hormona luteinizante regula la biosíntesis y secreción de esteroides en testículos y ovarios. En las células de Leydig, la LH acopla el receptor a la adenilato ciclasa induciendo su activación con la consiguiente producción de AMPc, el cual se une a la subunidad regulatoria de la proteína-quinasa y deja la subunidad catalítica libre para fosforilar proteínas intracelulares que activan la biosíntesis de

esteroides y la síntesis proteica. La principal fuente de colesterol en estas células es principalmente la síntesis *de novo* a partir del acetilCoA producido a partir de la degradación de los ácidos grasos, y en menor medida, la captación de colesterol plasmático. Ambos procesos son regulados por LH, ya que favorece la síntesis *de novo* mediante la estimulación de la hidroximetilglutarilCoA reductasa y la captación del colesterol al estimular el aumento de receptores para HDL. Además, estimula la conversión del colesterol en testosterona. Esto se logra facilitando el transporte de colesterol a las mitocondrias o su ruptura y conversión en pregnenolona dentro de la misma, la cual está mediada por el citocromo P₄₅₀. Luego, en el retículo endoplasmático tanto las enzimas de la ruta $\Delta 4$ como las de la ruta $\Delta 5$ son estimuladas por la acción de la LH. A nivel nuclear, esta hormona estimula las ARN-polimerasas I y II y con ello el aumento de la síntesis proteica. La producción de progesterona por las células lúteas también requieren la activación de la adenilato ciclasa por parte de la LH y un mecanismo similar al descrito para las células de Leydig. Además de AMPc, otros segundos mensajeros podrían estar involucrados en la acción de la LH. Se ha sugerido que la adenosina podría ser otro segundo mensajero involucrado en la secreción de progesterona y en el bloqueo de la luteólisis inducida por la prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}) al inhibir la producción de H₂O₂ mediada por PGF_{2 α} . Las prostaglandinas podrían también estar involucradas ya que LH estimula la producción de ácido araquidónico. Los inhibidores de la fosfolipasa A₂, que evitan la producción de ácido araquidónico a partir de fosfolípidos no afectan la producción de AMPc pero disminuyen la secreción de testosterona. Por su parte, los inhibidores de la lipoxigenasa pero no los de la cicloxigenasa, inhiben la producción de testosterona inducida por LH por las células de Leydig . El receptor de LH pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G, posee 7 fragmentos transmembrana, un segmento C-terminal intracelular y un dominio N-terminal extracelular relacionado junto con las secuencias 21-24 y 102-107 en la unión de la hormona y la transducción de la señal. En las células de Leydig existe un gran exceso de receptores de LH y se alcanza la máxima producción de testosterona con solo un 1 % de los receptores ocupados. El mantenimiento de los receptores depende en parte de LH, pero también de FSH y PRL. Mientras las células de la teca externa contienen receptores de LH, las de la teca interna carecen de ellos y su actividad esteroideogénica podrían estar regulados en forma parácrina por factores de crecimiento locales, interleuquinas y prostaglandinas. Durante la ovulación no cambia la distribución de los receptores, luego de 48 después de la ruptura folicular decrece el número de ellos en todos los tipos de células luteas pero en la fase lútea media se recupera el contenido de receptores en las células lúteas derivadas de la teca externa pero no en las células lúteas derivadas de la granulosa. Por tanto el down-regulation es reversible en células derivadas de la teca externa pero irreversible en las derivadas de la granulosa (Schumacher *et al*

1979, Ascoli 1985, Rommerts and Cooke 1988, Bellve and Zheng 1989, Tonetta and DiZerega 1989, Abayasekara *et al* 1990, Weems *et al* 1991, Weems *et al* 1992, Miller-Patrick *et al* 1993, Couture *et al* 1996, Meduri *et al* 1996).

La hormona foliculoestimulante actúa sobre los túbulos seminíferos incrementando la producción de AMPc, el cual activa la proteína quinasa específica para FSH. Esta quinasa disminuye con la edad y sería responsable del comienzo de la primera división meiótica en la espermatogénesis. Esta hormona estimula la actividad de las ARN-polimerasas I y II, lo que conduce a un aumento en la síntesis proteica. Entre las proteínas producidas se encuentra la proteína transportadora de andrógenos (ABP), que se sintetiza en las células de Sertoli e interviene en el transporte de testosterona desde los testículos hacia el epidídimo. FSH posee actividad mitogénica y es responsable del crecimiento de los testículos, tiene un rol esencial en el desarrollo del testículo inmaduro, aunque existe controversia acerca de si FSH es esencial para el mantenimiento de la espermatogénesis adulta. Esta hormona incrementaría el número de espermatogonias y estimularía la subsiguientes etapas de la maduración incluyendo la reducción del espermatocito hasta llegar a espermátida y podría evitar la degeneración de los espermatocitos y espermatogonias posiblemente manteniéndolas unidas a las células de Sertoli. Existen muchas etapas donde FSH y testosterona actúan cooperativamente. La primera se relaciona con el citoesqueleto de las células de Sertoli y la asociación de estas con las células germinales. La FSH afecta la distribución de actina-f y vinculina, favoreciendo la unión mediada por testosterona de las células de Leydig a la línea germinal. En segundo lugar, la FSH estimula la síntesis del receptor de andrógenos. En tercer lugar, FSH estimula la espermiogénesis al incrementar la concentración local de testosterona dentro del testículo y del epidídimo mediante la producción de ABP (Kerr and Sharpe 1985, McLachlan *et al* 1996).

E) Tirotrófina (TSH) :

Cómo se mencionó anteriormente TSH es una hormona glicosídica emparentada con LH, FSH y CG. En el humano, el gen que codifica para la cadena β se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 y su producto génico consiste de tres exónes separados por dos intrones. Esta cadena posee una secuencia leader de 20 aminoácidos hidrofóbicos, seis puentes disulfuro y además posee un 80 a 89 % de homología con las cadenas β de TSH de rata, ratón y bovino (Dracopoli *et al* 1986, Wondisford *et al* 1988).

Las diferentes formas de esta hormona probablemente se deban a diferencias en el procesamiento postraduccional y almacenamiento, siendo esta variedad de formas la que produce discordancias en los resultados de medición de la cantidad de hormona inmunoensayable. En algunos casos de hipotiroidismo se han en-

contrado aumentos en la cantidad de ácido siálico y en otros de la subunidad β de TSH, mientras que, en algunos adenomas hipofisarios secretores de TSH se han encontrado aumentos en la subunidad α circulante (Faglia *et al* 1983, Miura *et al* 1989, Magner *et al* 1992).

La hipofisis humana contiene de 100 a 150 μg de TSH y secreta de 50 a 200 $\mu\text{g}/\text{día}$, siendo su nivel sérico de 0,4 a 3,8 $\mu\text{UI}/\text{ml}$. El nivel sérico en la rata es de 2 a 8 ng/ml . Es secretada en forma pulsátil con picos de baja amplitud y también se secreta siguiendo un ritmo circadiano donde el mayor nivel plasmático se presenta durante la noche, comenzando a disminuir en las primeras horas de la mañana y permaneciendo bajo durante el día hasta las 20 hs en que se vuelve a incrementar. La vida media de esta hormona tanto para el humano como para la rata es de 50 a 55 min con una cinética de desaparición monoexponencial. Su catabolismo tiene lugar en hígado y riñón. (Döhler *et al* 1977, Parker *et al* 1987, De Nicolao *et al* 1993).

La TSH ejerce diversas funciones sobre la glándula tiroides al actuar sobre receptores específicos de membrana y desencadenar una serie de eventos agudos y otra serie de eventos lentos. El receptor de TSH de peso molecular de alrededor 280 kDa está constituido por dos componentes formados por una glicoproteína y un gangliósido que al interaccionar con TSH produce la captación de Ca^{+2} y aminoácidos y activa la adenilato ciclasa que llega al máximo de actividad en 5-10 min. de la activación del receptor. El AMPc generado activa la proteinquinasa A responsable tanto de eventos agudos (captación y organificación del yodo, secreción hormonal, oxidación de glucosa, respiración, etc.) como lentos (síntesis de proteínas, entre ellas el propio receptor de TSH, y ácidos nucleicos) pero no ejercería acción sobre el metabolismo de fosfolípidos. Además de la acción de TSH a través de la vía proteína G /adenilato ciclasa, se encontró también que esta hormona activa la vía proteína G/fosfolipasa C. Asimismo, tanto TSH como insulina, estimulan el aumento en la superficie de las células tiroideas de proteoglicanos, los cuales juegan un papel activo en el crecimiento, función y diferenciación celular al modular la actividad de factores de crecimiento tales como el FGF básico (Pisarev 1985, Shaver *et al* 1993, Emoto *et al* 1994).

5) CONTROL DE LA SECRECIÓN DE HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS:

La fig. I15 muestra la relación entre las células neurosecretorias del hipotálamo magnocelular en donde los axones de las células de los núcleos paraventricular y supraópticos (PVN y SON) terminan en la hipófisis posterior y las del hipotálamo parvicelular cuyos axones terminan en la eminencia media, como por ejemplo las neuronas del núcleo ventromedial (VMN) que secretan dopamina dentro de las venas porta hipofisarias.

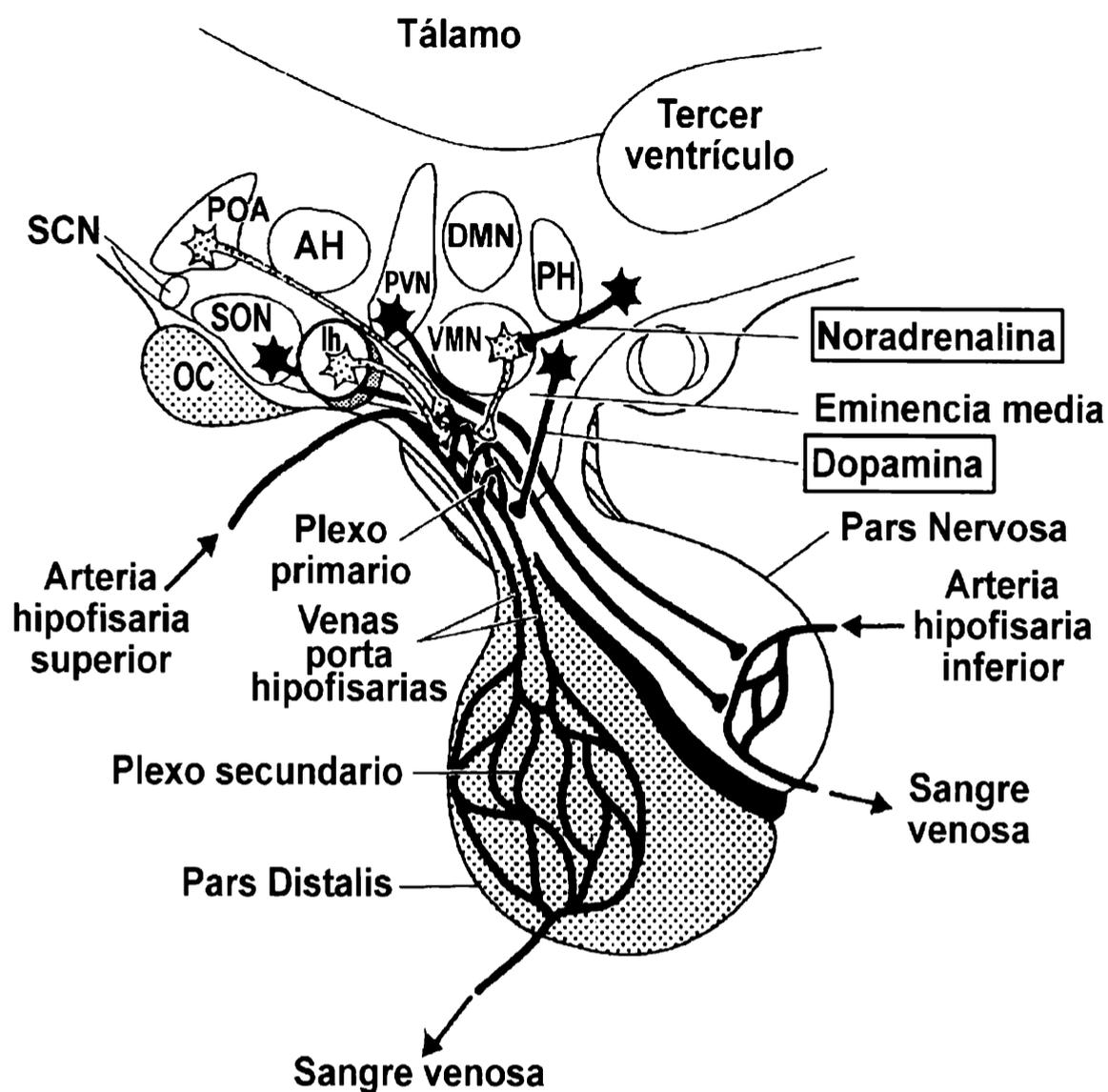


FIGURA 115: Localización de los núcleos y vías nerviosas del hipotálamo. Referencias : AH = hipotálamo anterior, DMN = núcleo dorsomedial, lh = hipotálamo lateral, oc = quiasma óptico, PH = hipotálamo posterior, POA = área preóptica, PVN = núcleo paraventricular, SON = núcleo supraóptico, VMN = núcleo ventromedial. (modificada de Hutchinson 1978).

Las células neurosecretorias del hipotálamo magnocelular y parvicelular están reguladas a través de neurotransmisores que se encargan de conectar el hipotálamo con las señales provenientes de receptores sensoriales, quimiorreceptores, barorreceptores, osmorreceptores, receptores para el dolor, cambio de temperatura, etc, así como de regiones cerebrales encargadas del control de los ritmos temporales, estados sueño-vigilia, etc. y de las respuestas emocionales (Hutchinson 1978).

Hay cuatro mecanismos diferentes por los cuales un neurotransmisor (por ejemplo 5-HT, DA y NA) pueden regular la liberación hormonal de la hipófisis (fig. 116) : 1) estimulación indirecta de la célula neurosecretoria a través de vías sensoriales o nerviosas provenientes de otras regiones del sistema nervioso central, como el sistema límbico o la médula espinal, que hacen sinapsis sobre una interneurona, la cual hace entonces sinapsis sobre la célula neurosecretoria, 2) directa axo-dendrítica o axo-somática sobre la célula neurosecretoria, 3) axo-axonal sobre la célula neurosecretoria, y 4) liberación directa del neurotransmisor sobre las venas porta hipofisarias (Hutchinson 1978).

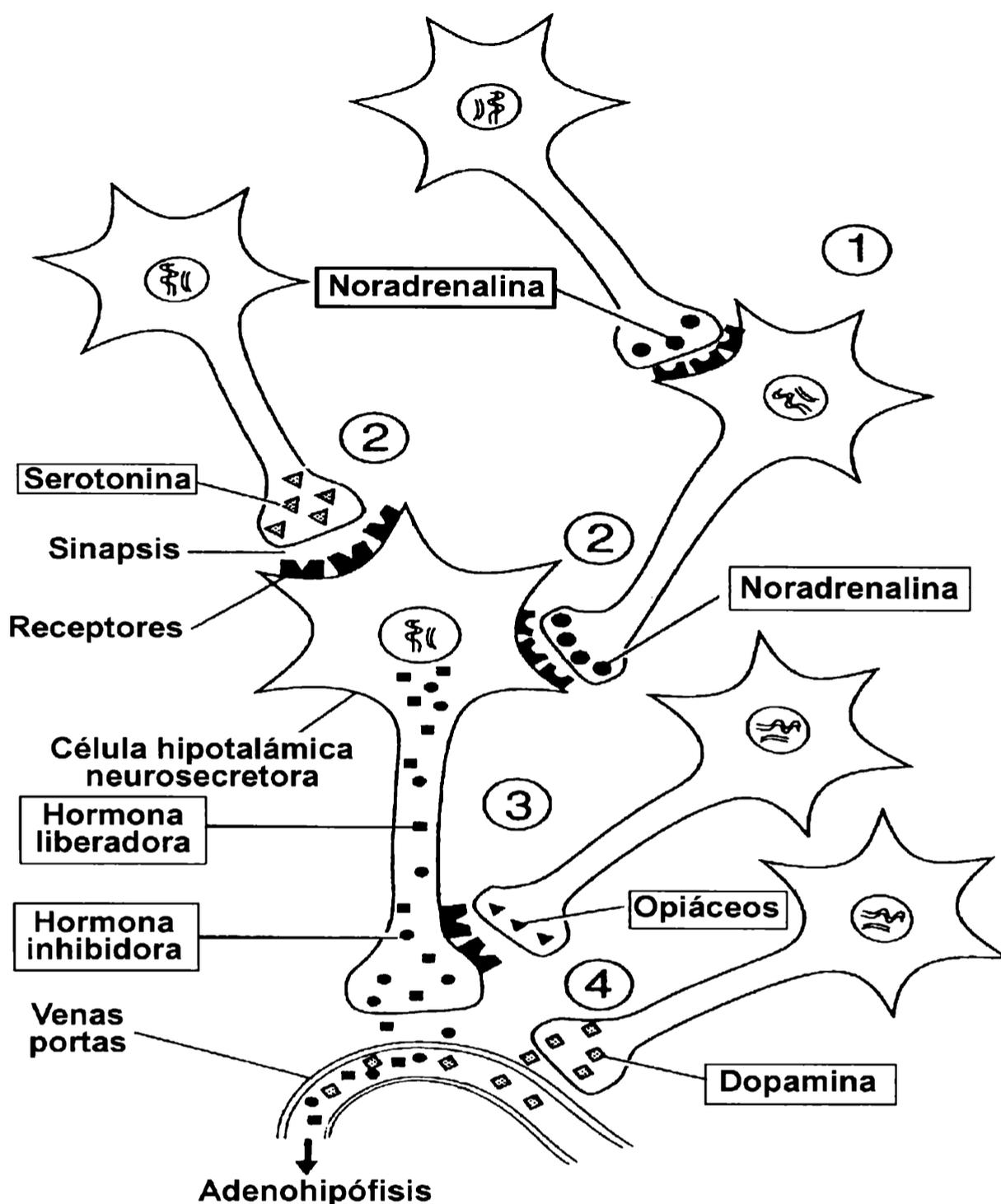


FIGURA I16: Cuatro posibles mecanismos por el cual los neurotransmisores pueden regular la secreción de la adenohipófisis. (Modificado de Hutchinson 1978).

La regulación de la secreción de hormonas adenohipofisarias es bastante compleja, por lo que se muestran los hallazgos mas relevantes :

A) Regulación de la liberación de ACTH y β -endorfina

La fig. I17 muestra la variedad de neurotransmisores que regulan la secreción de ACTH estimulada por CRH. La secreción de CRH y ACTH es pulsatil y además muestra un ritmo circadiano relacionado con los ciclos luz-oscuridad o sueño-vigilia. Este ciclo circadiano de liberación de CRH y ACTH, así cómo también la liberación inducida por el estrés está estimulada por la serotonina (5-HT).

Noradrenalina (NA) y adrenalina (A) inhiben la liberación basal de CRH al actuar sobre los receptores α -adrenérgicos de las células neurosecretoras de CRH. Dopamina (DA) también inhibe la liberación de CRH. Pero, por el contrario, bajo condiciones estresantes, A y NA liberados por la médula adrenal o por neuronas hipotalámicas directamente sobre el sistema porta-hipofisario, actúan directamente sobre los receptores α_1 - o β -adrenérgico de las células corticotrofas produciendo la liberación de ACTH. Acetilcolina (Ach) estimula la liberación basal e inducida por estrés de CRH y por lo tanto de ACTH, por actuar sobre los receptores nicotínicos y muscarínicos de las neuronas productoras de CRH. El ácido γ -aminobutírico (GABA) y los córticoesteroides inhiben la liberación de CRH y ACTH inducidas por el estrés. Histamina y vasopresina estimulan la liberación de ACTH por las células corticotrofas (Buckingham 1981, Simpkins *et al* 1985, Steger and Morgan 1985, Müller and Nistico 1989).

La liberación de β -endorfina y péptidos relacionados está estimulada por 5-HT y NA e inhibida por GABA (Müller and Nistico 1989).

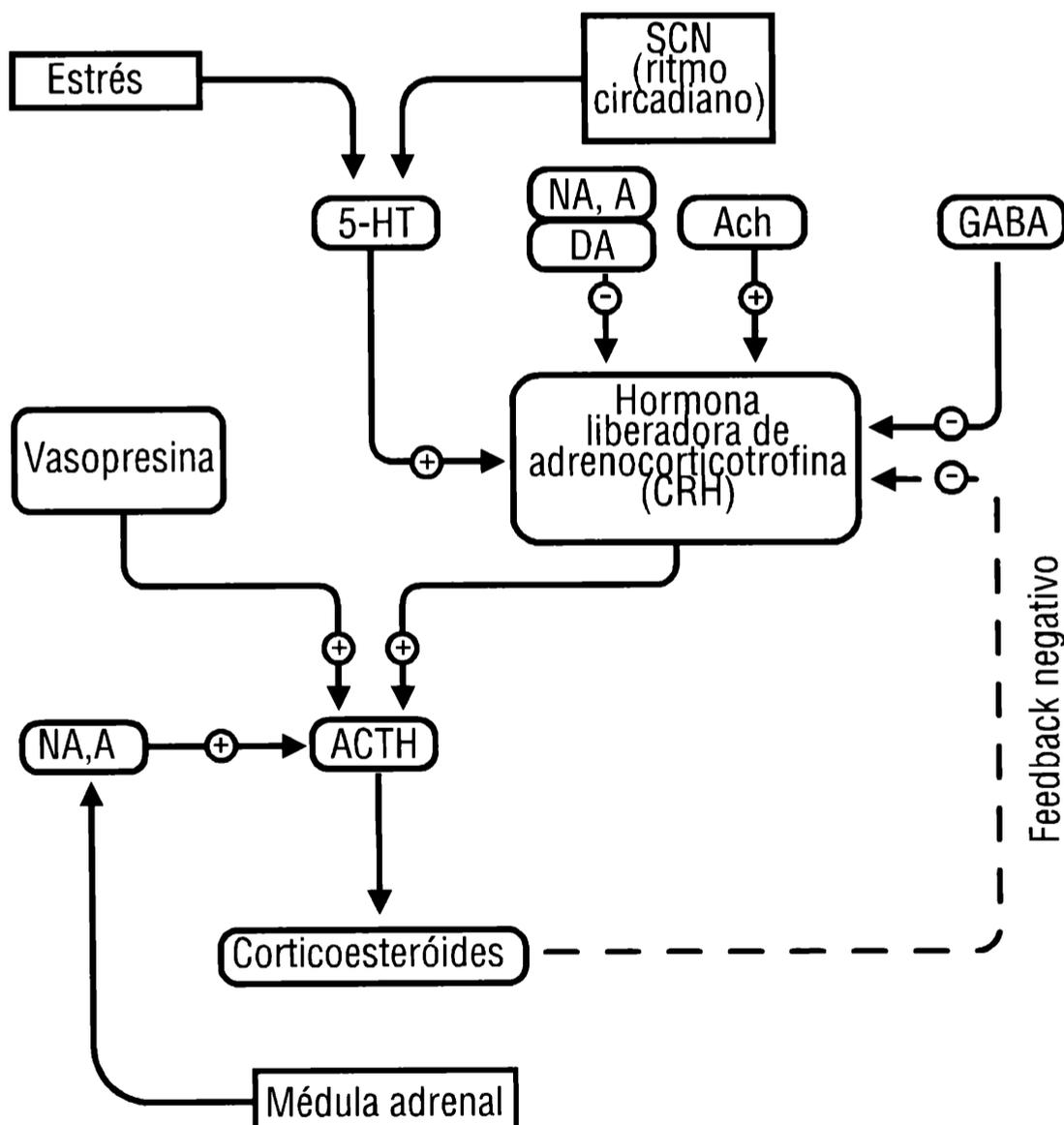


FIGURA I17: Control de la secreción de ACTH. SCN = núcleo supraquiasmático.

B) Regulación de la liberación de GH

La liberación de GH está regulada por la acción de dos hormonas antagónicas (fig. I18) : la hormona estimuladora de la liberación de GH (GHRH) y somatostatina que estimula o inhibe respectivamente la liberación de GH. DA y NA estimulan la liberación de GH porque estimulan la producción de GHRH al actuar sobre los receptores α_2 -adrenérgicos e inhiben la secreción de somatostatina por acción sobre los receptores β - adrenérgicos. 5-HT estimula la secreción basal de GH y la estimulada por el sueño, el estrés y el ejercicio al estimular la liberación de GHRH y de catecolaminas que a su vez también estimulan la liberación de GHRH e inhiben la de somatostatina. Ach estimula la liberación de GHRH e inhibe la de somatostatina a través de receptores muscarínicos.

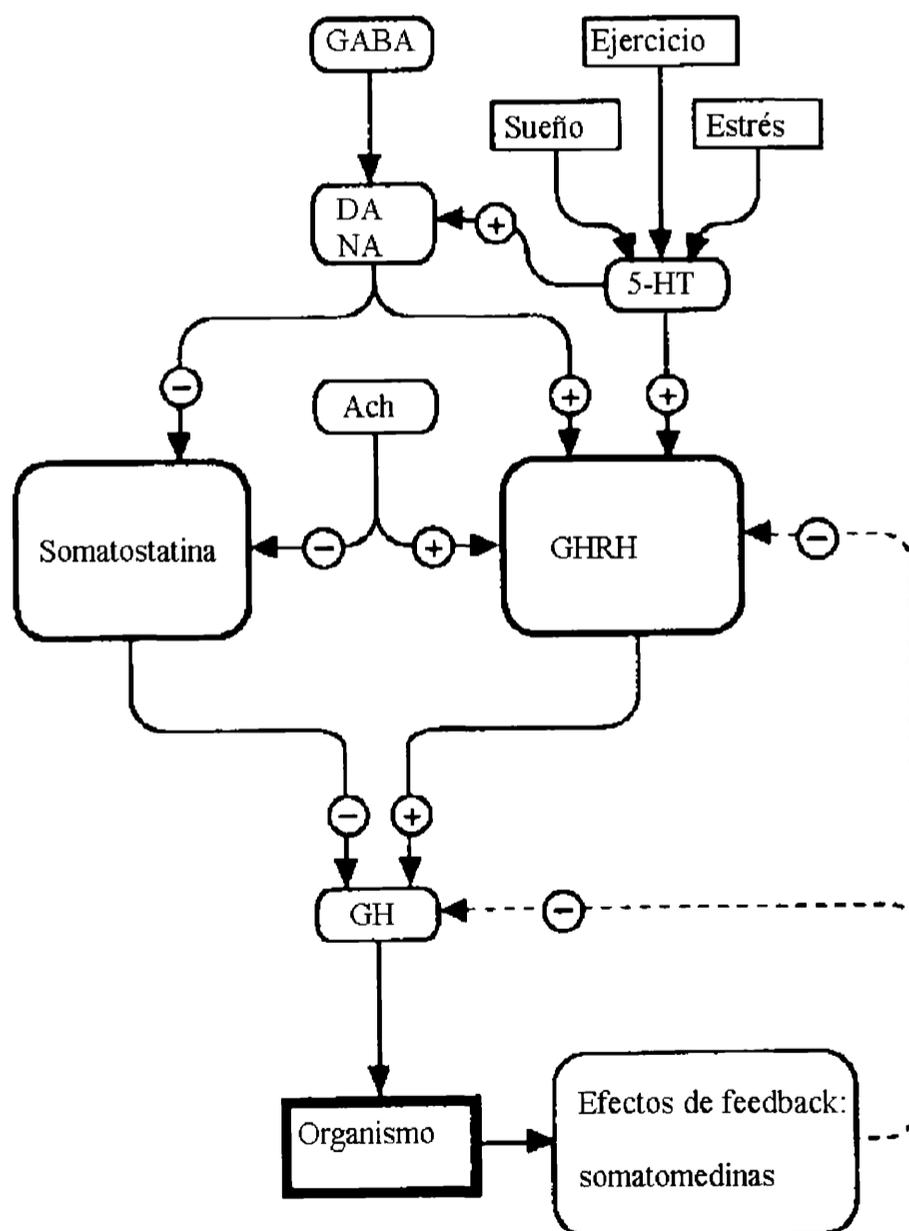


FIGURA I18: Regulación de la secreción de GH.

Dependiendo de las condiciones, GABA puede estimular o inhibir en forma indirecta la liberación de GH al regular la acción de las neuronas dopaminérgicas. Las somatomedinas ejercerían un efecto inhibitorio de la secreción de tanto GH como GHRH (Simpkins *et al* 1985, Steger and Morgan 1985, Müller and Nistico 1989).

C) Regulación de la secreción de PRL

La secreción de PRL es controlada por una serie de factores excitatorios e inhibitorios (fig. I19). El factor inhibidor primario es la DA, la cuál es liberada dentro de las venas portahipofisarias. NA y A pueden inhibir la secreción de DA a través de los receptores α -adrenérgicos pero estimularla a través de los receptores β -adrenérgicos, lo que depende de la dosis. La serotonina podría ser la responsable de la liberación de PRL inducida por estrógenos, estimulación cervical, estrés y succión de la glándula mamaria causando la inhibición de la secreción de DA y estimulando la secreción del péptido intestinal vasoactivo (VIP). El VIP estimula la liberación de PRL.

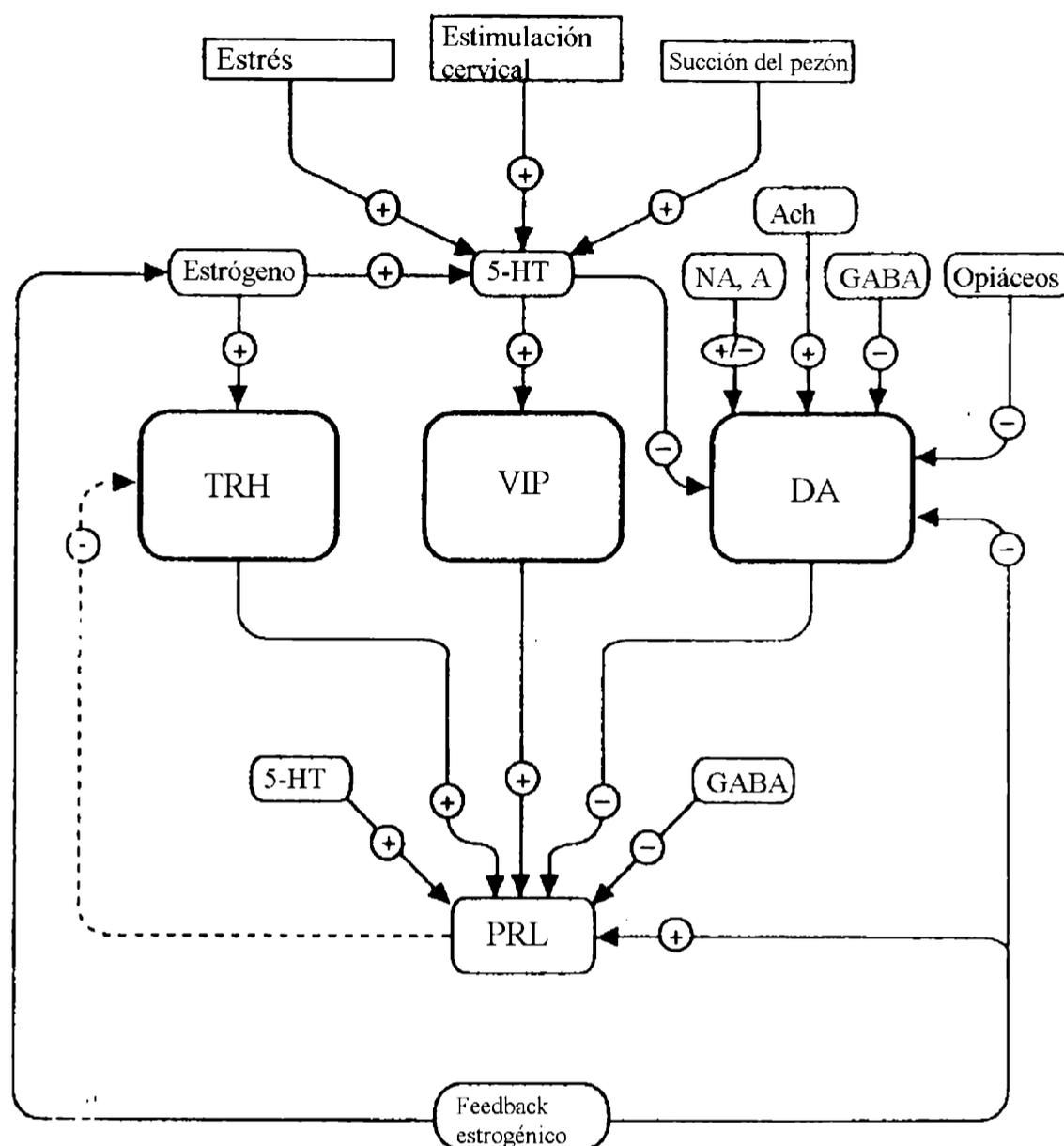


FIGURA I19: *Control de la liberación de PRL.*

La Ach inhibe la liberación de PRL por estimular la liberación de DA. Grandes dosis de GABA estimulan la liberación de PRL, pero pequeñas dosis la inhiben. Existe evidencia de que el GABA inhibe la liberación de DA al actuar sobre el hipotálamo, pero al actuar sobre las prolactotrofas inhibe la síntesis de PRL. Los opiáceos estimulan la secreción de PRL al inhibir la secreción de DA. El TRH estimula la liberación de PRL y los neurotransmisores que modifiquen su liberación, afectan la liberación de PRL. Histamina y 5-HT pueden estimular en forma directa la liberación de PRL. Los estrógenos estimulan en forma directa la liberación de PRL, también estimulan la liberación de TRH e inhiben la de DA (Racagni *et al* 1982, Simpkins *et al* 1985, Grandison 1985, Müller and Nistico 1989).

D) Regulación de la secreción de LH y FSH

La fig. I20 muestra algunas de las sustancias involucradas en la secreción de gonadotrofinas. La influencia exacta de cada una es difícil de dilucidar debido a

las dependencias con la especie, sexo, variaciones estacionales, momento en el ciclo reproductivo de la hembra, etc. La secreción basal de gonadotrofinas está estimulada por la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH o LHRH) producida en el hipotálamo medio basal (MBH) y el pulso preovulatorio en la hembra por GnRH producido por neuronas del POA, las cuales están controladas por el mecanismo de relojería del SNC y otras regiones extrahipotalámicas. La serotonina inhibe la secreción de GnRH por el MBH, pero estimula la secreción de GnRH por el POA. La 5-HT proveniente del SNC sería la responsable del pico preovulatorio de GnRH. La serotonina tendría poca o ninguna influencia sobre la liberación de FSH. El efecto de las catecolaminas depende de la presencia de hormonas ováricas. En la hembra, cuando el nivel de estrógenos-progesterona es alto, DA estimula la liberación de LH, en caso contrario la inhibe. De igual forma, NA estimula la liberación de LH y FSH en presencia de esteroides gonadales y la inhibe en su ausencia. Los pulsos de estrógenos facilitarían la liberación de NA y el aumento de receptores α -adrenérgicos.

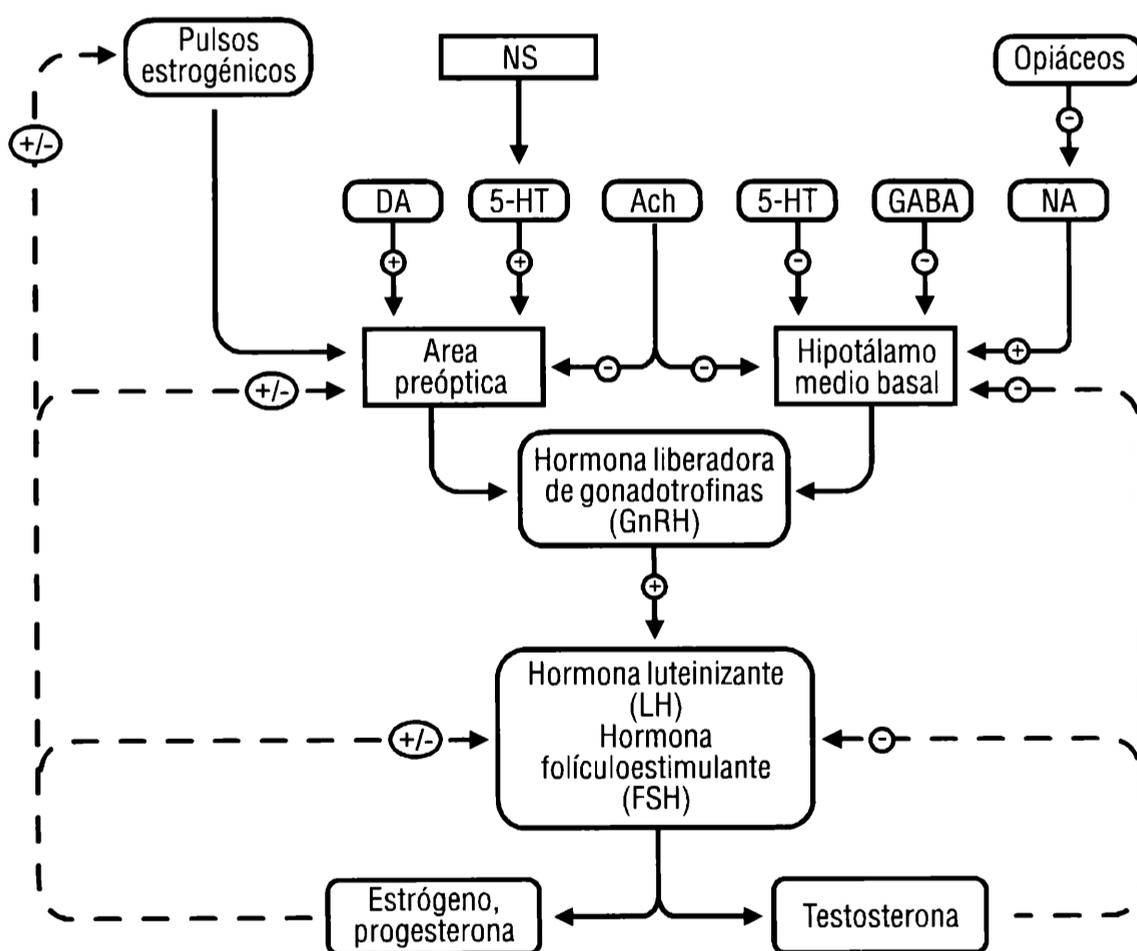


FIGURA I20: Control de la liberación de gonadotrofinas.

En el macho los efectos de DA y NA son contradictorios, pero podrían estar involucrados en el feedback negativo de testosterona sobre la liberación de GnRH. ACh y GABA inhiben la liberación de LH y FSH. Los opiáceos inhiben la liberación de LH y FSH por inhibir la liberación de NA. Histamina estimula la liberación de LH en presencia de estrógenos en la hembra, pero inhibe la liberación de LH en el macho. Inhibina inhibe la liberación de FSH (Simpkins *et al*

1985, Steger and Morgan 1985, Müller and Nistico 1989, Weiss and Jameson 1993).

E) Regulación de la secreción de TSH

La liberación de TSH esta controlada (fig. I21) por TRH que al ser liberado por el DMN estimula la liberación de TSH y por somatostatina que liberada por el POA inhibe la liberación de TSH. DA reduce el nivel basal de TSH e inhibe la liberación de TSH inducida por frío a través de dos mecanismos : por inhibición de la liberación de TRH en hipotálamo e inhibiendo la liberación de TSH directamente a nivel de la célula tirotrofa. A y NA estimulan la liberación basal y la estimulada por frío de TSH, mientras que Ach sólo estimula la liberación de TSH inducida por frío. El rol de la 5-HT no esta claro, en presencia de las hormonas tiroideas inhibe la liberación de TSH, pero en su ausencia la estimula, aunque es posible que esté involucrada en los efectos de feedback negativo producido por las hormonas tiroideas a nivel hipotalámico. Histamina estimula la liberación de TRH, mientras que GABA y encefalinas la inhiben. El estrés inhibe la secreción de TSH por estimular la secreción de somatostatina e inhibir la secreción de TRH. Las hormonas tiroideas inhiben tanto la secreción de TRH cómo la de TSH (Kulich 1979, Bennett and Whitehead 1983, Jimenez and Walker 1985, Müller and Nistico 1989).

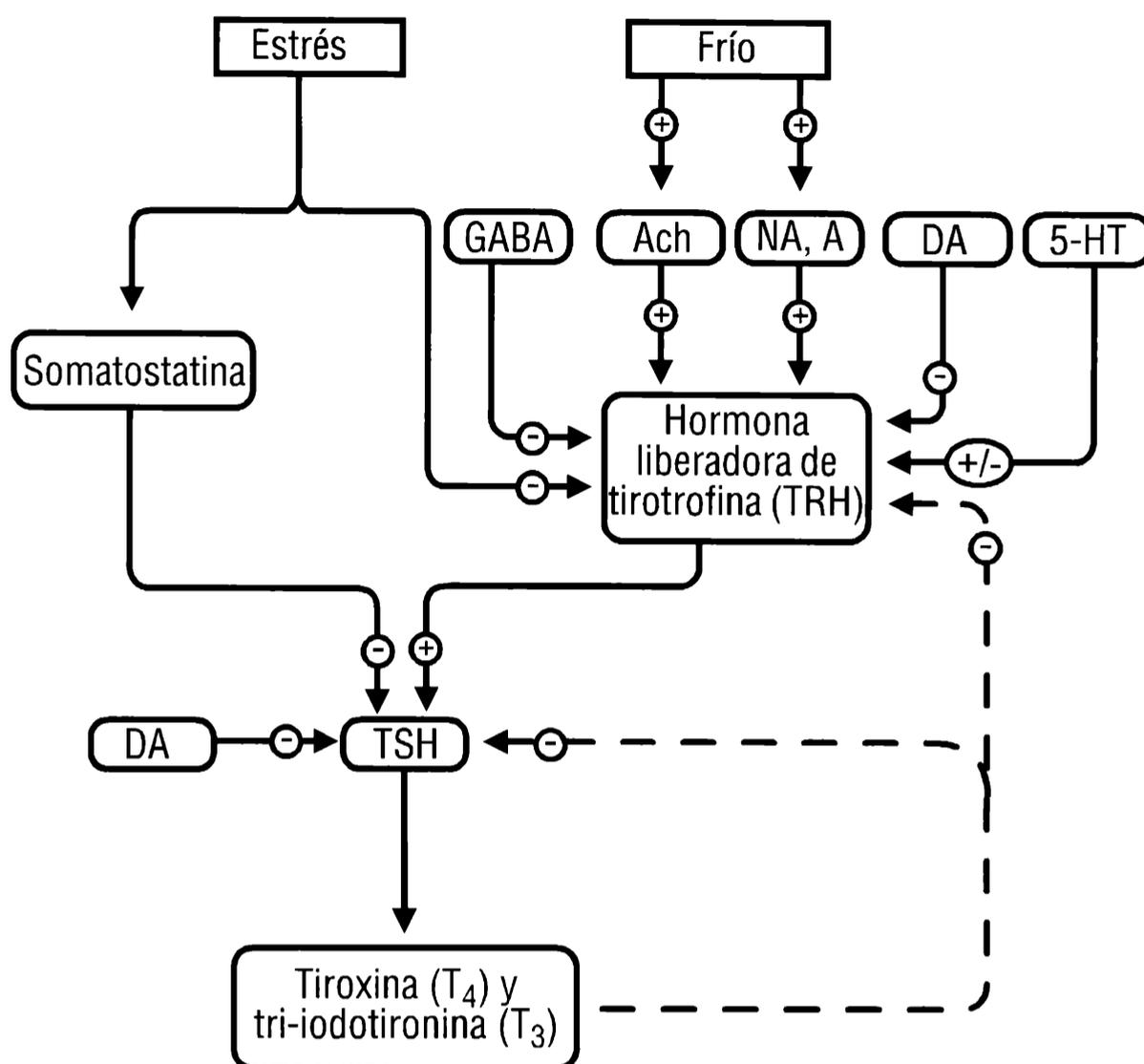


FIGURA I21: Control de la liberación de TSH.

6) FACTORES HIPOFISOTROPOS

El avance de la neuroendocrinología condujo a la caracterización de la secuencia aminoacídica de las hormonas liberadoras hipotalámicas, la generación de anticuerpos para estudios inmunohistoquímicos y de RIA, permitiendo conocer la localización específica y el contenido de las áreas hipotalámicas que los secretan. También se avanzó en el estudio de la regulación del eje hipotálamo-hipofisario lesionando o estimulando diversas áreas cerebrales. Actualmente, con el advenimiento de las técnicas de biología molecular se está estableciendo el estudio del control de la transcripción y traducción de estas sustancias.

A) Hormona liberadora de corticotrofina (CRH):

La principal función de CRH es regular la liberación de ACTH pero también tiene un cierto papel en la regulación de la liberación de GH, la función reproductiva, el comportamiento y el sistema inmune. Esta hormona polipeptídica de 41 aa posee una secuencia altamente conservada en la escala zoológica siendo idéntica

ticas las moléculas de rata y humanos (*Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Glu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-IleNH₂*). La actividad biológica reside en el extremo carboxiterminal 15-41 (en subrayado), pero los primeros 9 aa del extremo N-terminal son necesarios para la unión al receptor (en itálica). Las neuronas secretoras de CRH se localizan en el PVN del hipotálamo y proyectan sus axones a la eminencia media. En ésta región se colocaliza vasopresina, la cual posee acción secretagoga de ACTH y potencia los efectos de CRH; también se colocalizan oxitocina, encefalina, dinorfina y neurotensina, pero sus papeles en la secreción de CRH son poco claros. En general el ARNm de CRH se encuentra en los cuerpos celulares, mientras que la mayor parte de CRH y proCRH se encuentra en los axones. El gen de proCRH consta de dos exones y posee múltiples sitios de iniciación. La fig. I22 esquematiza el procesamiento de CRH. La síntesis y secreción de CRH está regulada por la PKA y parcialmente por la PKC. Las neuronas CRH-érgicas del PVN poseen ritmicidad y son reguladas por el feedback negativo de los glucocorticoides, la ACTH y el mismo CRH. Los glucocorticoides inhiben la producción de ARNm de proCRH. El receptor de CRH está acoplado a la adenilato ciclasa y el incremento de AMPc conduce a la síntesis de POMC y secreción de ACTH. El efecto inhibitorio de CRH sobre la liberación de GH está mediado por un aumento en la liberación hipotalámica de somatostatina. La supresión que ejerce CRH sobre la función reproductiva se debe a la inhibición de la liberación de LH posiblemente por estimular la producción de opioides que inhiben la liberación hipotalámica de GnRH (Rondeel and Jackson 1993).

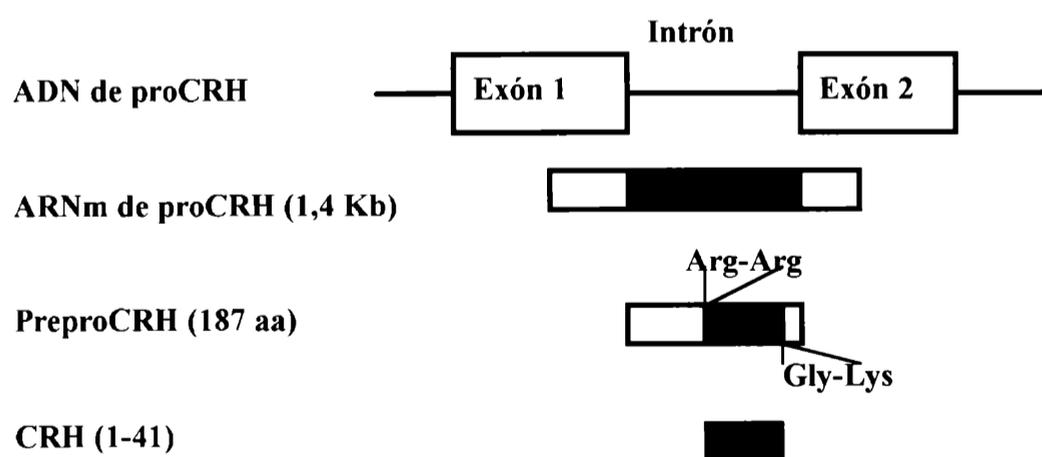


FIGURA I22: *Procesamiento de CRH.*

B) Hormona liberadora de tirotrófina (TRH):

Este tripéptido estimula la liberación de TSH y PRL. La liberación de éstas hormonas mediada por el TRH se efectúa a través de la vía de los fosfoinositósidos. Los mayores efectos de TRH sobre las tirotropas se producen sobre la glicosilación

y liberación de TSH y en menor medida sobre su síntesis. Su localización es ubicua, pero la localización hipofisotropa está confinada al PVN. La hormona posee una secuencia pGlu-His-ProNH₂ donde la Gln está ciclizada por acción de la glutamilciclase a ácido piroglutámico (pGlu) y la Pro está amidada por la acción de la peptidil α -amidante monooxigenasa, que lo protege químicamente de la degradación en ambos extremos. La secuencia de proTRH posee 2,6 Kb y está constituida por tres exones y dos intrones (fig. I23). Este gen codifica para una proteína progenitora de 255 aminoácidos para la rata (242 para humanos) que posee cinco copias de TRH y siete fragmentos crípticos, cada uno de los cuales está flanqueado por sitios de clivaje compuestos por pares de aa básicos. El grado homología entre las proteínas progenitoras de rata y humana es de un 50 %. Las hormonas tiroideas suprimen la síntesis del ARNm de proTRH (aunque el mayor efecto de las hormonas tiroideas se ejerce en la hipófisis a nivel de la liberación de TSH) (Rondeel and Jackson 1993).

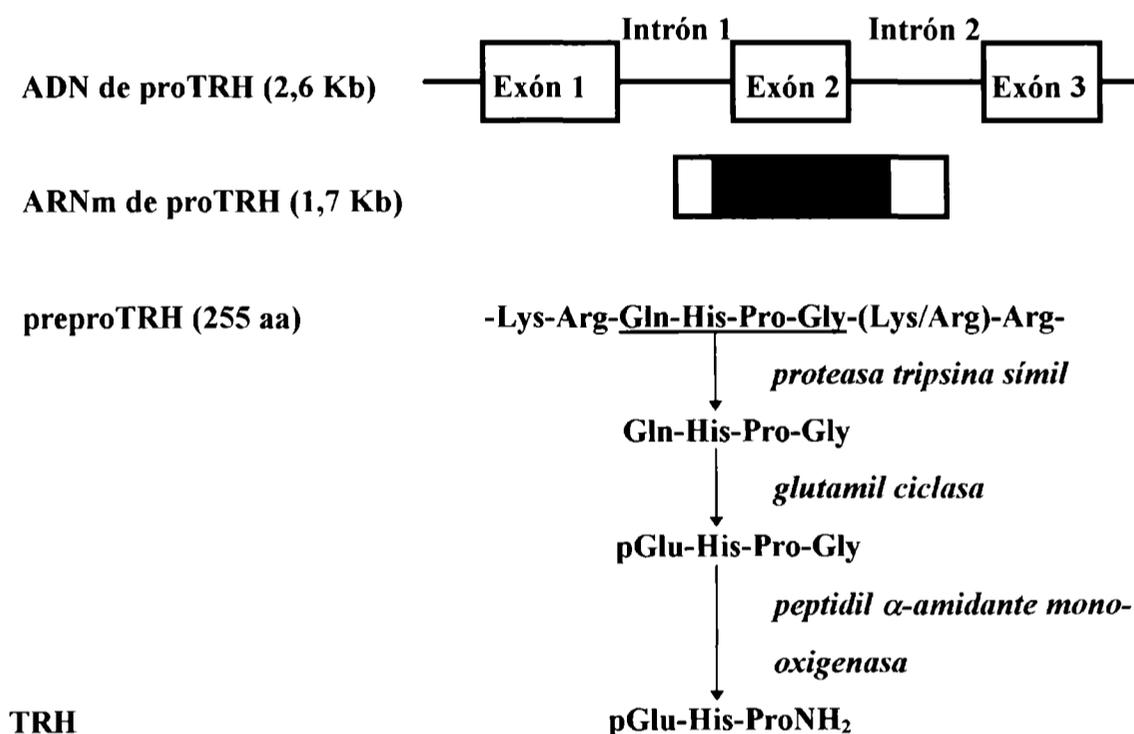


FIGURA I23: *Procesamiento de TRH.*

C) Hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) o hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH):

Esta hormona estimula la síntesis, glicosilación y liberación tanto de LH como de FSH, pero los efectos sobre la última hormona son menos marcados. Su acción está acoplada a la vía del inositoltrifosfato y calcio calmodulina para la liberación de LH y PKC para la síntesis de LH, mientras que ambos mecanismos participan en su glicosilación. El GnRH es un decapeptido lineal de estructura altamente conservada durante la evolución, siendo idéntico en todos los mamíferos

(pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH₂), pero posee diversas conformaciones de las cuales la más plegada es la más afín por el receptor de GnRH. En los primates se sintetiza en el núcleo arcuato mientras que en la rata las neuronas hipotalámicas que contienen GnRH son escasas (1300 a 1500 neuronas) y están esparcidas difusamente en el hipotálamo anterior y área preóptica. El gen de proGnRH posee 4,5 Kb y consta de cuatro exones que además de codificar para un precursor de GnRH de 92 aa codifica para un péptido asociado a GnRH (GAP) de 56 aa el cual estimula la liberación de FSH e inhibe la de PRL en ciertos sistemas experimentales (fig. I24). En procesamiento de GnRH al igual que el de TRH intervienen la glutamil ciclasa y la peptidil α -amidante monooxigenasa. Los fenómenos de downregulation del GnRH involucran la fosforilación y dimerización del receptor de GnRH con el posterior desacople de la vía del inositoltrifosfato pero no de la PKC (Rondeel and Jackson 1993).

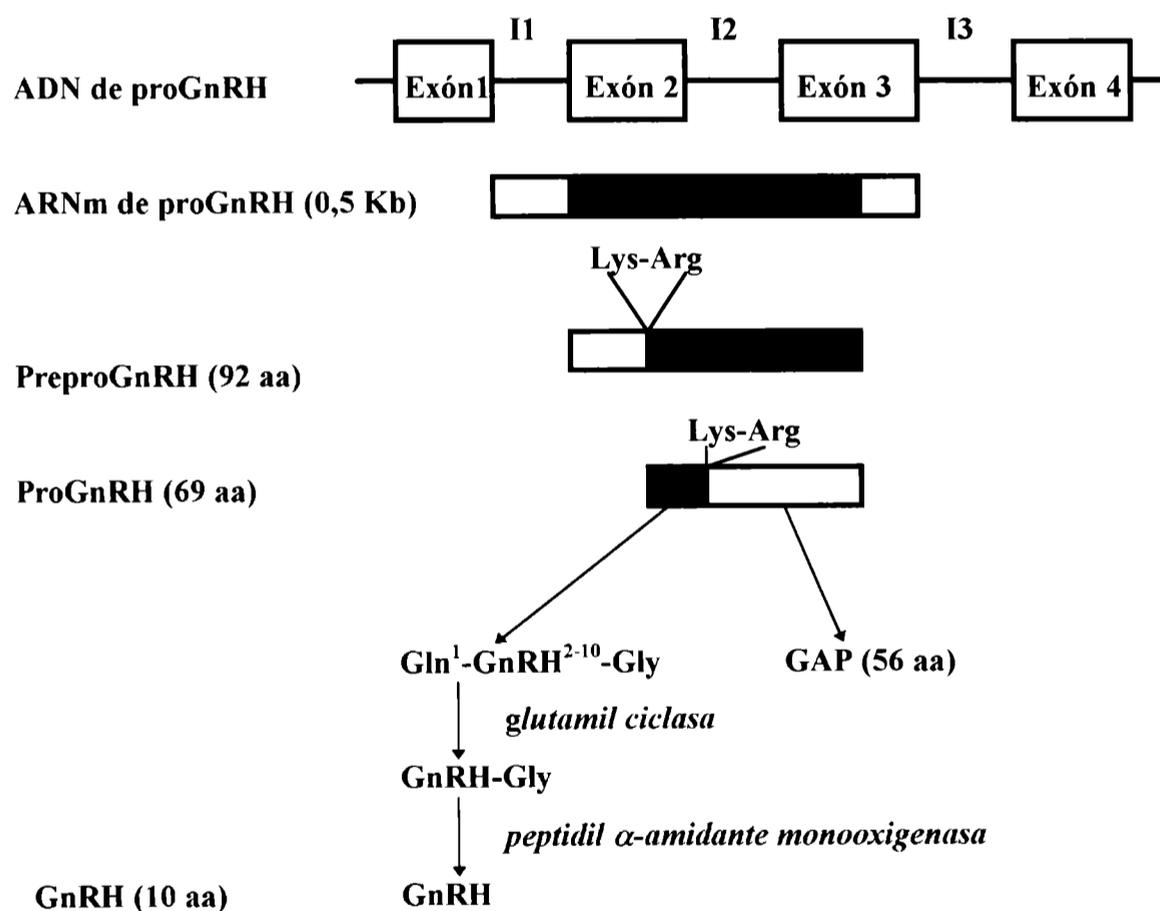


FIGURA I24: *Procesamiento de GnRH.*

D) Somatostatina u hormona inhibidora de la liberación de somatotrofina (SRIH):

La SRIH inhibe la liberación de GH y TSH debido a la activación de la proteína G₁ que conduce a la inhibición de la adenilato ciclasa y canales de calcio. Es un tetradecapéptido cíclico de estructura Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-

Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys con un enlace SS entre sus dos Cys constituyentes (en subrayado). La síntesis de esta hormona está ampliamente distribuída en el organismo; en hipotálamo se encuentra en el area periventricular. El gen para proSRIH tiene 1,2 Kb, dos exones y codifica para un precursor de 116 aa que es procesado en varias etapas, originando primero dos moléculas SRIH (1-64) y SRIH-28, éste último es clivado originando SRIH (1-12) y SRIH -14 (fig. I25). Los cortes del precursor se producen a nivel de aa dibásicos. El precursor está bastante conservado, sólo difiere en 4 aa entre el humano y la rata. SRIH-14 y SRIH-28 se cosecretan en la eminencia media pero el primero es el de mayor vida media (Rondeel and Jackson 1993).

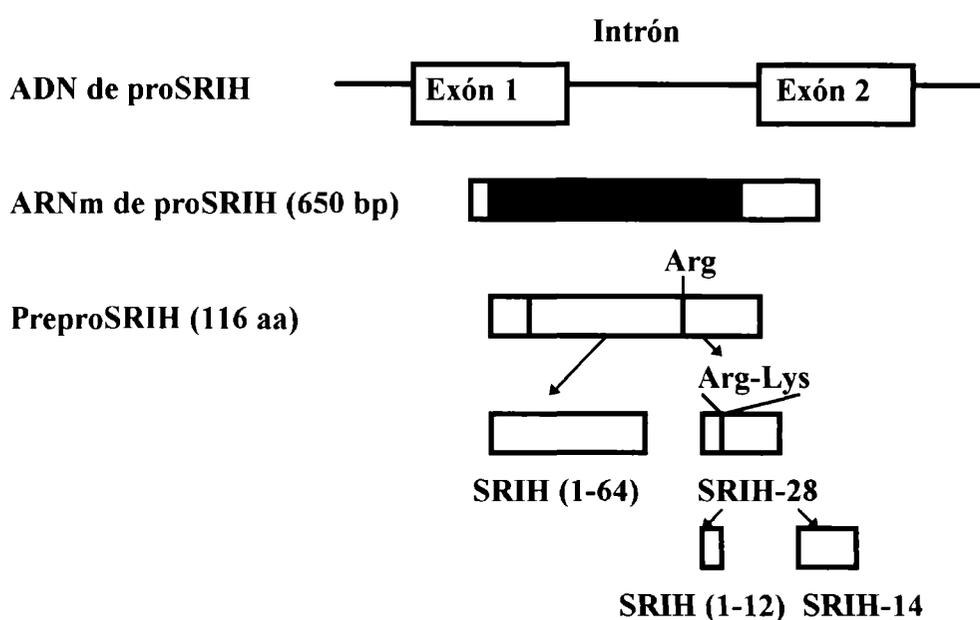


FIGURA I25: *Procesamiento de SRIH.*

E) Hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH):

Esta hormona estimula la transcripción del gen de GH y liberación de GH y afecta la proliferación y diferenciación celular conduciendo a hiperplasia de somato- y mamosomatotrofas. GHRH posee 43 aa en la rata (His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Arg-Ser-Arg-Phe-Asn) y la hormona humana se encuentra bajo 2 formas hGHRH (1-40)OH y hGHRH (1-44) NH₂ que presentan bastante homología con la murina.

Este polipéptido se produce en las neuronas laterales del núcleo arcuato. En la rata el gen de proGHRH tiene 10 Kb, cinco exones y 4 intrones y origina un precursor de 104 aa (107 el humano) que es procesado en forma secuencial (fig. I26).

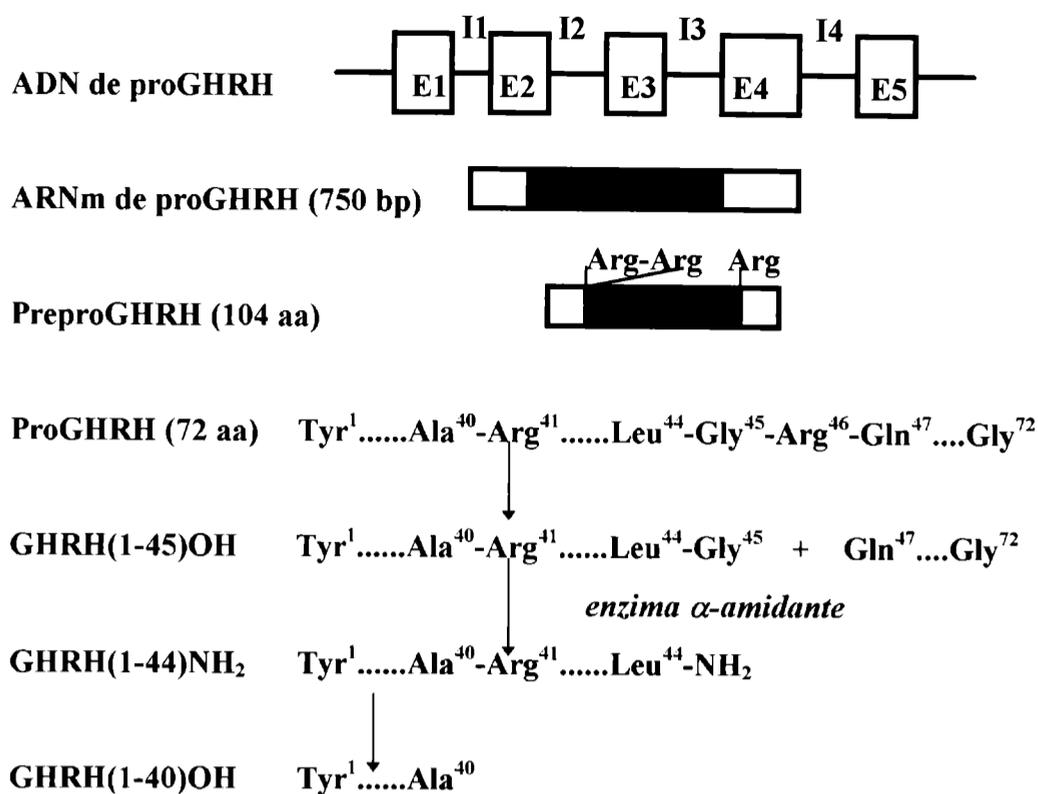


FIGURA I26: *Procesamiento de GHRH.*

GH produce feedback negativo a nivel de la expresión del gen de proGHRH (Rondeel and Jackson 1993).

TABLA I7 : *Péptidos liberadores de GH (Modificada de: Chen et al 1996)*

<u>NOMBRE</u>	<u>ESTRUCTURA QUIMICA</u>	<u>POTENCIA RELATIVA A GHRH IN VITRO</u>	<u>MECANISMO DE ACCION</u>
GHRP-6	His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	0,01-0,1	Causa un incremento en el calcio libre citosólico en dos fases, primero causa un aumento momentáneo debido a la liberación de sus reservorios y luego estimula el influjo de larga duración a través de canales de calcio en la membrana plasmática. No afecta directamente los niveles de AMPc, pero sinergiza el aumento de AMPc causado por GHRH. Estimula la liberación de GH mediada por la vía de PKC e IP ₃ . El IP ₃ sería el responsable de la liberación de calcio de sus reservorios intracelulares.
GHRP-1	Ala-His-D- β Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	0,1-1	Causa un influjo de calcio a través de canales de la membrana plasmática, la contribución de los reservorios intracelulares al aumento del calcio libre citosólico es extremadamente pequeña. Aumenta los niveles de AMPc en somatotropas ovinas (pero no de rata) y causa un aumento de AMPc y liberación de GH, que resultan aditivas al efecto de GHRH cuando se coincuban somatotropas ovinas con ambos péptidos. Estimula la PKC en somatotropas ovinas.
GHRP-2	D-Ala-D- β Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	1	Despolariza la membrana permitiendo la entrada de calcio a través de canales de calcio voltaje dependientes, el sodio no estaría involucrado y los canales de calcio podrían estar involucrados pero todavía no fueron totalmente caracterizados. No afecta los niveles de AMPc. Podría estar involucrada también la PKC.

Está bien establecido que la secreción de GH mediada por GHRH depende de la concentración intracelular de calcio libre. El influjo de calcio a través de ca-

nales de calcio voltaje dependiente está estimulado por GHRH e inhibido por SRIF, pero todavía no hay evidencias de que GHRH o SRIF afecten la movilización de calcio desde sus reservorios intracelulares. La activación de AMPc/PKA además de ser fundamental para la liberación de GH mediada por GHRH también estimula la transcripción del gen de GH (Rondeel and Jackson 1993, Chen *et al* 1996).

Se sintetizaron una serie de péptidos liberadores de GH (GHRPs) útiles para el estudio de la liberación de GH, algunos de los cuales se comenzaron a usar en estudios clínicos. Las propiedades de los tres principales GHRPs se resumen en la tabla I7 (Chen *et al* 1996).

CAPITULO 3: EL TIMO Y EL SISTEMA INMUNE. INTERCOMUNICACION ENTRE EL SISTEMA INMUNE Y EL ENDOCRINO

1) EL TIMO:

Este órgano de forma piramidal se localiza en el mediastino superior y alcanza su mayor peso en la pubertad siendo en el ser humano de unos 40 g y en la rata de unos 60 mg. El timo produce los linfocitos T a partir de células que provienen de la médula ósea bajo la influencia del microentorno creado por las células epiteliales tímicas y también posee funciones endocrinas.

El timo está dividido en lóbulos y cada uno de ellos se divide en lobulillos por medio de tabiques que se extienden desde la cápsula de tejido conectivo hasta el interior del órgano. Cada lóbulo se divide en una zona periférica llamada corteza rica en linfocitos y una zona central llamada médula rica en células epiteliales (fig. I27).

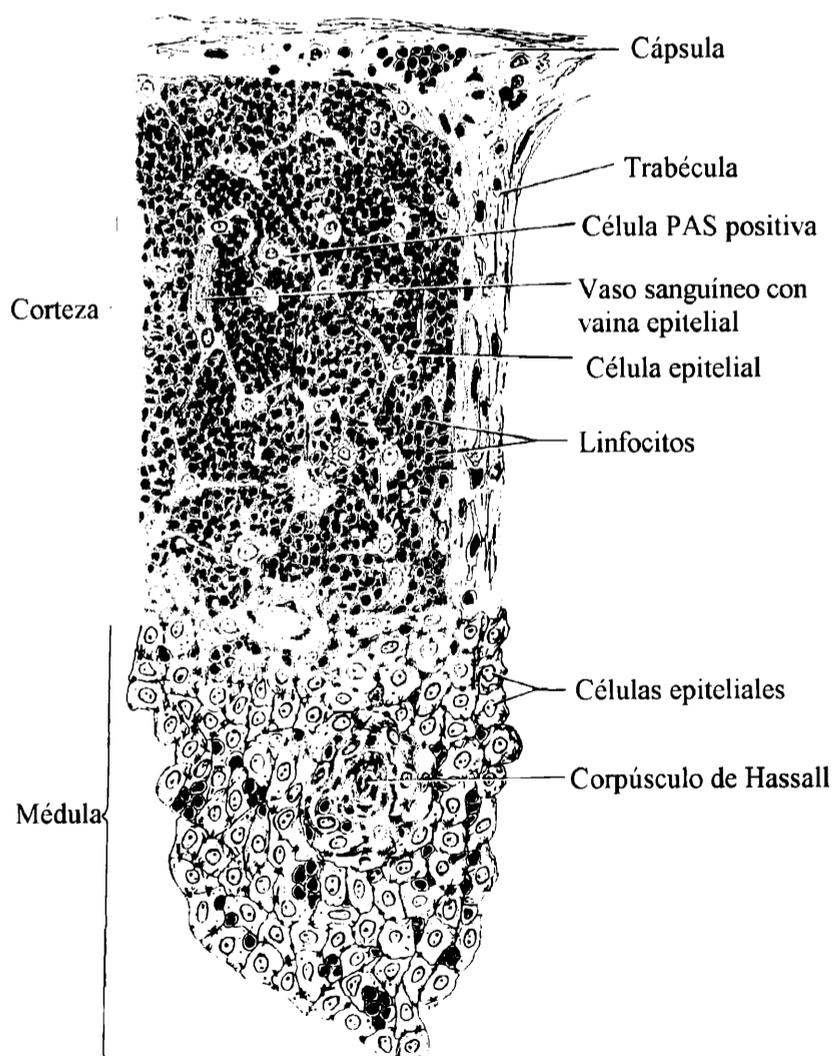


FIGURA I27: Estructura de un lóbulo tímico (Tomada de: Weiss 1982).

Las células epiteliales pueden adoptar diversas formas y la mayoría está en íntimo contacto con los linfocitos. Estas células están adheridas entre sí por medio de desmosomas, lo que les genera un aspecto ramificado o estrellado formando una malla en cuyos intersticios se alojan los linfocitos. Las células epiteliales tímicas son grandes, poseen núcleos y nucleólos muy voluminosos. Son células de naturaleza secretoria con retículo endoplasmático rugoso y golgi muy desarrollados y gran cantidad de gránulos de secreción. En las mismas células se colocan las hormonas tímicas timulina, timopoyetina y timosina α_1 cuyas funciones se discutirán mas adelante. Se desconoce si esta colocación se da también a nivel de los gránulos de secreción.

La cápsula está formada principalmente por tejido conectivo y posee un número variable de macrófagos, células plasmáticas, mastocitos y células adiposas. El tejido conectivo de la cápsula se prolonga al interior constituyendo los tabiques que separan los lóbulos y lobulillos. Por la cápsula y tabiques corren nervios y los vasos sanguíneos y linfáticos de mayor tamaño.

La médula está constituida por células epiteliales tímicas no muy separadas y conteniendo menos linfocitos que la corteza. La médula posee numerosos vasos sanguíneos y en su inmediación hay cierto número de plasmocitos, mastocitos, eosinófilos y monocitos. En ésta región se encuentran los corpúsculos de Hassall que están constituidos por células epiteliales dispuestas en forma concéntrica y muy apretada; se las considera estructuras en degeneración ya que su número y tamaño aumenta con la edad. Estos corpúsculos son escasos y de gran tamaño en el hombre y el cobayo; son mas numerosos en ratas y ratones.

La corteza está constituida por una gruesa capa de linfocitos y células epiteliales. Las células epiteliales adoptan formas muy ramificadas que generan un epitelio con disposición reticular. En éste lugar se diferencian los linfocitos y cómo muchos de ellos deben ser eliminados también se encuentra gran cantidad de macrófagos (Weiss 1982, Savino and Dardenne 1984).

2) EL SISTEMA INMUNE :

El sistema inmune consiste en un número de diferentes tipos celulares que incluyen: monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, granulocitos y células NK cuyo papel es reconocer lo propio de lo no propio (virus, bacterias, células malignas, etc.) eliminándolo con el fin de mantener la homeostásis del organismo. Este sistema se divide en dos ramas que actúan de formas diferentes pero complementarias: 1) el sistema inmune humoral que protege al organismo de los antígenos extracelulares mediante los anticuerpos producidos por linfocitos B y secretados al fluido extracelular, 2) el sistema inmune celular que protege al organismo contra

antígenos extracelulares, células extrañas y células alteradas (como las tumorales). Los principales componentes celulares del sistema inmune son :

A) Monocitos y macrófagos: los monocitos se desarrollan a partir de células de la médula ósea y viajan por el torrente sanguíneo a los tejidos donde maduran, convirtiéndose en macrófagos, los cuales se encargan de fagocitar agentes extraños para luego presentar los epitopes de esos antígenos a las células T; también producen interleuquinas.

B) Linfocitos T o células T: los precursores de los linfocitos T se generan en la médula ósea y viajan a través del sistema circulatorio para llegar al timo donde se diferencian a : T_h (helper), T_c (citotóxico) y T_s (supresor). Las células T_h producen citoquinas que afectan las funciones de otros linfocitos y la producción de anticuerpos, por eso la ausencia de timo afecta tanto la inmunidad celular como la humoral. Las células T_c destruyen células corporales infectadas por virus, células tumorales y células extrañas al organismo (como los trasplantes de tejidos). Las células T_s son capaces de suprimir la respuesta inmune por inhibir las acciones de las células T_h y T_c . La maduración, diferenciación y proliferación de las células T en el timo, está regulada por hormonas tímicas y por el microambiente del timo. Luego de que las células T maduran, se almacenan en los órganos linfoides secundarios (por ejemplo bazo, placas de Peyer, etc.) hasta que se distribuyan mediante la circulación a través del organismo.

C) Linfocitos o células B: los precursores de estas células se producen y maduran (en los mamíferos) en la médula ósea. Los linfocitos B producen anticuerpos que detectan sus antígenos específicos y lo neutralizan.

D) Células asesinas naturales (NK): se generan en la médula ósea, se almacenan en los órganos linfoides secundarios y circulan por el torrente sanguíneo. Las células NK pueden eliminar espontáneamente células infectadas por virus y células tumorales. Producen interferón γ .

E) Granulocitos: son células maduras que se generan en médula ósea y circulan en la sangre. Se dividen en tres grupos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los neutrófilos destruyen células muertas, bacterias y otras células extrañas por fagocitosis. Los eosinófilos destruyen parásitos y modulan la actividad inflamatoria de tejidos dañados. Los basófilos destruyen parásitos por fagocitosis y están involucrados en las reacciones de hipersensibilidad por su capacidad de secretar histamina.

Todas éstas células constituyen una red interrelacionada que contribuye a mantener la homeostásis corporal (Hamblin 1988).

TABLA 18 :Ejemplos de algunas citoquinas, su fuente celular y función (Modificada de: Burke et al 1993).

<u>CITOQUINA</u>	<u>FUENTE CELULAR PRINCIPAL</u>	<u>FUNCION</u>
INTERFERON γ (IFN γ)	Células T activadas	Activa los macrófagos, facilita la proliferación y diferenciación de células B y síntesis de IL-2
INTERLEUQUINA (IL) 1 (L-1 α E IL-1 β)	Macrófagos, células B, T, NK, fibroblastos, etc.	Facilita la activación y proliferación de células B y T. Facilita la síntesis de prostaglandinas, IFN γ , IL-2, IL-3, IL-4. Causa inflamación y fiebre
IL-2	Células T activadas	Estimula la proliferación de células B, T y NK. Activa células T _c
IL-3	Células T activadas y macrófagos	Estimula el crecimiento y diferenciación de células derivadas de la línea hematopoyética
IL-4	Células T activadas y macrófagos	Estimula proliferación de células B y T, diferenciación de células B y activa macrófagos
IL-5	Células T activadas	Estimula proliferación de células B y producción de anticuerpos
IL-6	Células T y B activadas, monocitos, fibroblastos, etc.	Estimula proliferación de células B. Activa células T. Induce fiebre e inflamación
IL-7	Médula ósea, timo y bazo	Estimula la producción de precursores de células B y T
IL-8	Monocitos, células endoteliales y fibroblastos	Quimiotaxis de neutrófilos y células T
IL-9	Médula ósea	Estimula la hematopoyesis
IL-10	Células T _h	Inhibe la síntesis de IFN γ en las células T _h
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)	Macrófagos y células B y T	Destruye células tumorales, media las reacciones endotóxicas, inhibe la ingesta de alimentos y causa caquexia
LINFOTOXINA (LT) O TNF β	Células T activadas	Destruye células tumorales
FACTORES ESTIMULANTES DEL CRECIMIENTO DE COLONIAS (CSFs) (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, etc.)	Fibroblastos y monocitos	Estimulan el crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas

Las citoquinas son mensajeros de naturaleza proteica, esenciales para el desarrollo de los tipos celulares mencionados y el montaje de la respuesta inmune.

Las citoquinas mas relevantes y su función se indican en la tabla 18.

En la activación de las células T están involucradas una serie de citoquinas (fig. I28). La célula presentadora de antígenos (APC) (monocitos, macrófagos, etc.) detecta el antígeno en el organismo y lo ataca destruyéndolo por fagocitosis y digestión celular y luego presenta sus restos antigénicos unidos a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a los receptores de células T_h o T_c . El macrófago activado por el antígeno también secreta IL-1 que estimula a la célula T_h . La estimulación conjunta de la célula T_h por el antígeno presentado por el MHC y IL-1 estimula la liberación de IL-2 la cual aumenta el número de receptores de IL-2 sobre el linfocito T_h , /la proliferación de células T_h y T_c , producción de anticuerpos por las células B y producción de $INF\gamma$ por las célula T_h . El $INF\gamma$ a su vez estimula la síntesis de IL-2 y expresión del MHC. Cuando deja de presentarse el antígeno sobre el MHC, deja de producirse IL-2 y la respuesta se frena.

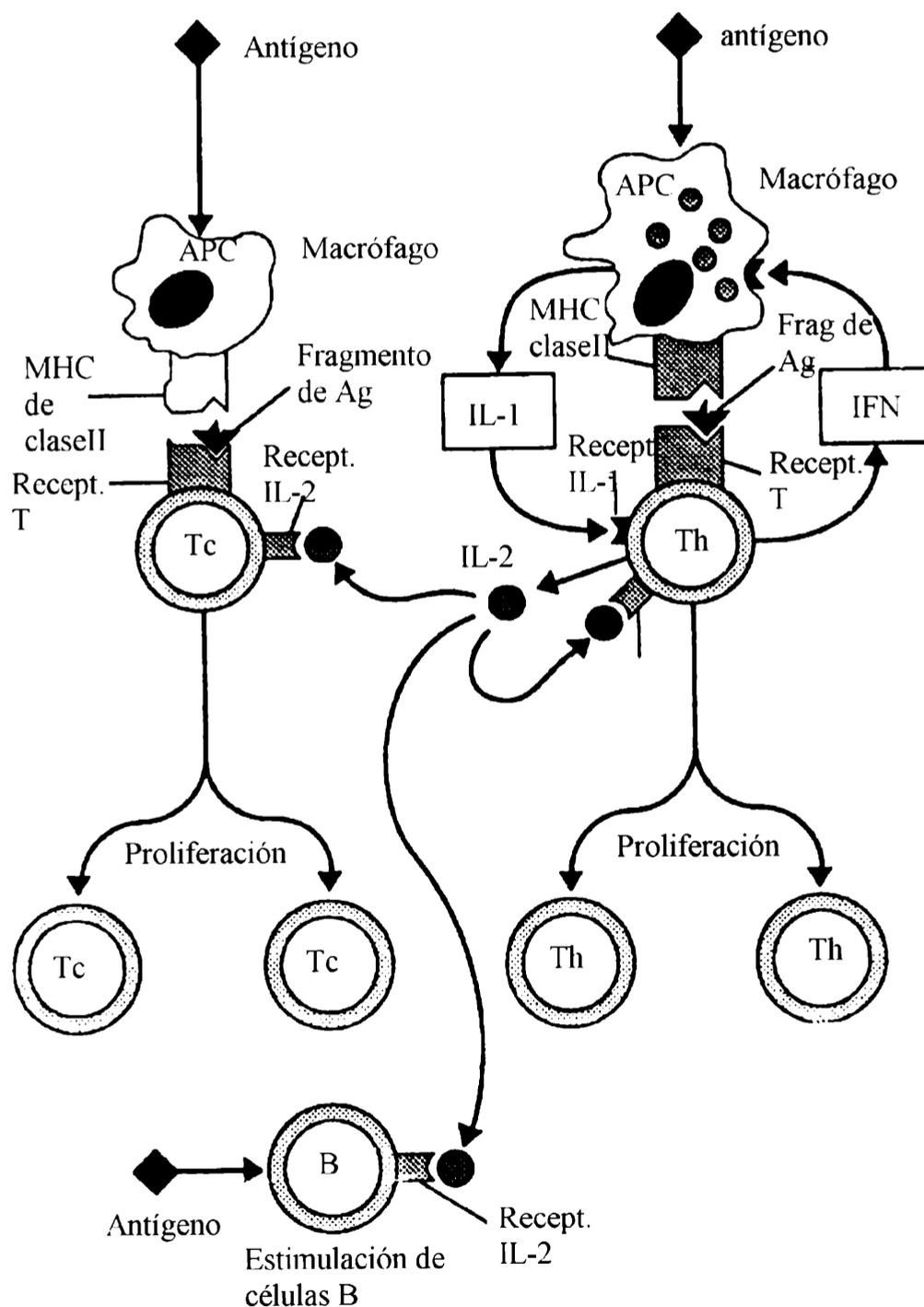


FIGURA I28 : Activación de las células T (Modificada de: Hamblin 1988).

Las linfoquinas liberadas por los macrófagos y células T_h activadas también pueden activar la proliferación y diferenciación de las células B (fig. I29). Las células B activadas por TNF, IL-1 e IL-4 comienzan a producir IL-4 y su receptor, activando autócrinamente su proliferación. Otras citoquinas posteriormente favorecen luego la proliferación y diferenciación de las células B.

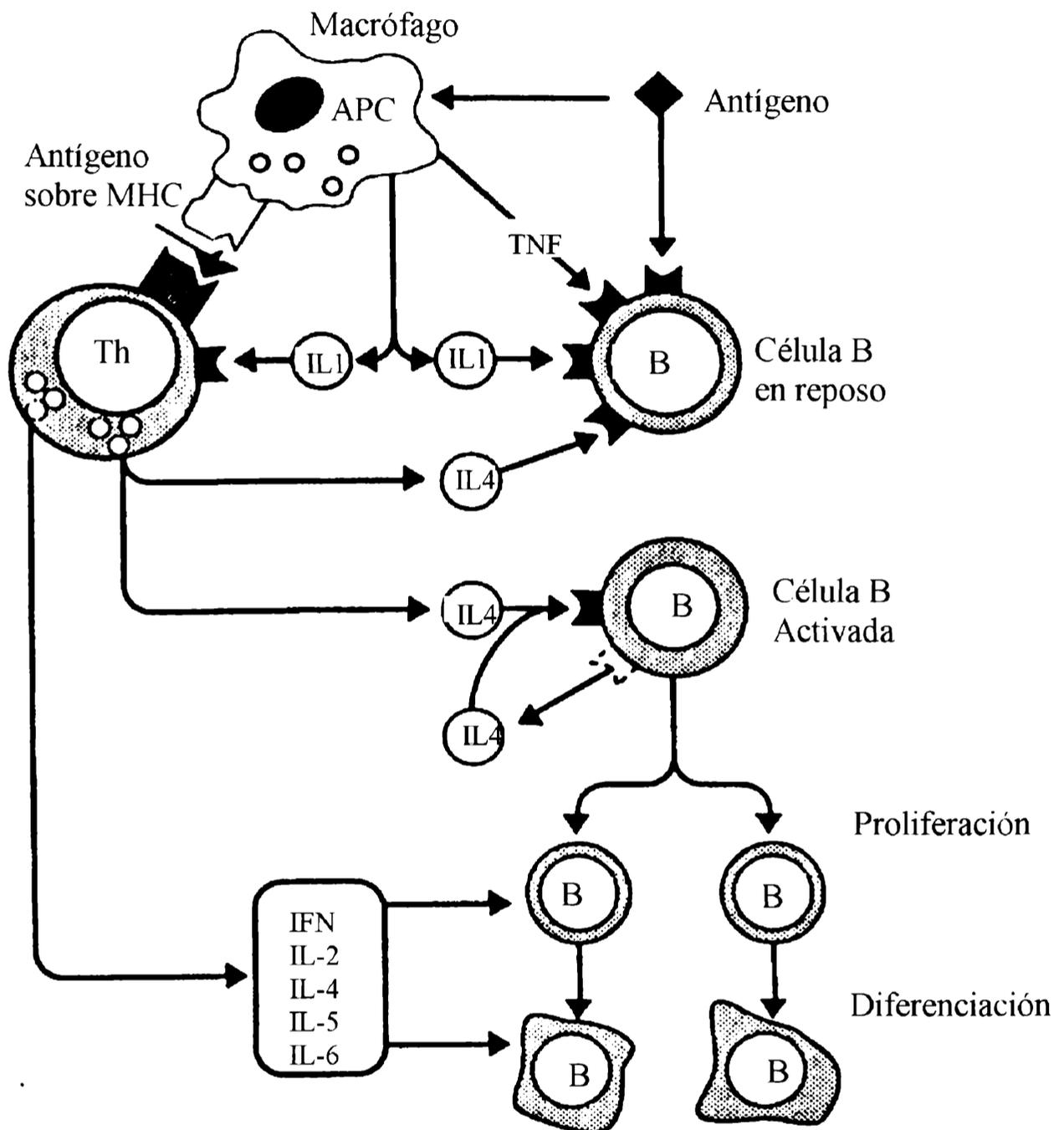


FIGURA I29: Activación de las células B (Modificada de: Hamblin 1988).

3) HORMONAS TIMICAS:

Los factores tímicos con actividad hormonal se estudiaron a principios de este siglo pero ninguno fue químicamente definido ni profundamente estudiado probablemente debido a que los extractos tímicos usados constituían una mezcla heterogénea de hormonas tímicas y otros factores solubles. En la década del 70 el interés en las hormonas tímicas resurgió debido a la capacidad de éstas de mejorar

la inmunocompetencia y a los avances bioquímicos, con la consecuente posibilidad de aislar y caracterizar los principios activos originados en el timo (Kendall and Stebbings 1994).

A) Familia de la timosina:

Los extractos crudos de timo bovino fraccionados por Alan L. Goldstein en 1970 originaron una cromatográfica con propiedades hormonales consistente en una mezcla de 40 - 60 péptidos llamada timosina fracción V (TF5). Se demostró que la TF5 puede inducir la expresión de marcadores linfocitarios, favorece la actividad de las células Th, aumenta la producción de anticuerpos, de factor inhibidor de macrófagos, de IL-1 α y β , de IL-2 y de interferón γ ; también favorece la respuesta de las células linfoides a mitógenos. Esta fracción resultó activa sobre el eje neuroendócrino, estimulando por ejemplo la liberación *in vitro* de ACTH, PRL, y GH a partir de células hipofisarias, PRL a partir de cultivos de células GH3 y de β -endorfina a partir de un tumor corticotrófico. Se demostró además que TF5 inhibe la secreción de TSH y GH en ratas hembras en forma dependiente de la edad pero aumenta los niveles séricos de corticosterona en roedores. Además, incrementa la resistencia a glucocorticoides. La acción de TF5 está mediada por calcio en linfocitos y en la línea tumoral corticotropa AtT-20. En linfocitos TF5 activa la vía del GMPc sin participación del AMPc (Naylor *et al* 1976, Naylor *et al* 1979, Naylor and Goldstein 1979, Goldstein 1984, McGillis *et al* 1985, Spangelo *et al* 1987a, Spangelo *et al* 1987b, Farah *et al* 1987, Goya *et al* 1987, Goya *et al* 1988, McGillis *et al* 1988, Colarian *et al* 1990, Goya *et al* 1993).

La nomenclatura de las timosinas está basada en el fraccionamiento obtenido luego de realizarle una electroforesis de isoelectroenfoque en el rango de pH entre 3,5 y 9,5, dividiendo el patrón de bandas en tres regiones: la región α consiste en aquellos polipéptidos que poseen un punto isoelectrico menor que 5,0, la región β esta representada por los polipéptidos que poseen un punto isoelectrico comprendido entre 5,0 y 7,0 y la región γ está por encima de 7,0 (Goldstein *et al* 1981).

Dentro de este grupo se aisló y secuenció la timosina α_1 que posee un peso molecular de 3108 daltons y está constituida por 28 residuos de aminoácidos (aa) (AC-Ser₁-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys₁₇-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn₂₈), con la mayor parte de la actividad localizada en los residuos 17-28 (subrayado). Esta hormona presenta grandes similitudes con GHRH y VIP comportándose como agonista parcial de VIP aunque con menor actividad. La timosina α_1 y la timosina α_{11} constituyen la región N-terminal de la protimosina α , un polipéptido ácido de 110 aa. Los niveles de protimosina mas altos se encuentran en timo y bazo. La protimosina α es clivada en muchos otros tejidos. El contenido tímico y esplénico de éste polipéptido decrece

con la edad y lo hace mas rápido en hembras que en machos, probablemente debido al efecto de los esteroides gonadales. La protimosina también se encontró en los linfocitos T, donde se comporta como mitógeno actuando a nivel intracelular y posiblemente nuclear; en células NK facilita rearrreglos del citoesqueleto, aumento en la expresión del receptor de IL-2, la internalización de la IL-2 unida a su receptor, síntesis de ADN y proliferación. La fosforilación de la protimosina es mayor en las células en proliferación que en las que poseen baja actividad proliferativa. La timosina α_1 modula la diferenciación de marcadores linfocitarios como la deoxinucleotidil transferasa terminal, Thy-1, etc. Sobre los linfocitos T actúa como mitógeno estimulando la producción de citoquinas, reconstituyendo las funciones de las células T y autoinmunidad de animales viejos. También estimula la producción de anticuerpos y modula facilitando la acción del factor inhibitorio de macrófagos. La timosina α_1 se encuentra en las células epiteliales subcapsulares, perivasculares y medulares del timo, en astrocitos cerebrales y en la hipófisis. Esta hormona circula en el plasma unida a una proteína transportadora de alrededor de 10 kDa. Sus niveles decrecen durante el envejecimiento, pero también depende del estado reproductivo. La timosina α_1 posee actividad secretagoga sobre varias hormonas hipotalámicas e hipofisarias. A nivel clínico esta hormona mejora la actividad de los linfocitos Th y de las células NK por lo que se usa para mejorar el estado de pacientes con cáncer y con inmunodeficiencia primaria. El tratamiento de células linfoides con timosina α_1 produce un aumento de GMPc pero no de PGE₂ ni de AMPc. La paratimosina α posee unos 100 aa, inhibe la fosfofructoquinasa-1 y la glicólisis. Se localiza en el citosol de timo, cerebro, glándulas parótidas, intestino y páncreas (Goldstein *et al* 1977, Goldstein 1978, Ahmed *et al* 1979, Naylor and Goldstein 1979, Cowan *et al* 1981, Goldstein *et al* 1981, Goldstein *et al* 1983, Frasca *et al* 1986, Colarian *et al* 1990, Cordero *et al* 1992, Frillingos and Tsolas 1992, Tsitsiloni *et al* 1992, Barcia *et al* 1993).

La timosina β_1 se aisló de la región β de la TF5 aunque se demostró luego que era idéntica a la ubiquitina, encontrándose en casi todos los tejidos y aunque afecta la diferenciación linfocitaria, no se considera hormona tímica. La timosina β_4 induce la producción de deoxinucleotidil transferasa terminal y posee otras funciones inmunológicas, pero está ampliamente distribuida en otros tejidos, sobre todo aquellos que poseen alto nivel de crecimiento celular como el tejido fetal, timo, bazo, ovario, testículo y tumores y su secuencia es idéntica a la de la proteína sequestradora de actina (Fx), que actúa en la reorganización del citoesqueleto durante la mitosis y la adhesión y locomoción celular. La timosina β_4 inhibe la migración de macrófagos y estimula la producción de PGE₂ y secuestra la actina-G en leucocitos polimorfonucleares y plaquetas. Este péptido favorece la oogénesis y la liberación de LH y GnRH y sus niveles decrecen luego de hipofisectomía o de timectomía. Tanto la timosina β_4 como la timosina β_{10} (otro factor tímico de 43 aa y peso

molecular de 4,9 kDa) son producidas por el ovario donde la expresión de sus genes está modulada por hCG y por $\text{PGF}_{2\alpha}$. El ARNm de timosina β_{10} asociado a la luteólisis es inhibido por hCG y estimulado por $\text{PGF}_{2\alpha}$ y el de la timosina β_4 se asocia a la diferenciación de las células de la granulosa, luteinización y finalmente atresia folicular es estimulado por hCG e inhibido por $\text{PGF}_{2\alpha}$. La transcripción del gen de timosina β_{10} está regulada por un grupo de lípidos encargados de regular el crecimiento y diferenciación celular, los retinoides. Ambas timosinas β_4 y β_{10} son abundantes durante la embriogénesis y modularían la división y crecimiento de las neuritas al suprimir (timosina β_4) o activar (timosina β_{10}) la polimerización de actina, En el adulto sólo se encuentra la timosina β_4 la cuál impediría la división celular (Rebar *et al* 1981, Thurman *et al* 1981, Hu *et al* 1981, Hannappel *et al* 1982, Garaci *et al* 1983, Horecker and Morgan 1984, Low and Goldstein 1985, Suh *et al* 1985, Conlon *et al* 1988, Atkinson *et al* 1990, Ford *et al* 1990, Cassimeris *et al* 1992, Condon and Hall 1992, Hall 1992).

La Timosina α_7 posee un peso molecular de 2200, es muy ácida (punto isoeléctrico de alrededor de 3,5) y es un potente inductor de linfocitos T supresores, aunque también es una activa inductora de marcadores de células T (Goldstein *et al* 1981).

Otro componente de la TF5 es el péptido MB35 de peso molecular 3675 Da, con una secuencia de aa idéntica a la de los residuos 86-120 de la histona H2A y con actividad secretagoga sobre GH y PRL (Badamchian *et al* 1990, Badamchian *et al* 1991).

B) Timopoiatina

Este polipéptido de 49 aa y peso molecular 5562 Da, se aisló de timo bovino. Las timopoietinas constituyen una familia de tres péptidos, las timopoietinas I, II, y III, de los cuales la III no es hormona tímica y ahora se la llama tisplenina porque la diferencia en dos aa (uno de ellos el aa 34) con respecto a las timopoietinas I y II, le altera sus propiedades biológicas. La actividad biológica de las timopoietinas I y II reside en el fragmento 32-36 (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr) que es homólogo con regiones de IgG, IgE, β_2 -microglobulina, HLA-B7 y Thy-1. Se lo prepara sintéticamente bajo el nombre de timopentina (TP5). Las timopoietinas se localizan en timo y en queratinocitos de la piel. Estas hormonas inducen la diferenciación temprana de los timocitos y favorece la actividad Th y la respuesta proliferativa de células T a la estimulación alogénica. *In vitro*, estimulan la liberación de ACTH, β -endorfina y β -lipotrofina por las células hipofisarias e *in vivo* eleva los niveles de cortisol y reduce los de PRL y GH en ratas pero en el hombre eleva los niveles de cortisol y GH sin producir ningún efecto sobre la secreción de PRL. Los niveles de timopoiatina decrecen durante el envejecimiento y las deficiencias inmunes de ra-

tones senescentes se pueden revertir con TP5. La TP5 se usa para aliviar inmunodeficiencias primarias y secundarias pero su uso está discutido (Weksler *et al* 1978, Goldstein *et al* 1979, Goldstein and Lau 1980, Goya *et al* 1989). Recientemente se detectó la presencia de α -cobratoxina y fosfolipasa A₂ en las preparaciones de timopoyetina utilizadas, las que podrían ser responsables de muchos de los hallazgos reportados por Goldstein G y quienes utilizaron su preparación (Quik *et al* 1993).

C) Factor humoral tímico (THF)

El THF es un octapéptido (Leu-Glu-Asp-Gly-Pro-Lys-Phe-Leu) de peso molecular 918 Da que fue primeramente aislado de timo de ternero. Este péptido no presenta ninguna secuencia homóloga con otros factores tímicos conocidos. El THF estimula la producción *in vitro* de IL-2 por células de bazo. Este péptido parece ser esencial para la inducción de la expansión clonal, diferenciación y maduración de las células T, aumenta la mayor parte de las funciones de las células T, normaliza las relaciones CD4:CD8 y restaura la actividad de las células T de animales envejecidos. Actuaría por la vía del AMPc. Clínicamente el THF se ensayó para tratar infecciones virales y para reconstituir la inmunidad celular (Trainin and Small 1970, Kook and Trainin 1974, Trainin *et al* 1979, Trainin 1988, Goso *et al* 1992).

D) Timulina

La timulina consiste en un nonapéptido de peso molecular 847 Da (Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn) unido a zinc como cofactor. El nonapéptido recibió en nombre de facteur thymique sérique (FTS) y fue aislado por primera vez por Bach a partir de suero porcino, posteriormente fue caracterizado en suero humano y en timo bovino y en timo de roedores encontrándose que era el mismo péptido que el encontrado en porcinos y más tarde se demostró que esta molécula está altamente conservada, al menos entre los mamíferos. (Bach and Dardenne 1973, Bach *et al* 1975, Bach *et al* 1976, Pléau *et al* 1977, Dardenne *et al* 1977, Dardenne *et al* 1982)

Para que FTS posea actividad biológica se debe unir a zinc, (constituyendo la FTS-Zn o timulina) en una relación 1:1 (fig. I30) a un pH óptimo de 7,5, siendo su Kd en estas condiciones de alrededor de 10^{-7} . Los estudios de RMN demostraron que las Ser 4 y 8 y la Asn 9 son los residuos involucrados en la unión al zinc y los bioensayos y receptorensayos mostraron que actividad biológica de esta hormona se debe a los siete aa aminoterminales. Los bajos niveles de zinc afectan los niveles de timulina y el tratamiento con zinc los restablece ya que el este ion estimula la expresión del ARNm de la metalotioneína y además la secreción de IL-1 por las

células epiteliales tímicas, los cuales a su vez estimulan la captación de zinc y secreción de timulina por las células epiteliales tímicas. La timulina circula en sangre unida a un transportador con peso molecular similar a albúmina o prealbúmina de 40-60 kDa. En pacientes con reumatismo o con lupus eritematoso sistémico se ha detectado un inhibidor plasmático de la acción de la timulina (Bach *et al* 1978a, Dardenne *et al* 1980a, Dardenne *et al* 1982, Coto *et al* 1992).

La timulina posee múltiples efectos sobre el sistema inmune, los cuales se resumen en la tabla I9 La timulina induce la formación de marcadores de diferenciación de la célula precursora derivada de médula ósea, timocitos y células B y T. En la periferia, la timulina estimula los subgrupos citotóxico/supresor de células T y también estimula la actividad de las células NK. Estimula la producción de IgG a-DNA, la síntesis de IgA e IgG, la síntesis de IL-2 y la proliferación de linfocitos T. En linfocitos T aparentemente existen receptores específicos para timulina, ya que se encontraron dos tipos de receptores independientes, uno de alta y otro de baja afinidad que no presentan efecto cooperativo, en dos líneas celulares (células 1301 y HSB2) derivadas de linfocitos T maduros de pacientes leucémicos con Kd's de 3,5 y 100 nM pero no se encontraron receptores en líneas celulares derivadas de linfocitos B o de linfocitos T inmaduros lo que sugiere que los receptores para esta hormona sólo se expresan en estados definidos de la maduración linfocitaria. Tampoco se pudieron demostrar receptores a timulina en células B y T normales. Según comunicación personal del grupo de Paris de JM Pleau y M Dardenne (Hospital Necker, Paris) todo intento de detectar receptores específicos para timulina en varios tipos células inmunes y no inmunes resultó infructuoso. La dificultad de demostrar receptores para timulina condujo al suscripto a considerar la posibilidad de que el nonapéptido FTS no fuera en realidad una molécula que juegue un rol fisiológico sino mas bien un producto de degradación de otra proteína, el cual actuaría en forma inespecífica sobre las células sensibles. Sin embargo, una búsqueda utilizando el algoritmo FASTA (FASTA@EMBL-Heidelberg.DE) que permite una exploración simultánea en Swiss-Prot y NBRF/PIR, dando así acceso a todas las secuencias aminoacídicas conocidas, indicó que sólo había ocho que tenían alguna secuencia común con este nonapéptido. Ninguna de estas secuencias corresponde a proteínas de mamífero (tabla I10). Esto sugiere que la timulina es una molécula con identidad propia y no un fragmento de otra proteína.

Una única inyección de timulina en niveles fisiológicos es capaz de modificar el fenotipo de los linfocitos dentro de las dos horas y mantenerlo por hasta diez días. La timulina también estimula la proliferación de gonocitos fetales

TABLA 19: Resumen de los efectos de la timulina sobre las células del sistema inmune (Modificada de: Bach 1983).

EFECTO	MODELO EXPERIMENTAL
Estimulación de la proliferación de células T	Proliferación inducida por fitohemoaglutinina en ratones, ratas y ratones y ratas timectomizados neonatalmente. Lupus.
Aumento de la citotoxicidad e hipersensibilidad retardada	Reacción citotóxica alogénica en ratones timectomizados. Citotoxicidad anti-trinitrofenol en timocitos normales. Reacción de rechazo de injerto-contra-huesped en ratones normales. Estimulación de la hipersensibilidad retardada en ratones timectomizados.
Estimulación de la actividad de las células T _h	Inducción de la producción de anticuerpos IgA, IgE e IgG en ratones senescentes y en pacientes con inmunodeficiencia variable. Inducción de la producción de IL-2 en timocitos normales y en los provenientes de bazo de ratones nude. Aumento en la producción de autoanticuerpos IgG anti-ADN en ratones hembras jóvenes de la cepa B/W. Estos efectos se observan con bajas dosis de timulina ($< 10^{-7}$ M).
Estimulación de la actividad de las células T _s	Retardo en el rechazo a injertos de piel en ratones normales. Depresión de la producción de autoanticuerpos IgG anti-ADN en ratones machos jóvenes de la cepa B/W. Estimulación de la supresión inducida con concanavalina A en sujetos normales y pacientes con lupus. Estos efectos se observan con altas dosis de timulina ($> 10^{-7}$ M).
Aumento de la actividad de las células NK	Aumento de la actividad de células NK <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en ratones y humanos.
Aumento en la respuesta de las células B	Favorece la activación policlonal de las células B de ratón inducida por LPS.

en cultivos de testículos e incorporación *in vitro* de [³H]T en los gonocitos testiculares hasta el séptimo día después del nacimiento, acción esta que es inhibida por la corticosterona. Timulina también pudo liberar LH en experimentos de perfusión de células hipofisarias en forma dosis-dependiente siendo máxima la respuesta a una concentración de timulina 10^{-5} M y mínima a 10^{-7} M. Mediante experimentos *in vivo* e *in vitro* se ha encontrado que los niveles circulantes de timulina están controlados por un mecanismo de feedback, cuya naturaleza todavía no está muy aclarada y que sería en parte responsable del mantenimiento casi constante de sus niveles durante la niñez. La timulina se secreta principalmente por las células epiteliales tímicas de las zonas cortical (subcapsular y perivascular) y medular. Luego de la timectomía no se detecta timulina en circulación. También se detectó inmunorreactividad en astrocitos de la glía en la rata. La microscopía electrónica mostró que la timulina se encuentra en gránulos rodeados por una membrana dentro de las células epiteliales tímicas. Dichas vesículas provienen del golgi (Bash *et al* 1976, Bach 1977, Erard *et al* 1979, Pléau *et al* 1980, Dardenne *et al* 1980b, Monier *et al* 1980, Jambon *et al* 1981, Kato *et al* 1981, Auger *et al* 1982, Bordigoni *et al* 1982, Gastinel *et al* 1982, Kaiserlian and Dardenne 1982, Savino *et al* 1982, Suga-

wara and Palacios 1982, Cohen *et al* 1983, Savino *et al* 1983a, Savino *et al* 1983b, Zaidi *et al* 1989, Dardenne and Savino 1990, Prepin *et al* 1994).

TABLA I10: *Proteínas que contienen alguna secuencia semejante a la de la FTS en su molécula.*

<u>GENERO</u>	<u>PROTEINA</u>	<u>% DE IDENTIDAD</u>
<i>Caenorhabditis</i>	mab-5 6/94P10038 (353 aa)	77,778
<i>Centruroides</i>	neurotoxina 1 2/95P01492 (65aa)	75,000
<i>Centruroides</i>	neurotoxina 3 6/94P01494 (65aa)	75,000
<i>Crustacean</i>	toxina 1 11/95P45667 (66aa)	75,000
<i>Centruroides</i>	neurotoxina 2 3/92P01493 (66aa)	75,000
<i>Centruroides</i>	precursor de toxinas 11/95P45663 (87aa)	75,000
<i>Centruroides</i>	precursor de toxinas 11/95P45664 (87aa)	75,000
<i>Trypanosoma</i>	citocromo c 5/92P18822 (93 aa)	63,579

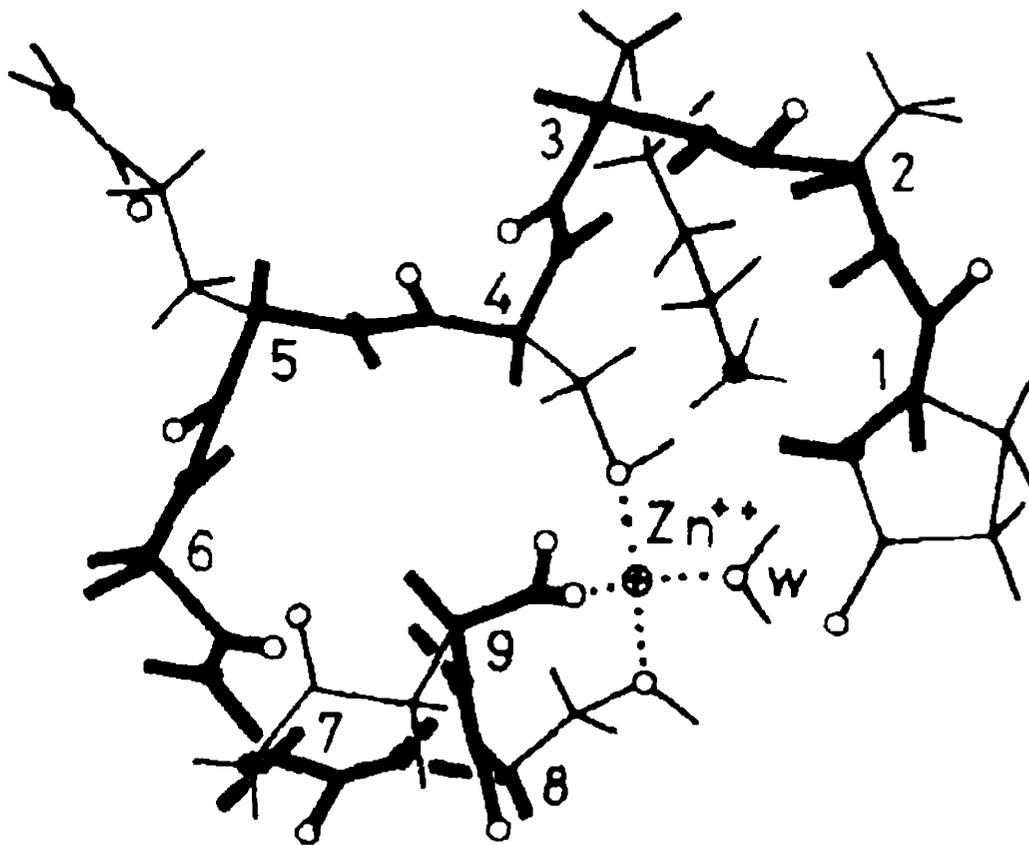


FIGURA I30: *Representación esquemática que muestra la relación 1:1 en el complejo zinc-FTS mostrando que la Ser⁴-OH, Ser⁸-OH y Asn⁹-CO₂ son los sitios que coordinan al ion metálico, siendo el cuarto ligando tentativamente el agua. Los números representan el aminoácido respectivo comenzando en el grupo N-terminal, W representa una molécula de agua y ● representa el ion Zn⁺⁺ (Tomada de: Cung *et al* 1988).*

La actividad biológica de esta hormona es evaluada por un bioensayo que utiliza la formación de rosetas a partir de glóbulos rojos de oveja, desarrollado por el grupo de Bach en París. También se han desarrollado radioinmunoensayos con grados de éxito variables. Mediante RIA se determinó que en el hombre esta hormona tímica se secreta de acuerdo un ritmo circadiano encontrándose los mayores

niveles plasmáticos a la mañana. Los niveles matinales de timulina son de alrededor de 2200 fg/ml en la sangre del cordón umbilical en el recién nacido, los niveles se mantienen altos en niños y luego cae hasta que a los 20 años los niveles se estabilizan en alrededor de 350 fg/ml por el resto de la vida aunque con cierta declinación y amplias variaciones a medida que se envejece. Determinaciones del contenido tímico de timulina mostraron que a pesar de su descenso con la edad, siempre se encuentra inmunoreactividad (con anticuerpos monoclonales) contra timulina, incluso en individuos saludables de 90 años (Bach *et al* 1971, Dardenne and Bach 1975, Dardenne and Bach 1976, Pléau *et al* 1978, Bach *et al* 1978b, Bach and Beaurain 1979, Safieh *et al* 1990, Kendall and Stebbings 1994).

Muchos factores son capaces de modificar la secreción de timulina. Los niveles de esta hormona aumentaban con el estrés producido por la cirugías, lo cual condujo al estudio tanto *in vivo* como *in vitro* del efecto de ACTH, hallándose que esta hormona hipofisaria posee una acción estimuladora de la liberación de timulina. El efecto de ACTH sobre fragmentos de timo es bastante rápido (dentro de los 15 minutos) y aunque no todas las células tímicas responden, en las que lo hacen el efecto estaría mediado por calcio e involucraría la activación del gen *c-fos*, proto-oncogen cuyo producto génico regula la transcripción y proliferación celular. Otros experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro* mostraron que GH, PRL y las hormonas tiroideas actúan directamente sobre las células epiteliales tímicas modificando la secreción de timulina, pero con una acción mas lenta que la de ACTH. La GH actuaría de forma indirecta a través de la producción de IGF-1, la cual es la que estimularía en forma directa la producción de timulina y mitosis. En cultivos de células epiteliales tímicas la IGF-1 actúa como un eficaz secretagogo de éste nonapéptido a concentraciones del orden de 10 nM. En los experimentos en los cuales se observaron efectos secretagogos y proliferativos al tratar cultivos de células epiteliales tímicas con GH se demostró que esto se debía a la producción local de IGF-1, ya que efecto pudo ser bloqueado al coincubar con anticuerpos anti-IGF-1. La PRL eleva los niveles plasmáticos de timulina cuando se inyecta en ratones normales y por el contrario, la bromocriptina los inhibe. Además, cuando se agrega PRL a cultivos de células epiteliales tímicas humanas o de rata, se incrementa la liberación de timulina pero al coincubar PRL con anticuerpos anti-PRL se anula la capacidad de la PRL de inducir la liberación de timulina. Con el uso de autorradiografía y análisis de Scatchard se localizaron sitios de unión para GH y PRL en las células epiteliales tímicas. La PRL además, favorece la proliferación de las células epiteliales tímicas e incrementa la expresión de proteínas del citoesqueleto como la citoqueratina, una proteína correspondiente a los filamentos intermedios.

El tratamiento con tiroxina (T_4) *in vivo* pudo incrementar los niveles plasmáticos de timulina tanto en ratones jóvenes como en los viejos. Además, el tratamiento de ratones jóvenes con triiodotironina (T_3) pudo elevar los niveles séricos de

timulina y el porcentaje de células epiteliales tímicas productoras de timulina mientras que, por el contrario, el tratamiento de los animales con 6N-propiltiouracilo, un inhibidor de la síntesis de T_3 y de T_4 , redujo ambos parámetros estudiados. El tratamiento de células epiteliales tímicas con T_3 también estimuló la producción de timulina pero ésta fue inhibida con el uso del inhibidor de la síntesis de ARNm, la cicloheximida. El control de la secreción de esta hormona también está mediado por las hormonas esteroideas ya que la adrenalectomía o la castración produce un descenso en los niveles séricos de timulina que se acompaña de un aumento de su contenido celular. Posteriormente se comprobaron estos hallazgos *in vitro* usando líneas murinas y cultivos primarios humanos de células epiteliales tímicas en los cuales dexametasona y progesterona estimularon su secreción pero fueron inhibidos por su antagonista, el RU 38486.

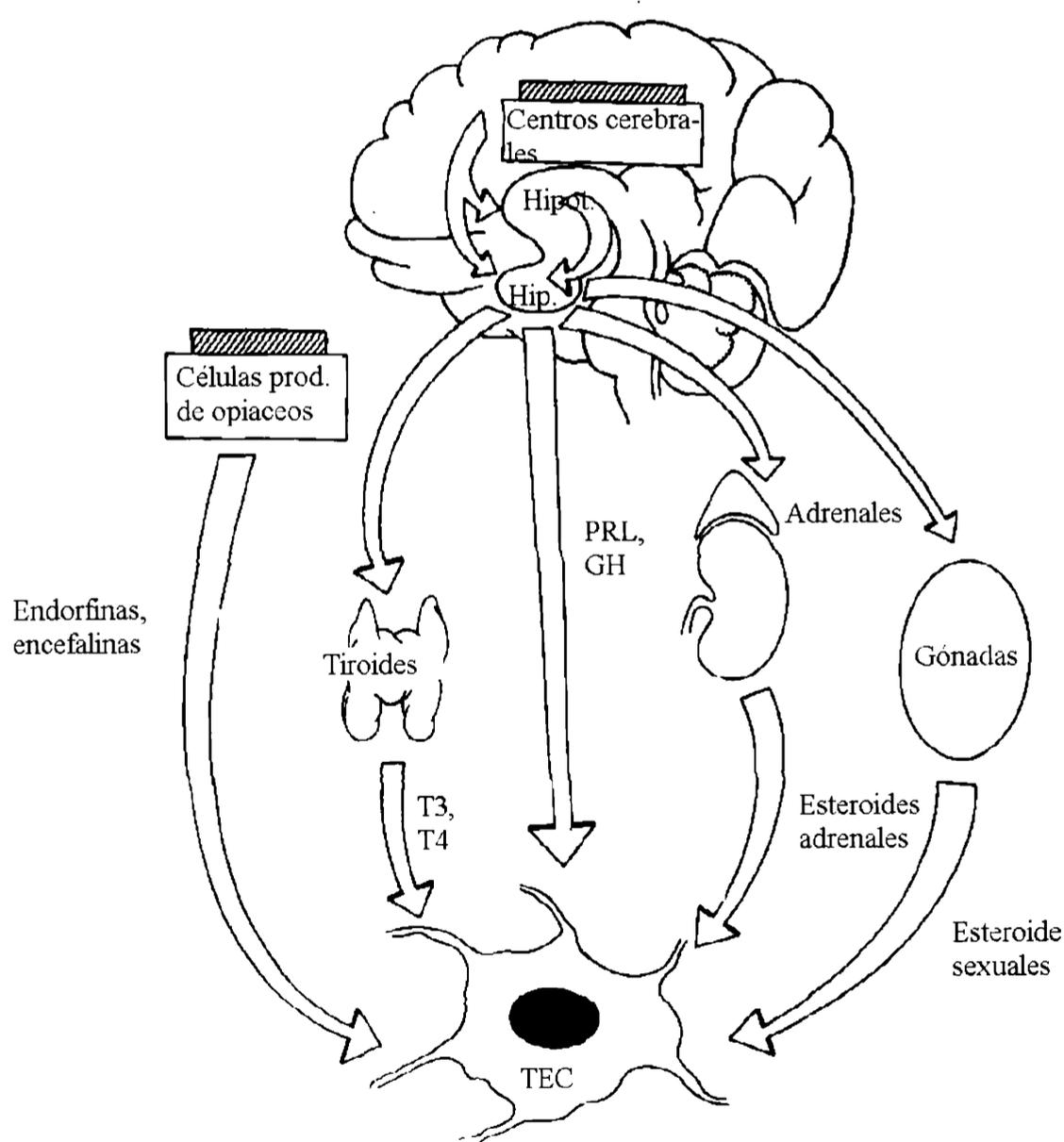


FIGURA I31: Vías propuestas para el control de la secreción de timulina (Modificada de: Dardenne and Savino 1990).

El estradiol también estimuló la secreción del nonapéptido pero fue inhibido tanto por nafoxidina como por tamoxifeno. Tanto experimentos *in vivo* como *in vitro* mostraron que las endorfinas β -endorfina y Leu-encefalina (pero no Met-encefalina, α -endorfina o γ -endorfina) pueden estimular la producción de timulina, siendo esta bloqueada por la naloxona. Además, se demostró que estos opioides son liberados en forma parácrina por las células epiteliales tímicas lo que les permitiría modular la liberación de éste péptido. También se encontró que los extractos hipotalámicos de ratones jóvenes pueden estimular la producción de timulina en ratones senescentes cuyos niveles se encontraban deprimidos. También los extractos de hipotálamo medio basal y de adenohipófisis de ratones donores de distinta edad son capaces de estimular la producción de timulina por células epiteliales tímicas en cultivo siendo los extractos de animales jóvenes los secretagogos más eficientes. La IL-1 secretada por las células epiteliales tímicas actúa sobre ellas mismas y estimula la producción de timulina, luego ambas actúan sobre el linfocito T estimulando su PKC nuclear y promoviendo la proliferación. Las vías involucradas en el control de la secreción de timulina se resumen en la fig I31 (Savino *et al* 1983c, Folch *et al* 1986, Savino *et al* 1988, Dardenne *et al* 1988, Dardenne *et al* 1989, Savino *et al* 1990a, Savino *et al* 1990b, Timsit *et al* 1990, Buckingham *et al* 1991, Safieh *et al* 1991, Buckingham *et al* 1992, Coto *et al* 1992, Timsit *et al* 1992, Goya *et al* 1995).

Existen argumentos indirectos basados en el ensayo de formación de rosetas que sugieren que el AMPc podría ser el segundo mensajero ya que éste nucleótido actúa en forma sinérgica con timulina en este ensayo. Sin embargo, no existe evidencia de que esta hormona estimule la producción de AMPc. También hay evidencias obtenidas de la misma manera que descartarían al GMPc como segundo mensajero. Las prostaglandinas, PGE₁ y PGE₂ podrían también ser candidatos a segundos mensajeros ya que la indometacina evita la producción de Thy 1 por linfocitos murinos y además, la timulina promueve la síntesis de prostaglandinas por linfocitos humanos. Algunos de los resultados sugieren un efecto bifásico de la timulina sobre la síntesis de prostaglandinas ya que altas concentraciones de esta hormona (> de 10 ng/ml) inhibe la síntesis de PGE₂ y PGD₂ pero a concentraciones menores (1-10 ng/ml) estimulan la producción de éstas prostaglandinas en células sanguíneas mononucleares. Trabajos posteriores, sin embargo, mostraron que la timulina es incapaz de estimular la producción de prostaglandinas por células T y B y que el aumento de prostaglandinas observado luego del tratamiento con éste nonapéptido podrían provenir de los macrófagos. También se demostró que esta hormona sinérgica la acción de las prostaglandinas (Bach *et al* 1972, Bach and Bach 1973, Bach 1974, Fournier and Bach 1975, Deschaux *et al* 1982, Gualde *et al* 1982, Homo-Delarche *et al* 1989, Homo-Delarche *et al* 1990)

Los niveles de timulina encuentran disminuidos en pacientes con enfermedades autoinmunes, SIDA, desnutrición y en insuficiencia renal crónica. En el caso de desnutrición, los niveles de timulina retornan a lo normal con la administración de zinc. La administración de timulina mejora la respuesta inmune de los ratones NZB (modelo experimental de lupus eritematoso sistémico) y en los pacientes con artritis reumatoidea mejora su relación CD4/CD8. La timulina permite una recuperación mas rápida de la respuesta inmune a los pacientes que recibieron trasplante de médula ósea, sobre todo en lo referente a la maduración de las células T. Debido al efecto secretagogo de GH y PRL, la timulina se encuentra aumentada en pacientes hiperprolactinémicos y acromegálicos. Habría tres posibles mecanismos por los cuales la timulina reestablecería la inmunocompetencia: (1) estimulando la maduración postímica de las células T, (2) corrigiendo la relación alterada CD4 (helper)/CD8 (citotóxico/supresor) o (3) regulando la proliferación de células Th mediante la estimulación de la producción de IL-2. Altas dosis de timulina reduce en forma dosis-dependiente el dolor provocado por la inflamación provocada por endotoxinas periféricas (Bach *et al* 1980a, Bach *et al* 1980b, Bordigoni *et al* 1982, Okamoto *et al* 1993, Safieh *et al* 1996).

E) Factor tímico de bajo peso molecular (LTF)

El LTF se obtuvo a partir de dializados de extractos de timo bovino, su peso molecular es menor que 1 kDa y posee una estructura no peptídica todavía no dilucidada pero con una potente acción mitogénica sobre los timocitos pero no sobre células periféricas. El LTF inhibe la síntesis de IgE, degranulación y liberación de histamina por los basófilos y estimula las funciones de las células T_s. Este factor elevaría el AMPc y el contenido de nucleósidos de purina y pirimidina en las células blanco (Yalkut *et al* 1993).

F) Hormona tímica homeostática (HTH)

La HTH, también conocida como preparación de Bernardi-Comsa, está estrechamente relacionada con las histonas H2A y H2B, razón por la cual se la tratará en detalle en el Capítulo 4.

4) COMUNICACION BIDIRECCIONAL ENTRE LOS SISTEMAS INMUNE Y NEUROENDOCRINO:

Como se mencionó en el capítulo 1 existe una estrecha conexión entre el sistema inmune y el sistema neuroendócrino donde ambos se comunican en forma bidireccional.

TABLA I11 : *Efectos inmunorregulatorios de los péptidos neuroendócrinos.*

PEPTIDO	FUNCION INMUNOLOGICA
ACTH	Suprime la síntesis de Ig y de IFN γ . Facilita la proliferación B. Suprime la síntesis de IFN γ durante la activación de macrófagos.
PRL	Facilita la síntesis de Ig (sobre todo IgA durante la hiperprolactinemia del embarazo). Facilita la síntesis de IFN γ Activa las células T $_c$. Suprime, aumenta o no afecta (según los autores y dosis) la actividad NK Induce la expresión de receptor de IL-2 en linfocitos. Induce apoptosis en linfocitos inmaduros pero amplifica la respuesta y proliferación periférica de las células T. Podría promover la generación de células B autorreactivas. Activa los macrófagos (pero la hiperprolactinemia la inhibe). A niveles fisiológicos la PRL puede ser trófica para los linfocitos pero hipo o hiperprolactinémias pueden ser inmunosupresoras
LH	Facilita la mitogénesis y proliferación de células T
TSH	Facilita la síntesis de Ig. Facilita la activación de células T $_h$
GH	Facilita la formación de células T $_c$ Facilita la proliferación de células T. Aumenta la población de células T progenitoras CD4/CD8. Facilita la actividad y desarrollo de las células B, monocitos, macrófagos y células NK. Promueve la quimiotaxis de monocitos. Si bien estas células poseen receptores para GH, algunas de las acciones de GH podrían estar mediadas por IGF-I ya que estas células también poseen receptores para éste factor
hCG	Suprime la actividad de las células T $_c$ y NK y la proliferación de células T. Facilita la formación de células T $_s$
α -ENDORFINA	Suprime la síntesis y secreción de Ig. Suprime la actividad T $_h$
β -ENDORFINA	Facilita la síntesis de Ig y de IFN γ . Modula la proliferación de células T. Facilita la generación de células T $_c$ y la actividad NK. Posee actividad quimiotáctica sobre monocitos y neutrófilos
Leu- O Met- ENCEFALINA	Suprimen la síntesis de Ig. Facilitan la síntesis de IFN γ y la actividad de las células NK. Poseen Actividad quimiotáctica sobre monocitos
AVP Y OXITOCINA	Reemplazan los requerimientos de IL-2 para la síntesis de IFN γ
SUSTANCIA P	Aumenta la producción de células T. Induce la degranulación de mastocitos y basófilos. Facilita la fagocitosis por los macrófagos. Estimula la producción de O $_2$, H $_2$ O $_2$ y de tromboxano B $_2$
SOMATOSTATINA	Suprime la producción de células T y la liberación de histamina y leucotrieno D $_4$ por los basófilos

Hasta hace no mucho tiempo, la mayor parte de las interacciones entre el sistema inmune y el neuroendócrino eran atribuidas a los glucocorticoides, pero ahora se reconoce que las hormonas peptídicas, entre ellas ACTH, opiáceos endógenos, TSH, GH, somatostatina, hCG, PRL, sustancia P, etc., pueden modular directamente la respuesta inmune y la función del timo endócrino. Ya se mencionó el efecto de estas sustancias sobre el timo endócrino y en la tabla I11 se resume algunos de los efectos de estos neuropéptidos sobre el sistema inmune (Blalock 1989, Sabharwal *et al* 1992, Berczi 1993, Reber 1993, Murphy *et al* 1985).

La inversa, es decir el efecto de las sustancias tímicas sobre el sistema neuroendócrino también ocurre. El efecto de las hormonas tímicas como por ejemplo la elevación de ACTH y glucocorticoides por la timosina α_1 o la liberación de GnRH por acción de la timosina β_4 ya se mencionó en la sección anterior. Casi no existe documentación sobre efectos de la timulina sobre el sistema neuroendócrino. Existe un único estudio, hasta donde conozco, en el que se encontró que la timulina estimula la liberación de LH *in vitro*. Las citoquinas, como IFN, interleuquinas y TNF han sido extensamente estudiados en relación a sus acciones a nivel neuroendócrino. En la tabla I12 se describen solo algunas pocas de las acciones de las citoquinas sobre el sistema neuroendócrino (Zaidi *et al* 1989, Blalock 1989, Krueger *et al* 1990, Navarra *et al* 1991, Nistico and De Sarro 1991, Plata-Salaman 1991, Rothwell 1991, Cambronero *et al* 1992, Matta *et al* 1992, Kendall and Stebbings 1994).

TABLA I12: Efectos neuroendócrinos de algunas citoquinas.

CITOQUINA	EFFECTOS NEUROENDOCRINOS
IFN α o IFN β	Esteroidogénesis adrenal. Inducción de la síntesis de melamina. Facilitación de la captación de iodo por las células tiroideas. Excitación de neuronas. Supresión del síndrome de abstinencia a la morfina. Catalepsia y analgesia. Induce sueño. No afecta o estimula la liberación de PRL
IL-1	Fiebre. Sueño de ondas lentas. Liberación hipotalámica de CRH e hipofisaria de ACTH y endorfinas. Elevación de los niveles de glucocorticoides. Liberación de Adrenalina y 5-HT hipotalámicos. Inhibe la ingesta de alimentos y produce un comportamiento de "estar enfermo" con reducción de la exploración en ratas. Eleva o inhibe la liberación de LH y de FSH y eleva, inhibe o no tiene efecto en la liberación de GH o PRL según las dosis y autor. No afecta la secreción de TSH
IL-2	Liberación hipofisaria de ACTH y endorfinas. Elevación de los niveles de glucocorticoides. Inhibe la liberación de Ach hipotalámica. Induce sueño, depresión y confusión. Estimula la liberación de vasopresina y así la retención de agua
IL-6	Inhibe la ingesta de alimentos. Eleva la secreción de TRH, ACTH, GH y PRL y podría elevar la secreción de LH. Estimula la producción de glucocorticoides
TNF	Produce sueño. Inhibe la ingesta de alimentos. Eleva la producción de CRH, ACTH, PRL y β -endorfinas. Inhibe la liberación de TSH y los efectos sobre la liberación de GH son controvertidos (elevación, inhibición o sin efecto)

Además, el sistema inmune también es capaz de producir péptidos neuroendócrinos que actuarían en forma parácrina o autócrina sobre las células inmunes y que pueden secretarse en forma inducible o constitutiva por la célula que lo produce según se resume en la tabla I13. También se encontró producción de interleuquinas por el sistema neuroendócrino, cómo por ejemplo IL-6 por las células foliculoestelares, IL-1 por astrocitos y células gliales, IL-3 por células gliales,

timosinas α_1 y β_4 en varios tejidos cerebrales y los INFs por virtualmente todas las células nucleadas. Finalmente, se encontraron receptores para las hormonas del sistema neuroendócrino en el sistema inmune por ejemplo ACTH en bazo y linfocitos periféricos, β -endorfinas y sustancia P en células linfoblastoides, encefalinas en bazo y GH y VIP en linfocitos, así como también receptores para linfoquinas en el sistema neuroendócrino como los de IL-1 e IL-6 en hipófisis y distintas áreas del cerebro (Blalock 1989, Blalock 1992, Cunningham and De Souza 1993).

TABLA I13: Péptidos neuroendócrinos producidos por el sistema inmune.

<u>PEPTIDO</u>	<u>SINTESIS CONS-TITUTIVA</u>	<u>SINTESIS INDUCIBLE</u>	<u>CELULA O TEJIDO PRO-DUCTOR</u>
ACTH	+	+	Linfocitos y macrófagos
ENCEFALINAS	-	+	Células T _h
TSH	-	+	Células T
GH	+	+	Linfocitos
PRL	+	+	Linfocitos
CG	-	+	Células T
VIP	+	-	Leucocitos y mastocitos
SOMATOSTATINA	+	-	Leucocitos y mastocitos
AVP	+	-	Timo
OXITOSINA	+	-	Timo
CRH	-	+	Timo
NEUROFISINA	+	-	Timo

Estas evidencias sugieren que el sistema inmune podría actuar como órgano sensorial. Se propuso que el sistema inmune puede detectar estímulos que no son reconocidos en forma directa por los sistemas nervioso central y periférico, ni por el neuroendócrino. Estos estímulos como por ejemplo bacterias, tumores, virus, antígenos, etc. serían reconocidos por el sistema inmune y convertidos en información bajo la forma de citoquinas y hormonas tímicas que influenciarían el sistema inmune produciendo cambios fisiológicos que abarcan desde respuestas hormonales hasta cognitivas y que además podría llevar al control de la respuesta inmune. A la inversa, el sistema nervioso reconoce estímulos internos y cognitivos y mediante la liberación de hormonas que son reconocidos por los receptores que poseen las células del sistema inmune conducen a cambios en la respuesta inmunológica.

La información arriba reseñada provee sólida evidencia sobre la existencia de una red homeostática inmuno-neuroendócrina donde ambos sistemas se integran a través de señales bidireccionales. Esto ha dado origen a una nueva disciplina, la neuroinmunoendocrinología. Mucho se conoce (aunque mucho queda por conocer) sobre los efectos de los neuropéptidos sobre el sistema inmune y de las citoquinas sobre el sistema neuroendócrino, pero el conocimiento del efecto de las hormonas tímicas sobre el sistema neuroendócrino es muy escaso dejando mucho trabajo investigativo al respecto. Este vacío informativo ha sido uno de los móviles para encarar el presente trabajo de tesis.

CAPITULO 4 : HISTONAS: SUS FUNCIONES CLASICAS Y NO CLASICAS. APOPTOSIS

1) COMPOSICION Y FUNCIONES NUCLEARES DE LAS HISTONAS

Las histonas constituyen una familia de proteínas básicas, siendo además las especies más abundantes asociadas al ADN eucariótico nuclear. Los cinco tipos más importantes de histonas son las llamadas H1, H2A, H2B, H3 y H4. Estas proteínas son ricas en aminoácidos básicos, lo que permite que hagan un contacto eficiente con los grupos fosfatos cargados negativamente del ADN. Cuando el ADN es sintetizado (fig. I32), cada segmento de 200 pares de bases (bp) se asocia a histonas para formar el nucleosoma, el cual consiste en un octámero formado por las histonas H2A, H2B, H3 y H4 cada una de las cuales se repite dos veces; este octámero está rodeado por 146 bp de ADN que da una vuelta y tres cuartos sobre el octámero. Los nucleosomas están separados entre sí por un segmento de ADN linker o espaciador de 160-200 bp por donde se ubica la histona H1 que precinta las unidades de nucleosomas. Esto constituye la fibra de 10 nm que estructuralmente se relaciona con la eucromatina, alguna de cuyas regiones son genéticamente activas.

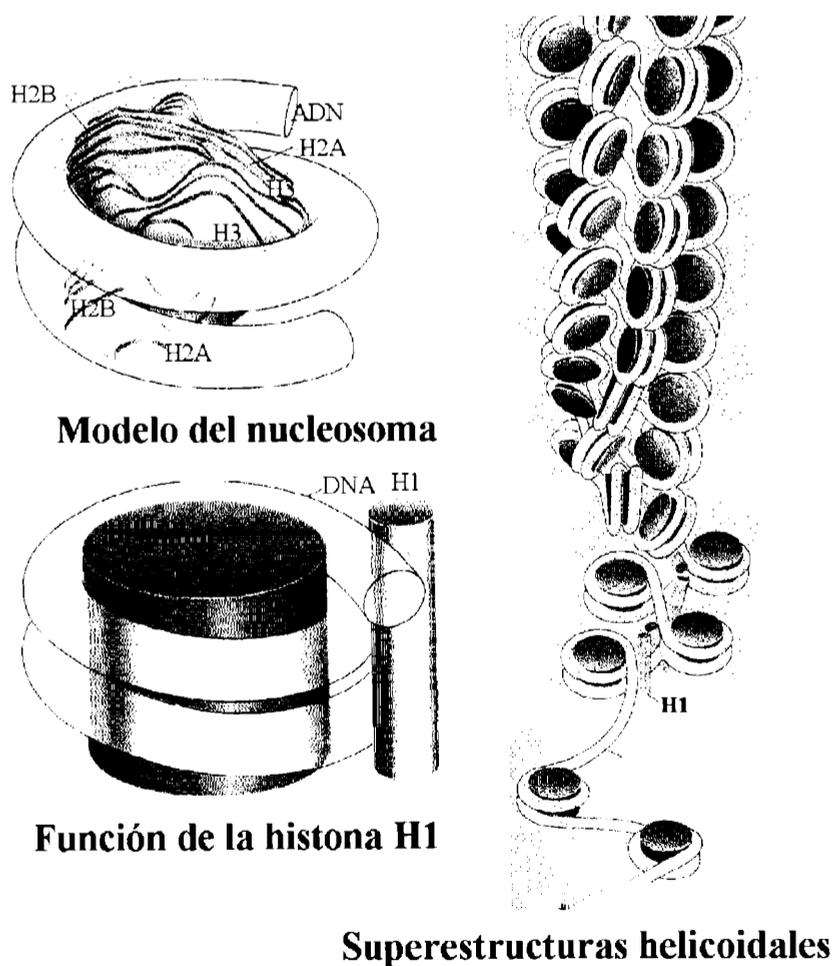


FIGURA I32: Organización y disposición de los nucleosomas en la cromatina (Modificado de: Kornberg y Klug 1981).

Esta fibra se condensa aún mas con la colaboración de la histona H1 originando una fibra llamada solenoide; esta fibra posee un diámetro de 30 nm y representa la heterocromatina, la cual ya no es genéticamente activa. Se pueden generar plegamientos de orden superior con la ayuda de proteínas no histónicas hasta llegar al máximo grado de plegamiento, que es el que poseen los cromosomas en metafase.

El hecho de que la cromatina no esté uniformemente plegada permite la regulación del acceso de las proteínas necesarias para la replicación, transcripción, recombinación, transposición, etc. (Kornberg y Klug 1981, Lodish *et al* 1995).

Las histonas son pequeñas proteínas altamente conservadas en la escala filogenética. La histona H1 es la mas variable, mostrando incluso varios subtipos en los tejidos de un mismo organismo. Estas proteínas sufren múltiples modificaciones post-traduccionales, la mayoría de ellas luego de su incorporación a la cromatina. Así diferentes residuos de aa pueden ser fosforilados, acetilados, poli-ADP-ribosilados, ubiquitinados, etc. La fosforilación de las histonas H1 y H3 sólo se correlacionan con el proceso de condensación de los cromosomas que culmina en metafase. La acetilación de las histonas es altamente específica, ocurre en los grupos ϵ - amino de las Lys N-terminal de las cuatro histonas del core nucleosomal y en tres residuos de Lys internos de las histonas H2B, H3 y H4. La acetilación se encuentra en todos los organismos estudiados, es la modificación que ocurre en mayor grado, decrece la carga positiva neta de las histonas, es reversible y mantiene cohesionado al core del nucleosoma. Entonces, las histonas H2B, H3 y H4 pueden ser acetiladas en 4 posiciones, mientras que la histona H2A sólo puede ser acetilada en una posición, así cada nucleosoma puede poseer entre cero y 26 grupos acetilo. La acetilación de las histonas está relacionada con la actividad transcripcional de la cromatina, siendo las regiones acetiladas las transcripcionalmente más activas, ya que desestabiliza el solenoide; además, la reducción de cargas de las histonas hace que disminuyan las interacciones histona-ADN. Las histonas H2A y H2B pueden estar o no poli-ADP-ribosiladas, pero las que lo están poseen una mayor vida media. La ubiquitina es una proteína de 76 aa altamente conservada en los procariotes, su degradación es no lisosomal. La ubiquitina es una proteína ampliamente distribuida tanto en el núcleo cómo en el citosol. En el núcleo, el fenómeno ubiquitinización-deubiquitinización tanto de histonas como de proteínas no histónicas (cómo la nucleoplasmina, o las ciclinas) regularía la transcripción y la progresión del ciclo celular. También, regularía la degradación proteica por ejemplo la poliubiquitinización de las ciclinas y otras proteínas nucleares constituye una señal para su rápida degradación. La ubiquitinización ocurre solamente en las histonas H2A y H2B en el grupo ϵ - amino de la Lys 120 y es mayor la proporción de estas histonas ubiquitinadas en animales envejecidos (Morimoto *et al* 1993, Tordeira *et al* 1993, Hochstrasser 1995).

En resumen, las histonas, además de poseer una función estructural en la cromatina, participan en los eventos propios del núcleo mediante modificación de sus cadenas laterales, o a través de su unión a receptores y otras proteínas no histónicas.

2) ACTIVIDADES EXTRACROMOSOMALES DE LAS HISTONAS

En la última década se ha acumulado un significativo volumen de evidencia el cual sugiere que, además de su rol estructural a nivel de la cromatina, las histonas poseen actividades de tipo hormonal cuando se encuentran presentes en el medio extracelular. Una de las primeras líneas de evidencia en este sentido surgió a mediados de los '80, cuando se describió una sustancia GnRH similar en células lúteas de rata que era capaz de inhibir la acumulación de AMPc, así como la secreción de progesterona estimulada por LH. Esta sustancia resultó inmunológicamente diferente a GnRH pero con propiedades de unión a la membrana similares. Posteriormente se encontró que las células granulosas y lúteas ovinas, bovinas y humanas poseen este GnRH similar con actividad antigonadotrópica y que podría tener una acción antigonadotrópica paracrina. Como GnRH similar inhibe reversiblemente y con gran afinidad la unión de GnRH se lo llamó GnRH-binding inhibitor (GnRH-BI). Cuando se purificó el GnRH-BI y analizó su secuencia se demostró que era idéntica a la de la histona H2A. Tanto el GnRH-BI como la histona de timo bovino inhibieron la unión de GnRH a membranas ováricas de igual forma ($ID_{50} = 2 \mu M$) en forma competitiva y reversible. Este no es un fenómeno de carga ya que se requieren concentraciones de 100 a 1000 veces más elevadas de las proteínas básicas esperma, espermidina o poly-Lys para lograr este efecto inhibitorio. Además, el bloqueo de la unión de GnRH es específico ya que la histona H2A no inhibe la unión de EGF a membranas ováricas. La histona H2A inhibe la acumulación de AMPc estimulada por LH en células lúteas y la acumulación de AMPc y producción de progesterona en células de la granulosa de ratas. La histona H2A inhibe la unión de hCG a ovarios de rata luteinizados, en forma no competitiva y dosis-dependiente. La unión de FSH a ovarios inmaduros no es inhibida por la histona. Tanto GnRH $1 \mu M$ como histona $7 \mu M$ fueron capaces de inhibir la producción de AMPc estimulada por LH en células lúteas aisladas de rata pero la inhibición por la histona fue mayor que la producida por GnRH, además la histona fue la única capaz de inhibir la producción de AMPc estimulada por toxina colérica. En células de la granulosa aisladas la histona H2A inhibió la producción de AMPc estimuladas por FSH, toxina colérica o forskolin. Entonces, la acción de la histona H2A en el ovario depende del tipo de célula ya que en las células lúteas inhibe la unión de LH y la activación de la proteína G y en las células de la granulosa inhibe la adenilato ciclasa y posiblemente la activación de la proteína G. El significado

fisiológico se desconoce, pero bajo ciertas condiciones de involución celular, cómo ocurre en la atresia folicular o en la regresión lútea, la histona H2A podría ser liberada y consecuentemente inhibir las respuestas gonadotrofin-dependiente de las células adyacentes (Aten *et al* 1986, Aten *et al* 1987a, Aten *et al* 1987b, Ireland *et al* 1988, Aten and Behrman 1989a, Aten and Behrman 1989b, Margolin *et al* 1992).

Mediante el uso de células de Leydig de ratón purificadas mediante gradiente de percoll se demostró que la histona H2A inhibe completamente la producción de testosterona y el aumento de AMPc estimulados por hCG. Esta inhibición fue dosis-dependiente y pudo ser revertido por un exceso de hCG. La histona no afectó la producción de AMPc estimulada por forskolin. Esta histona no fue capaz de alterar los niveles de GMPc estimulados por atriopeptin II. El significado de las acciones de esta sustancia no está claramente entendido, pero podría constituir una nueva clase de sustancias antigonadotrópicas (Mukhopadhyay *et al* 1990).

Otra línea de evidencia indicativa de la actividad hormono-símil de las histonas involucra a las histonas H3 y H4 quienes poseen efectos insulino-símil sobre adipocitos aislados de ratas. Ambas histonas estimulan la incorporación de glucosa y piruvato y también la oxidación intracelular por el adipocito. Tanto la insulina como la histona H4 aumentaron de la misma manera la fosforilación de proteínas intracelulares. Los fragmentos de las histonas H3 y H4, los policationes poly-Arg y poly-Lys y las histonas H1, H2A y H2B fueron todos inactivos. Esto muestra que existe especificidad estructural en estas acciones y que las mismas no se deben a un mero efecto de carga. Al parecer H3 y H4 comparten al menos parte de los mecanismos que ejerce la insulina, pero el significado fisiológico de estos efectos se desconoce. Cuando se estudió el efecto de la histona H4 sobre el transporte de glucosa por el músculo esquelético de rata, se observó que esta histona incrementa la captación de 2-deoxiglucosa en forma dosis-dependiente y que incrementa el número de receptores para insulina pero no su afinidad, ni poly-Lys ni poly-Arg en altas dosis mimetizan esta actividad (McCroskey *et al* 1989, Louters *et al* 1993).

Una tercera línea de evidencia surgió en estudios de pacientes con cáncer pancreático, en quienes se detectó un factor humoral asociado con la producción de hipercalcemia y que actúa como inhibidor de la adenilato ciclasa renal. Este factor consiste en la histona H1. Mediante el uso de hPTH, isoproterenol, VIP, toxina colérica y forskolin se determinó que la histona H1 inhibe la adenilato ciclasa actuando sobre su sitio catalítico (Yasumoto *et al* 1991).

También se ha descrito un factor citostático que inhibe la proliferación del pulmón fetal y cuya concentración es el doble en pulmones de ratas diabéticas. El mismo fue caracterizado como un péptido histona H2B-símil. Otro factor aislado, llamado péptido de crecimiento osteogénico, que promueve la actividad de los osteoclastos, posee sólo 14 aa que son idénticos a la secuencia c-terminal de la histona H4 siendo muy posible que este péptido se origine por procesamiento postraduc-

cional de la histona H4 luego de la injuria de tejidos adyacentes y actúe en forma paracrina. El fragmento pentapeptídico Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly se demostró que posee actividad opiácea e inhibe la contracción electroestimulada del músculo ileal.

La histogranina es un pentadecapéptido que presenta 80 % de homología con el fragmento 86-100 de la histona H4, pero no se sabe si proviene de modificaciones postraduccionales de esta histona o de un gen independiente (histogranina: Met-Asn-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe, histona H4: Val-Val-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe), está presente en hipófisis, cerebro, adrenal, bazo y plasma; se almacena en gránulos de secreción y produce liberación de TNF, IL-1 e IL-6 por macrófagos en cultivo. Cuando el suscripto efectuó una correlación de secuencias con el sistema FASTA (ya mencionado en la sección correspondiente a timulina) encontró que de las 50 proteínas más relacionadas con la secuencia de la histogranina las primeras 47 corresponden a la histona H4 de diversas especies y las tres últimas a variantes de la proteína translocasa de *E. coli* (Kharchenko *et al* 1987, Bab *et al* 1992, Conliffe *et al* 1993, Lemaire *et al* 1995).

También se ha demostrado que los mono y oligonucleosomas presentes en el medio extracelular pueden inducir distintas actividades celulares. En efecto, se reportó que los oligo y mononucleosomas aislados a partir de linfocitos T inducidos a morir por apoptosis con glucocorticoides, son capaces de inducir síntesis de ADN y expansión clonal de los linfocitos B normales lo que resulta además en una síntesis generalizada de anticuerpos anti-ADN. En otra serie de estudios se encontró que el suero de pacientes con cáncer metastásico posee concentraciones anormalmente elevadas de ADN, hecho este que se asocia a una menor actividad de la citotoxicidad mediada por células NK en relación a aquellos pacientes cancerosos con concentraciones normales de ADN sérico. En estudios subsecuentes *in vitro* se demostró que los nucleosomas purificados o las histonas son capaces de inhibir en forma dosis-dependiente la actividad citotóxica de las células NK, mientras que la inhibición por ADN necesita de la función de células T. (Atkinson *et al* 1985, Bell *et al* 1990, Le Lann *et al* 1994).

El ADN nucleosomal puede liberarse al medio extracelular e incluso a la circulación general durante eventos de muerte celular masiva. Se ha sugerido que el desbalance entre la producción y el aclaramiento de nucleosomas podría jugar un rol importante en procesos patológicos que comprometen al sistema inmune como en el caso del lupus eritematoso, SIDA y cancer (Le Lann *et al* 1994).

3) HISTONAS Y HORMONAS TIMICAS

La hormona tímica homeostática (HTH), también conocida como preparación de Bernardi-Comsa fue inicialmente descrita como una preparación cromatográfica de la histona H4.

tográficamente homogénea preparada a partir de timo bovino (Bernardi and Comsa 1965). Los estudios pioneros de Comsa y col., comenzados en la década del '50, partían de la hipótesis prevalente en aquellos años, de que el timo era una glándula endocrina (la función inmunológica del timo se descubrió a principios de los años '60). Esta hipótesis, que hoy se considera correcta, surgió de la observación por Comsa y otros autores de la época, de que en ciertas especies la timectomía neonatal inducía cambios morfofógicos en distintas glándulas endocrinas. Los estudios de Comsa con HTH demostraron que esta preparación parcialmente purificada mejoraba la producción de anticuerpos en animales timectomizados, poseía actividad quimiotáctica sobre los linfocitos, antagonizaba los efectos de ACTH y TSH pero sinergizaba los de GH. Estudios más recientes demostraron que la administración endovenosa de HTH a ratas crónicamente canuladas reducía la secreción de GH y TSH mientras que estimulaba la de corticosterona (Comsa 1958, Comsa *et al* 1973, Comsa and Luckey 1973, Comsa *et al* 1974, Comsa *et al* 1975, Comsa *et al* 1977, Comsa *et al* 1982). Estas respuestas endócrinas a HTH se tornaban más débiles al aumentar la edad de los animales tratados (Goya *et al* 1989b, Goya *et al* 1990). En 1985, Reichhart y col. (Reichhart *et al* 1985a, Reichhart *et al* 1985b) purificaron a la HTH en forma exhaustiva y encontraron que estaba constituida por dos componentes, la HTH_α y HTH_β, cuyas secuencias aminoacídicas resultaron ser idénticas a las de las histonas H2A y H2B, respectivamente. Cómo estas proteínas se obtuvieron virtualmente libres de contaminantes y aún así retenían la actividad biológica observada para HTH, surgió por primera vez la idea de que las histonas podrían poseer actividades hipofisiotrópicas. Este razonamiento, apoyado por resultados iniciales confirmatorios con histonas purificadas, dieron origen a una parte de los estudios que se presentan en este trabajo de tesis.

Cómo se mencionó anteriormente, la TF5 consiste en una mezcla de diferentes timosinas, pero la observación de que la TF5 era capaz de estimular la producción de GH y PRL por la línea GH₃, pero no ninguna de las timosinas por separado condujo a la búsqueda en la TF5 de algún otro factor responsable de esto. El resultado fue el aislamiento con el uso de HPLC en fase reversa del péptido MB-35 que era capaz de estimular la liberación de GH y PRL y luego fue obtenido por síntesis. Este péptido es una molécula de carácter básico que posee 35 aa, peso molecular de 3756 Da y cuya secuencia es idéntica al fragmento 86-120 de la histona H2A (Ala-Ile-Arg-Asn-Asp-Glu-Glu-Leu-Asn-Lys-Leu-Leu-Gly-Lys-Val-Thr-Ile-Ala-Gln-Gly-Gly-Val-Leu-Pro-Asn-Ile-Gln-Ala-Val-Leu-Leu-Pro-Lys-Lys-Thr). Cuando el suscripto determinó por medio del sistema FASTA, qué proteínas presentan esta secuencia en su molécula, el 100% de ellas correspondieron a histonas H2A no sólo de mamíferos, sino también de protozoarios e incluso vegetales.

Las células hipofisarias de ratas hembras cultivadas por cuatro días cuando

fueron expuestas a dosis del péptido sintético de 0,5 ; 1,0 y 2 $\mu\text{g/ml}$ (0,5 $\mu\text{g/ml}$ equivale a una concentración de 0,13 μM) produjeron significativa liberación de GH y PRL a las tres horas de incubación. La coincubación del péptido a concentraciones de 0,5 y 1,0 μM con 100 nM de TRH indujo una respuesta aditiva y cómo TRH actúa aumentando la hidrólisis de fosfoinosítidos se sugiere que ambas sustancias podrían compartir algún mecanismo en común para la liberación de PRL. En un experimento de coincubación similar con las mismas concentraciones del péptido MB-35 y GHRH se obtuvo una respuesta sinérgica y cómo GHRH actúa vía AMPc es posible que el péptido MB-35 no eleve los niveles intracelulares de AMPc. Estos autores sugieren que las histonas y otras proteínas nucleares cuando son liberadas al medio extracelular podrían poseer importantes funciones paracrinas o endócrinas y que el péptido MB-35 podría ser un producto de clivaje de la histona H2A (Gershengorn 1986, Frohman and Jason 1986, Badamchian *et al* 1990, Badamchian *et al* 1991).

4) LAS HISTONAS Y NUCLEOHISTONAS COMO “SEÑALES APOPTOTICAS”:

La muerte junto con el crecimiento y la diferenciación, son etapas críticas de la vida de una célula. El control homeostático del número de células es el resultado de un balance entre la proliferación y la muerte celular. En los eucariotes existen dos tipos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis o muerte celular programada.

La necrosis es una muerte celular no programada, generalmente accidental que ocurre cómo respuesta a una amplia variedad de condiciones no fisiológicas cómo hipoxia, trauma celular y venenos. Al comienzo la necrosis se caracteriza por achicamiento del citoplasma y organoides que conduce a la ruptura de estos y de la membrana celular. Entonces, sus componentes se vuelcan al espacio extracelular. Estos cambios se producen debido a la pérdida del control de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática porque disminuye la actividad de las bombas iónicas, se daña la membrana plasmática o la célula pierde su energía. Luego se incrementa el calcio libre citosólico conduciendo a la activación de fosfolipasas que degradan las membranas y de hidrolasas generadas por la ruptura de los lisosomas lo que acelera la degradación celular. Las proteínas, el ARN y el ADN disminuyen rápidamente. El ADN linker de los nucleosomas es rápidamente degradado por la deoxirribonucleasa lisosomal generando un espectro continuo de fragmentos nucleosómicos de distinto tamaño (Trump *et al* 1984, Chien *et al* 1978, Schane *et al* 1979).

La apoptosis es la contraparte de la mitosis y se observa en la mayor parte de los organismos desde los nematodos e insectos, hasta las aves, los peces y los

mamíferos. Durante el desarrollo embrionario muchas células, especialmente las del sistema nervioso son eliminadas por apoptosis. Muchos ejemplos de apoptosis provienen del sistema inmune: las células T y B autorreactivas se eliminan por apoptosis, la muerte de timocitos inmaduros, la tolerancia extratímica, la muerte de la célula blanco por acción de los linfocitos T_c o de las células NK son otros ejemplos en los cuales interviene la apoptosis. También se sabe que ocurre apoptosis en el rechazo de injertos de tejidos, la involución de las hiperplasias, en tumores y otros tejidos neoplásicos. Muchas condiciones adversas pueden conducir alternativamente a necrosis o a apoptosis, dependiendo de la dosis: bajos niveles de hiper- o hipotermia, isquemia, exposición a radiación o sustancias químicas. La adición o eliminación de muchas hormonas y factores de crecimiento son responsables de que varios tejidos u órganos mueran por apoptosis: timo, útero, células hematopoyéticas, células endoteliales, células embrionarias, testículos, glándula mamaria, neuronas, etc. La falta de estímulos apropiados podría conducir a la senescencia celular y consecuentemente a la muerte celular programada (Clarke 1990, Knoop *et al* 1991, Mangan *et al* 1991, Compton and Cidlowski 1992, Schumer *et al* 1992).

Tanto la apoptosis como la proliferación celular son procesos finamente controlados por diversos genes, pero su descripción está fuera de los fines de ésta tesis. Para aquellos lectores interesados, existen excelentes revisiones en revistas de gran nivel científico y difusión masiva que hacen referencia a los genes que controlan la apoptosis, su regulación, la activación de la muerte de células y destrucción de tejidos por medio de la interacción del factor de muerte (Fas) (el cual pertenece a la superfamilia del TNF), se cita un gran número de agentes inductores e inhibidores de la apoptosis así como también patologías en las cuales se inhibe o se incrementa la apoptosis. También existen libros de reciente publicación que amplían esa información pero están orientados a explicar las bases moleculares de patologías en las que se produce apoptosis. En la figura I33 se muestran algunos de los genes involucrados en la muerte celular programada (Tomei and Cope 1994, Evan *et al* 1995, Nagata and Golstein 1995, Steller 1995, Thompson 1995).

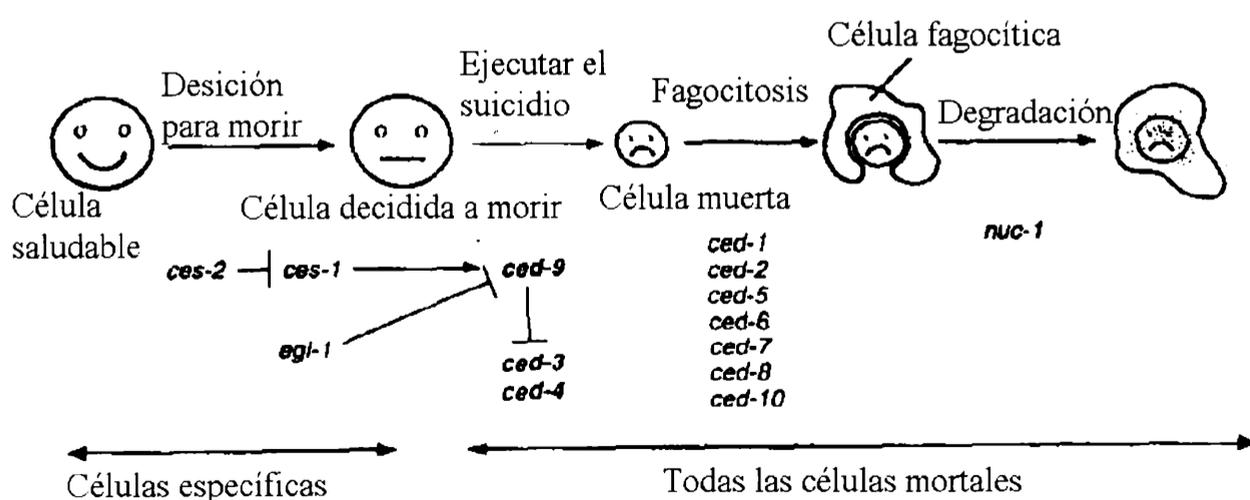


FIGURA I33: Vía genética de la muerte celular programada. Símbolos: → (regulación positiva), —| (regulación negativa) (Modificado de: Steller 1995).

La apoptosis comienza con pérdida de las estructuras especializadas de la membrana plasmática, contracción del citoplasma, probablemente debido a la pérdida de fluidos y de iones intracelulares, y coalescencia de la cromatina. El retículo endoplasmático se dilata y forma vesículas que envuelven a los organoides o se fusionan con la membrana plasmática. Luego la célula se rompe originando muchos fragmentos rodeados por membrana, denominados “cuerpos apoptóticos”, que contienen organoides citoplasmáticos y fragmentos nucleares. Durante la hidrólisis de la cromatina existe un patrón muy específico de degradación del ADN, el cual se fragmenta en múltiplos de 180- 200 pares de bases, lo que indica que la cromatina es clivada a nivel del ADN internucleosomal liberando mono y oligonucleosomas. El hecho de que en todas las células apoptóticas estudiadas la producción de oligonucleosomas sea un evento muy temprano de la muerte celular programada (ocurre varias horas antes de que la viabilidad celular decrezca), sugiere que esta es una fase muy característica de la apoptosis, así como también lo es la presencia de ATP durante todo el proceso, ya que al contrario de la necrosis, la apoptosis es un proceso energía-dependiente (Wyllie 1980, Kyprianou and Isaacs 1988, Compton and Cidlowski 1992, Miller *et al* 1993, Stefanelli *et al* 1997).

De este modo, los oligonucleosomas y en menor medida las histonas liberadas al medio extracelular podrían ejercer las acciones regulatorias mencionadas en la sección anterior.

CAPITULO 5: ENVEJECIMIENTO: SUS TEORIAS. ALTERACIONES HORMONALES E INMUNES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

1) DEFINICION Y CONSECUENCIAS

El envejecimiento puede ser definido como la declinación de la integridad morfológica y la capacidad funcional de los sistemas integradores (nervioso, endocrino e inmune), asociada con un descenso de la capacidad para mantener la homeostasis. Puede ser considerado a nivel de organismo, tejidos, células y moléculas. La homeostasis permite ajustar y mantener un equilibrio dinámico. Los organismos superiores presentan un nivel de homeostasis intracelular regulado por el genoma y un nivel extracelular bajo control del sistema inmunoneuroendócrino. A ello, se agregan influencias del medio ambiente externo que generan estrés. La disminución o pérdida de señales hipotalámico-hipofisarias, la alteración en la actividad de las glándulas endocrinas periféricas y el daño de las células blanco hormono-dependientes, inducen una declinación de la capacidad homeostática y aumentan la vulnerabilidad frente a cambios ambientales. La red homeostática es compleja y tiene poder para emitir y recibir señales bidireccionales (Sapolsky 1992).

El punto de ajuste homeostático cambia durante las diversas etapas del envejecimiento. La fisiología normal que estudiamos corresponde a la de un adulto joven en plenitud funcional. En realidad, existe una secuencia de fisiologías normales u homeorrexis que se inicia en el cigoto y finaliza en la senectud. La homeostasis es dinámica y se ajusta a cada fase de la vida. Todos los cambios asociados al desarrollo están programados genéticamente hasta el momento de la madurez sexual. Aquí se plantean dos posibilidades: 1) tanto el período reproductivo como el proceso de envejecimiento están programados. 2) el programa de desarrollo finaliza al alcanzarse la madurez sexual. Para la segunda opción la extensión del período reproductivo dependería de la “durabilidad” de los sistemas integradores homeostáticos. El envejecimiento se iniciaría con la declinación morfológico-funcional de tales sistemas (Meites *et al* 1987, Goya 1988).

El avance de la Medicina durante el presente siglo ha sido de tal magnitud que supera con creces todo lo realizado en dicho campo durante el resto de la historia humana. Este hecho, junto con el mejoramiento de las condiciones generales de vida, ha producido un aumento, también sin precedentes, en el promedio de vida humana, especialmente en los países desarrollados. Esta circunstancia ha generado, y aún continua haciéndolo, un crecimiento progresivo del sector de la población constituido por individuos mayores de 70 años. La expectativa de vida a

principios de siglo, apenas superaba los 40 años. Para el año 2000 la población de más de 65 años superará los 600 millones. Este crecimiento de la población geronte plantea nuevos e importantes problemas socioeconómicos y médicos. En este contexto, el objeto de la Gerontología moderna es el de “agregar calidad de vida a los años y no simplemente años a la vida”. En términos socioeconómicos esto significa aumentar los años saludables y productivos de los individuos. El hombre se resigna a morir, pero no a envejecer. En este marco, resulta clara la importancia de estudiar los mecanismos básicos que gobiernan el proceso del envejecimiento en los organismos superiores. La investigación experimental en gerontología se desarrolló en la segunda mitad de este siglo (Hesse and Ermini 1992).

Los seres vivos tienen un límite máximo de longevidad que resulta característico de cada especie, como si hubiese un reloj biológico genético. La mosca doméstica posee un límite máximo de unos 40 días, la rata 3 años, el gato 28 y el elefante 70. En el ser humano este límite parece estar alrededor de los cien años (Cutler 1992).

2) TEORIAS DEL ENVEJECIMIENTO

Las teorías del envejecimiento son numerosas (por no decir que casi hay una por cada gerontólogo experimental reconocido) y controvertidas, pero pueden clasificarse en teorías moleculares, celulares y sistémicas.

A) Teorías moleculares:

Estas teorías dan importancia al control genético y asumen que hay un programa genético y que él o sus alteraciones determinan el límite máximo de vida de cada especie.

1) Teorías de la mutación somática y reparación del ADN:

La radiación ionizante que llega a la tierra podría causar que la célula degenerare y muera. Esta teoría no es probablemente la que explica la causa del envejecimiento porque: a) la radiación natural del ambiente es muy baja y b) porque los mecanismos de reparación del ADN pueden ser suficientes como para reparar el daño en esas condiciones sin embargo pueden ser insuficientes cuando la agresión es mayor, como la generada por agentes tóxicos, radicales libres o por rayos ultravioletas por largos períodos de tiempo o en altas dosis. Si fallan los sistemas reparativos del ADN, las mutaciones generadas originarían proteínas defectuosas que pondrían en peligro la supervivencia de la célula o del organismo. En humanos el sistema de reparación del ADN es mas eficiente que en los animales de vida mas

corta, pero se detectaron defectos en la reparación del ADN en aquellos individuos con susceptibilidad al cáncer de tipo hereditario. El descenso en la capacidad reparativa del ADN durante el envejecimiento podría explicar la mayor incidencia de cáncer en las personas senescentes. El daño en el ADN es acumulativo durante el envejecimiento y pueden producirse entrecruzamientos, cromosomas dicéntricos, aneuploidía, poliploidía, pérdidas de bandas centroméricas, etc. (Mullaart *et al* 1990, Randerath *et al* 1992, Vijg and Gossen 1993).

El ADN mitocondrial es mucho mas susceptible al daño que el ADN nuclear. La mitocondria es el principal sitio de producción de energía celular y está muy expuesta al daño por radicales derivados del oxígeno que se producen cuando el O₂ acepta electrones para formar agua como producto final de la respiración celular. Además, como este organoide carece de las enzimas reparadoras del ADN, los daños que se producen son acumulativos y aumentan con el envejecimiento conduciendo eventualmente al daño mitocondrial y a la disminución en la capacidad de generar energía por parte de la célula (Wallace 1992).

II) Teoría de la catástrofe por errores:

Propone que un error en la transcripción podría cambiar un triplete de bases que luego de la traducción generaría una proteína con una secuencia de aa errónea que se incorporaría a la célula afectando su función. La acumulación de estos errores durante la vida, particularmente en proteínas clave, llevaría a una amplificación de errores catastróficas para la célula. Sin embargo, la teoría ha sido aceptada sólo parcialmente ya que se considera que la célula puede reparar errores metabólicos. Pero si la alteración ocurre en una proteína encargada de plegar otras proteínas o de trasladarlas a su destino podrían causar un mayor problema a la célula, sobre todo a las post-mitóticas. Este proceso podría estar implicado en la demencia senil (Blake *et al* 1990).

III) Teorías de la regulación genética :

La senescencia podría resultar de cambios en la expresión de genes luego de finalizar la etapa reproductiva o de la existencia de genes específicos para la longevidad o la muerte. En moscas y nematodos se encontraron genes que pueden alargar y otros acortar el tiempo de vida del individuo. En nematodos (*Caenorhabditis elegans*) la mutación de un gen le alarga el tiempo de vida por mas de tres semanas que el promedio normal. Comparando la librería genética de *C. elegans* se identificaron nueve transcriptos que decrecen en abundancia con la edad, dos que aumentan al envejecer y uno que hace un pico de abundancia en la mitad de la edad adulta (Danner 1992, Fabian and Johnson 1995).

Los telómeros son los extremos de los cromosomas. Ellos poseen una corta secuencia de ADN repetida miles de veces que estabiliza a los cromosomas durante la mitosis. En las células somáticas normales, que sólo se dividen un número limitado de veces y después mueren, en cada división los telómeros pierden cierto número de bases, pero no sucede lo mismo en las “células inmortalizadas” capaces de dividirse indefinidamente. En células cancerosas pero no en las normales se encuentra presente la telomerasa, una enzima que posee la habilidad de preservar la longitud de los telómeros y así asegurar una proliferación celular continua. Un estudio más detallado de los telómeros y genes que activan o inhiben la división celular aportaría un mayor conocimiento no sólo en relación con el cáncer, sino también con el envejecimiento. Recientemente, sin embargo, se ha aportado evidencia significativa en contra del rol de los telómeros en el envejecimiento (Harley *et al* 1990, Levy *et al* 1992).

B) Teorías celulares:

Estas teorías asocian al envejecimiento con los cambios en la estructura y función celular debidos fundamentalmente a una respuesta a los cambios ambientales.

I) Teoría del uso y desgaste:

De acuerdo a esta teoría, los organismos vivientes son como maquinas cuyas partes se desgastan con el uso repetido, luego se vuelven defectuosas y por ultimo terminan fallando y dejan de funcionar. Sin embargo, los seres vivos poseen mecanismos para reparar sus daños mientras que las máquinas no. Esta idea surgió de la observación de que el frío prolongaba mientras que el calor acortaba el tiempo de vida de algunos animales, probablemente por disminuir o acelerar respectivamente, el uso y desgaste de su maquinaria. Las expectativas de vida de diferentes especies son inversamente proporcionales a sus respectivos metabolismos basales, pero es muy difícil correlacionar diferencias individuales en tiempos de vida con las velocidades metabólicas cuando se comparan los individuos una misma especie (Harman 1981, Cutler 1992).

II) Teoría de los radicales libres :

Esta teoría postula que los radicales libres están involucrados en el proceso de envejecimiento y sus desórdenes. En el organismo se producen radicales libres (O_2 , $O-R$, RO y RO_2) generados por reacciones no enzimáticas y enzimáticas como la reducción del O_2 a agua o la exposición a radiaciones ionizantes. Algunas

enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y vitaminas (E, C, carotenos) protegen al organismo contra el ataque oxidativo. Durante el envejecimiento, esta protección podría volverse menos efectiva permitiendo la peroxidación de lípidos y aldehídos y la formación de uniones cruzadas en proteínas y ADN. Aunque esto puede ser reparado, en las células envejecidas la eficiencia reparativa es menor lo que conduce a una reducción de su función y susceptibilidad a enfermedades. Esta teoría está avalada por el hecho de que se encontraron altos niveles de superóxido dismutasa y de antioxidantes en las especies de larga vida y de que la inserción de copias extra del gen de la superóxido y catalasa dismutasa en la mosca de la fruta le prolonga el tiempo medio y el máximo de vida. Además, los productos de peroxidación de lípidos la lipofuscina y ceroides, se acumulan, a medida que avanza el envejecimiento, en las neuronas, células gliales, miocitos cardíacos y otras células, debido a un incremento en la peroxidación y disminución en su degradación lisosomal de los productos generados. En organismos que hibernan y que por tanto reducen su velocidad metabólica, la acumulación de estos pigmentos es menor. Sin embargo, existe evidencia de que los cambios asociados al envejecimiento de la actividad de las enzimas antioxidantes depende de la especie, cepa, sexo, tejido u organoide estudiado. Parece que el envejecimiento de un organismo se asocia con un aumento, descenso o con ningún cambio en la actividad enzimática cuando se comparan diferentes órganos del mismo individuo, lo que sugiere que el envejecimiento no puede ser explicado sólo en base a los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes, fig. I34 (Sohal and Brunk 1989, Harman 1992, Bolzán *et al* 1995).

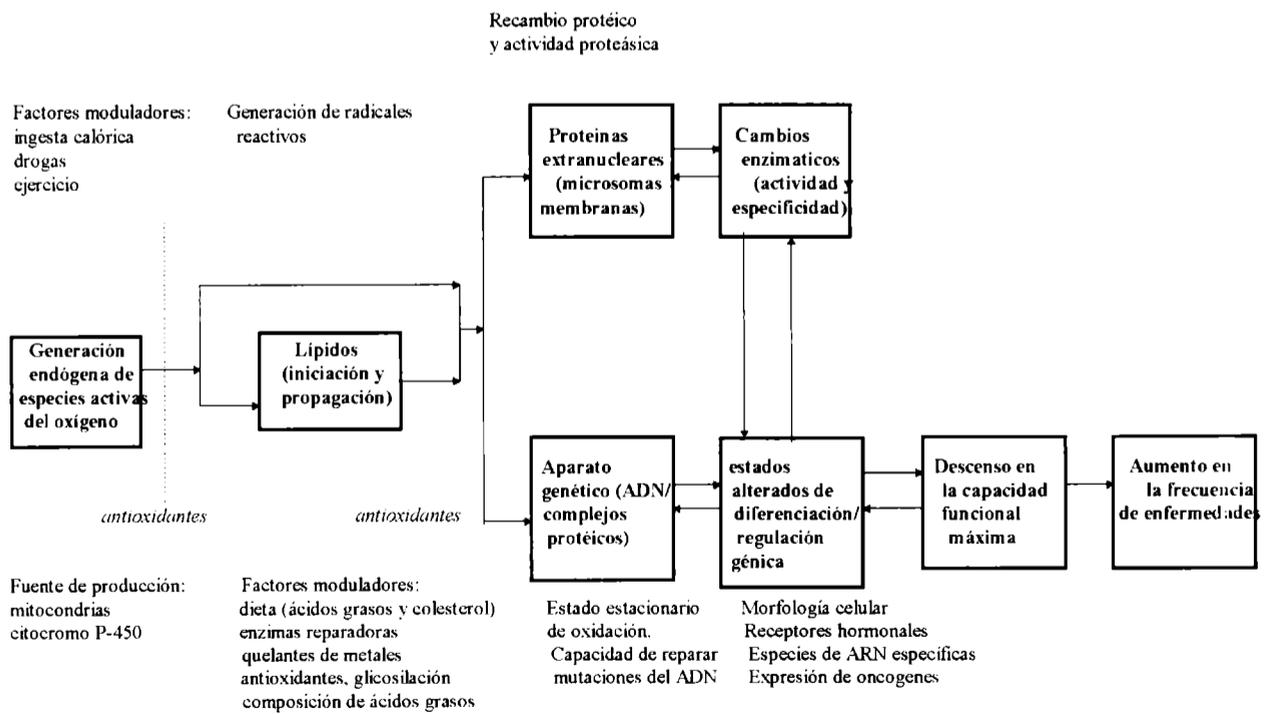


FIGURA I34: Efecto de los radicales libres sobre el envejecimiento (Modificada de: Cutler 1992).

III) Teoría de las ligaduras cruzadas :

Muchas moléculas biológicas desarrollan, a medida que pasa el tiempo, enlaces entre moléculas iguales o diferentes que alteran sus propiedades físicas y químicas. La glucosa se une por medio de reacciones no enzimáticas a proteínas y ácidos nucleicos alterando sus funciones. La reacción entre glucosa y proteínas se conoce como reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático. Esta comienza con la reacción entre el grupo aldehído de la glucosa con un grupo amino de la proteína formando una base de Schiff, la cual es inestable y se reordena formando unas sustancias conocidas como productos de Amadori. En proteínas de alta vida media, estos productos de Amadori se deshidratan lentamente y reordenan irreversiblemente formando compuestos llamados productos finales de glicosilación avanzada (AGEs). Muchos de esos AGEs, como por ejemplo la pirralina y la pentosidina, pueden formar enlaces cruzados con proteínas adyacentes cambiándoles sus propiedades, como por ejemplo la solubilidad y la resistencia a proteasas. Las uniones cruzadas aumentan con el envejecimiento y pueden ocurrir tanto con proteínas extracelulares, por ejemplo el colágeno tanto como con las intracelulares. Las uniones cruzadas se asocian con ciertas patologías vinculadas al envejecimiento, tales como la aterosclerosis, cataratas, diabetes y enfermedad de Alzheimer. Además, la formación de AGEs en el plasma constituye una fuente de estimulación de los macrófagos para que produzcan la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF (Bjorksten 1968, Cerami 1985, Bjorksten and Tenhu 1990).

C) Teorías a nivel sistémico:

Una de estas teorías, la llamada “teoría del deterioro funcional luego de la madurez reproductiva” es una extensión de la teoría de la regulación génica y propone que la senescencia podría ocurrir por cambios en la expresión de los genes luego de alcanzada la madurez reproductiva. La diferenciación y el crecimiento ocurren por activación y represión secuencial de ciertos tipos de genes únicos para esas fases. Los productos o subproductos de esos genes, cuando alcanzan niveles críticos, estimulan ciertos genes responsables de la fase reproductiva y los productos o subproductos de los mismos como por ejemplo las hormonas esteróideas sean las responsables de capacitar al organismo para ser apto reproductivamente. La capacidad reproductiva es de vital importancia para la perpetuación y evolución de las especies. Pero el establecimiento de la fase reproductiva reprime los genes responsables del crecimiento y diferenciación. Además, el período reproductivo no dura indefinidamente debido a la aparición de ciertos factores que al acumularse afectarían a los genes responsables de la reproducción y activarían genes indeseables como las secuencias vírales que podrían estar reprimidos. A partir de esto el

control declina dando origen a la pérdida de las funciones reproductivas y comienzo de la senescencia. Es decir, el organismo mantiene un coordinado control genético para asegurarse de llegar a la edad reproductiva y así perpetuar la especie; mas allá de ese punto decae el control y ocurre una declinación exponencial de las habilidades que poseería el adulto hasta llegar a la muerte. Una alta tasa poblacional de individuos infértiles sólo competiría por espacio y alimento con aquella de individuos reproductivamente aptos poniendo en peligro la especie. Aquellas especies organizacionalmente más complejas requieren un mayor período para el desarrollo pero disponen de períodos de fertilidad mas amplios, lo que sugiere la idea de que existe una evolución de la senescencia donde la selección natural actuaría en dirección a posponer o eliminar la senescencia a medida que avanza la evolución, y el hecho de que la senescencia ocurra se explicaría porque la fuerza de selección natural es menor debido a la disminución de la capacidad reproductiva que es menor en individuos viejos que jóvenes y que el éxito en llegar a la edad reproductiva de algunos individuos (sean estos normales o muy longevos) contribuye a eliminar los individuos menos longevos (Williams 1957, Kanungo 1980, Kirkwood and Rose 1991).

En otras teorías la disminución de los ajustes homeostáticos durante el envejecimiento conduce a fallas en la adaptación y supervivencia. La adaptación a señales del medio externo o interno depende de los mecanismos regulados por los sistemas nervioso, endócrino e inmune. Para una adaptación adecuada, estos sistemas deben estar sincronizados y responder a las necesidades de las funciones que regulan. Sin embargo, durante el envejecimiento, la integración inmunoneuroendócrina se deteriora y esto da como resultado un descenso en las funciones y aumento en las patologías de muchos órganos, tejidos y sistemas. Dentro de ésta categoría existen dos grandes grupos de teorías: la neuroendócrina y la inmunológica. De acuerdo a ambas, las células neuroendócrinas o inmunes actuarían como marcapasos que regulan un “reloj biológico” basado en un programa genético que regula el desarrollo y envejecimiento. Con el pasaje del tiempo este reloj se deteriora o deja de funcionar. Entonces, durante el envejecimiento podría manifestarse un desbalance en órganos y sistemas claves como el hipotálamo, la hipófisis, la pineal, la corteza adrenal o la glándula tiroideas por la teoría neuroendócrina y el timo, nódulos linfáticos, bazo o complejo de histocompatibilidad por el sistema inmune, fig I35.

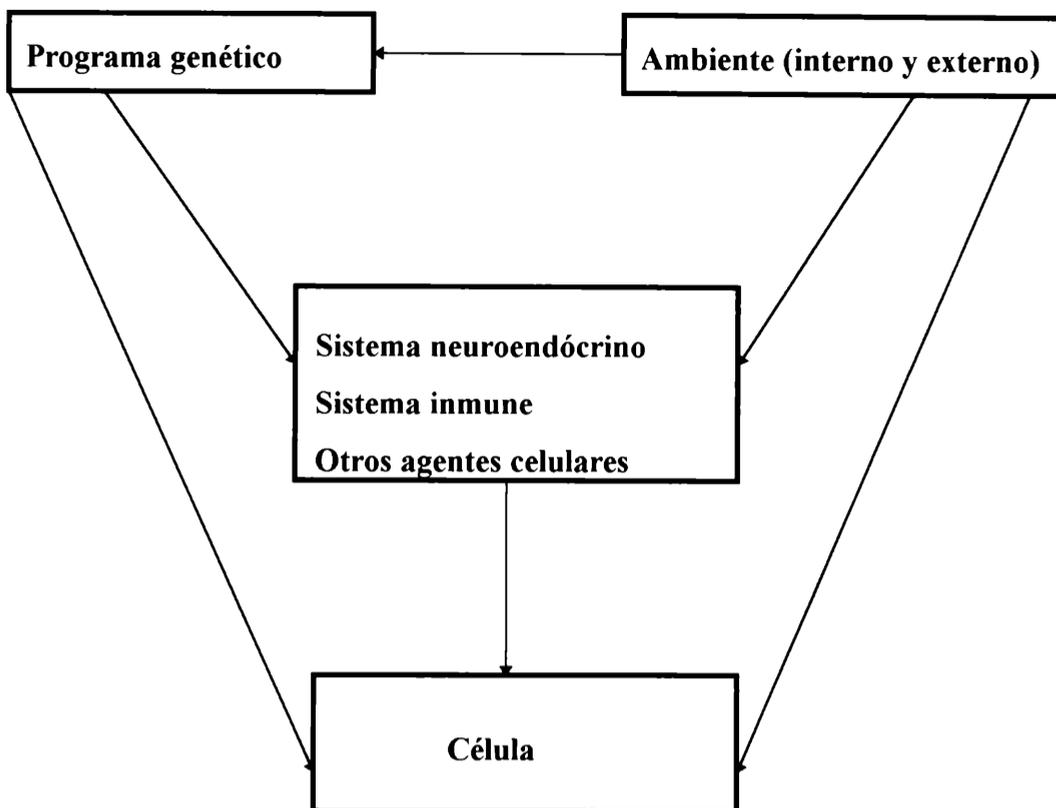


FIGURA I35: *Teorías de envejecimiento sistémico (Modificada de: Meites et al 1987).*

En años recientes se ha acumulado un gran cuerpo de evidencia que sugiere que el sistema inmune está ligado al sistema neuroendócrino, constituyendo una red homeostática integrada y que el deterioro de ésta es el responsable de la alteración del reloj biológico que conduce a los cambios observados durante el envejecimiento (Pierpaoli and Sorokin 1967, Fabris 1990, Goya *et al* 1990, Goya 1991, Covelli *et al* 1992).

Ninguna de las teorías presentadas pueden por sí solas dar cuenta de los cambios producidos durante el envejecimiento especialmente en organismos altamente complejos como los humanos. En realidad debería considerarse al envejecimiento como el resultado de muchos procesos interactivos, interdependientes y sincronizados que determinan la buena salud y el tiempo de vida. Esto conduce al modelo del envejecimiento biológico en el cual se hacen estudios multifactoriales donde se consideran jerarquías en los procesos de envejecimiento y se estudian diversos parámetros según el nivel de envejecimiento estudiado como se puede apreciar en la fig I36 (Hofecker *et al* 1992, Cinader 1993).

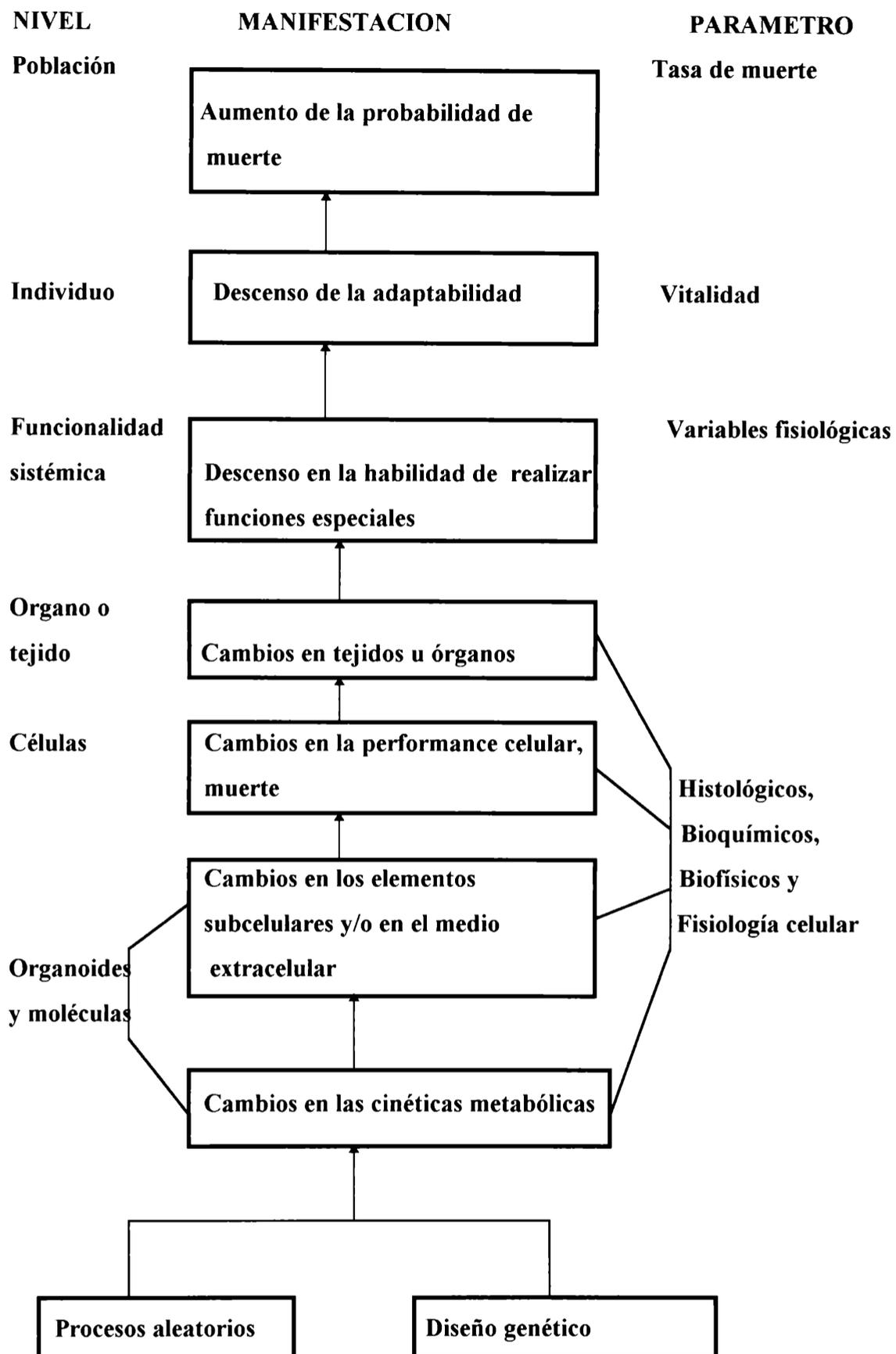


FIGURA I36: Niveles jerárquicos de los procesos de envejecimiento (Modificada de: Hofecker et al 1992).

3) ENVEJECIMIENTO ENDOCRINO:

El envejecimiento está asociado a muchos cambios hormonales. Algunos de estos cambios, como la deficiencia de estrógenos, están directamente relacionados

al envejecimiento, mientras que otros son secundarios a enfermedades del envejecimiento y cambios en el estado nutricional. Las teorías del envejecimiento proponen que muchos cambios sistémicos se deben a desbalances hormonales en especial en el sistema neuroendócrino. Aquí se mencionarán esos cambios sin hacer referencia a la etiología de mismos, los cuales se pueden resumir en la tabla I14.

TABLA I14: *Mecanismos relacionados a la disfunción endocrina que ocurre durante el envejecimiento (Modificada de: Mooradian 1993a y 1993b)*

TIPO DE CAMBIO	MECANISMO	EJEMPLOS
ANATOMIA DE LA GLANDULA ENDOCRINA	1) Muerte celular programada: 2) Enfermedades autoinmunes: 3) Tumores:	<i>a) deficiencia de estrógenos durante la menopausia</i> <i>a) tiroiditis de Hashimoto</i> <i>a) prolactinoma</i>
SECRECIÓN HORMONAL	1) Falla primaria de la secreción hormonal: 2) Cambios en la secreción hormonal secundaria a la disminución del aclaramiento o a la sensibilidad del tejido alterada: 3) Sensibilidad alterada a secretagogos o a estímulos inhibitorios:	<i>a) cambios en la secreción pulsátil</i> <i>b) cambios en los ritmos y estacionales</i> <i>c) falla en la síntesis hormonal</i> <i>a) falla renal</i> <i>b) falla en la sensibilidad de los barorreceptores al AVP</i> <i>a) baja liberación de insulina en respuesta a la glucosa</i>
CINETICA DE ACLARAMIENTO DE LA HORMONA	1) Cambios en la eliminación renal, hepática o tisular de la hormona:	<i>a) bajo aclaramiento de cortisol, aldosterona y testosterona</i> <i>b) bajo aclaramiento de hormonas tiroideas</i>
ACCIÓN HORMONAL	1) Cambios en la bioactividad de la hormona: 2) Cambios en el transporte de la hormona hacia el receptor: 3) Interacción hormona-receptor alterada: 4) Cambios post-receptor:	<i>a) disminución de la bioactividad de FSH, LH, TSH y PRL</i> <i>a) disminución del transporte de T₃</i> <i>a) cambios en la membrana plasmática</i> <i>b) cambios en las enzimas intracelulares que modulan los segundos mensajeros</i> <i>c) cambios en la movilización de calcio</i> <i>d) cambios en la expresión génica inducida por la hormona</i>

A) Cambios anatómicos de las glándulas endocrinas:

El envejecimiento se asocia con varios e importantes cambios estructurales en las glándulas endocrinas, algunos de ellos son el descenso en la vasculatura y el aumento en el contenido de tejido conectivo y del número de nódulos. También se encuentran cambios en la composición celular de la glándula durante el envejecimiento. En la hipófisis disminuye el número de eosinófilos y aumenta el de basófilos y células cromóforas, aumenta la probabilidad de adenomas, disminuye el número y en menor extensión el tamaño de las somatotrofas, existe hipertrofia y relativa hiperplasia de las tirotrofas en ratas viejas(20 meses) pero en las senescentes (29 meses) se reducen en número aunque aumentan en tamaño. En el caso de las gonadotrofas, el número desciende con la edad, pero en las ratas viejas su tamaño aumenta para luego disminuir drásticamente. El número de las lactotrofas aumenta en la rata hembra senil (la cual presenta además, un gran número de microadenomas prolactotrofos) pero no en el macho. El descenso de somatotropas durante el envejecimiento es la base racional para el uso de GH en las terapias de rejuvenecimiento de pacientes ancianos. Algunos de los cambios observados en otras glándulas se resumen en la tabla I15 (Mooradian 1993a, Cónsole *et al* 1994, Cónsole *et al* 1995, Cónsole *et al* 1997).

TABLA I15: *Cambios estructurales relacionados con el envejecimiento en algunas glándulas endocrinas humanas (Moralizan 1993a).*

GLANDULA ENDOCRINA	CAMBIOS ESTRUCTURALES
TIROIDES	Infiltración por células plasmáticas y linfocitos, fibrosis, aumento de nódulos, disminución del tamaño del epitelio folicular y pudiendo o no haber un aumento o descenso del peso de la glándula.
PARATIROIDES	Se incrementa el número de células oxífilas y de nódulos con células oxífilas grandes.
GLANDULA ADRENAL	Cambios fibróticos en la corteza, desaparecen las células epiteliales, acumulación de lipofucsina, fragmentación mitocondrial, presencia de adenomas y de hemorragias vasculares. Depleción celular de la zona reticularis.
PANCREAS	Pérdida de la estructura compacta del islote con hialinización y acumulación de amiloide. Aumenta la incidencia de tumores especialmente glucagonomas y somatostatonomas.
TESTICULOS	Adelgazamiento de la membrana de los túbulos seminíferos y del epitelio germinal. Fibrosis peritubular. Algunas áreas mantienen una espermatogénesis normal hasta que la senescencia es muy avanzada.
OVARIOS	Depleción de oocitos, esclerosis e hialinización de la médula.

La mayor parte de los cambios observados se producen por apoptósis, tumores o incidencia de enfermedades autoinmunes. Un gran número de células de Sertoli sufre apoptósis al declinar los niveles séricos de testosterona. La deficiencia del sistema inmune durante el envejecimiento se asocia al aumento de desarrollo de

tumores, susceptibilidad a infecciones y aumento de la incidencia de autoanticuerpos (Mooradian 1993a).

B) Cambios en la secreción hormonal:

Los cambios en la secreción hormonal durante el envejecimiento son el resultado de la alteración de la fisiología de la célula endocrina más que de su depleción. La secreción de algunas de las hormonas hipofisarias se altera como resultado de cambios de la función hipotalámica. El aumento de PRL plasmática durante el envejecimiento se debe en parte al descenso en la actividad de la tirosina hidroxilasa y al aumento en la actividad de la monoamina oxidasa lo que conduce a una reducción en los niveles de dopamina hipotalámica. También existen cambios hipotalámicos en la liberación de opioides endógenos hipotalámicos que alteran la secreción de PRL y otras hormonas hipofisarias que pueden afectar el patrón pulsátil de secreción, el ritmo circadiano o la velocidad de síntesis de las hormonas hipofisarias (Mooradian 1993a).

Virtualmente todas las hormonas hipofisarias se secretan de manera pulsátil y manifiestan un ritmo diurno. Muchos de los cambios relacionados con el envejecimiento en la función hipofisaria se deben no sólo a variaciones en la concentración promedio de la hormona sino también a cambios en el patrón de secreción diurno y pulsátil de las hormonas. En ratas viejas la amplitud de secreción de FSH es menor al 50 % de la encontrada en las ratas jóvenes. La frecuencia y nadir de los pulsos de GH no cambia con la edad, pero la amplitud de los pulsos y secreción en 24 hs. se reducen y aunque las hembras tienen basales mayores que los machos, la amplitud de sus picos es significativamente menor. Los niveles de IGF-1 se correlacionan con la cantidad total de GH secretada más que con la amplitud de los picos. El patrón pulsátil de LH depende de la especie estudiada, en humanos la amplitud de LH se reduce o no cambia y la frecuencia se mantiene pero en ratas se reduce la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH. En ratas Fischer 344 la amplitud de los pulsos de ACTH se reducen con el envejecimiento. En ratas Sprague-Dawley la amplitud de los pulsos de TSH decrecen con el envejecimiento y los de corticosterona se incrementan. En el hombre la frecuencia de TSH no se altera pero la amplitud de los pulsos se reduce en los ancianos y los niveles de cortisol no se alteran. Tanto en la mujer como en el hombre senescente, la amplitud de los pulsos de dehidroepiandrosterona (DHEA) se encuentran reducidos. Los cambios pulsátiles tienen un papel importante como determinantes del envejecimiento de la capacidad reproductiva de la hembra ya que se pierde la sincronía y precisión en el ritmo pulsátil de LH como consecuencia de alteraciones en la amplitud y frecuencia de GnRH. Norepinefrina es un importante modulador de la liberación de GnRH mediado por receptores α_1 -adrenérgicos. Estos receptores mantienen un

ritmo diurno de densidad en los núcleos preóptico y supraquiasmático (que son las áreas responsables de mantener los ritmos biológicos); la alteración en el recambio de norepinefrina y pérdida del ritmo diurno de densidad de receptores modifican la liberación de GnRH que da comienzo a la pérdida de ciclicidad e infertilidad de las ratas hembras envejecidas (Mooradian 1993a, Wise 1994).

Además de existir cambios en el ritmo circadiano también se modifica la secreción estacional de las hormonas durante el envejecimiento. En monos se pierde la ritmicidad estacional al envejecer. En las ratas se retrasa la temporada en la que los pulsos de LH y PRL son máximos y además se aplanan la curva estacional de secreción de LH y FSH al envejecer. En hamsters senescentes se retrasa la aparición el pico anual de serotonina y de serotonina N-acetiltransferasa en la pineal. En humanos se pierde el ritmo anual de FSH y cortisol (libre y total), se mantiene el de LH y 18-hidroxi-11-deoxicorticosterona al envejecer. Durante la senescencia surge un ritmo anual de PRL que no se observa en el hombre a cualquier edad ni en la mujer joven (Mooradian 1993a).

Algunos cambios en la función endocrina asociados al envejecimiento pueden deberse a alteraciones en la síntesis o secreción hormonal. Estos pueden deberse a un bloqueo primario las vías biosintéticas o secundarios a una estimulación reducida por los factores tróficos. Como ejemplos de bloqueo primario durante el envejecimiento se puede citar la reducción de la secreción de DHEA, calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol), TRH y posiblemente testosterona. Como ejemplo de estimulación secundaria reducida se tiene la secreción de aldosterona, FSH, LH, GH y producción de testosterona. La disminución progresiva con la edad de la secreción basal y de la secreción estimulada por ACTH de DHEA se debe a una reducción en la actividad enzimática de la 17,20-desmolasa y a la pérdida de células de la zona reticularis. La reducción asociada al envejecimiento de la secreción basal de aldosterona tanto como la estimulada por ejemplo por restricción salina se debe a una reducción de alrededor del 50 % de la actividad de renina plasmática. La reducción de la producción de testosterona puede ser en parte primaria por bloqueo de la conversión de pregnenolona en testosterona por las células de Leydig, secundaria al descenso de la concentración plasmática de LH y en mucho menor medida a la reducción en el número de células de Leydig. Aunque en todas las personas ancianas sanas estudiadas los niveles séricos de PTH se encontraron elevados, no todos presentaron niveles de calcitriol disminuidos, pero en aquellos con bajos niveles de calcitriol se encontró una disminución en la actividad de la enzima 1α -hidroxilasa, que interviene en la síntesis renal de calcitriol a partir de 25-hidroxicolecalciferol, también una sensibilidad reducida de esta enzima a PTH y en menor proporción reducción de la función renal. Tanto la secreción como el contenido hipotalámico de TRH decrece con la edad, pero el ARNm para pre-pro-TRH se mantiene constante a lo largo de la vida, por lo que el defecto en su producción

puede estar en la traducción o en los procesos post-traduccionales. El descenso en la secreción de LH se debe a un descenso en la síntesis de LH- β ARNm, pero también e igual que para FSH una alteración en los pulsos de GnRH. El descenso de GH durante el envejecimiento se debe a una reducción de GH ARNm y también a una reducción en el número de receptores para GHRH en las somatotrofas y a un aumento de la inhibición por somatostatina. Aunque los niveles plasmáticos de PRL aumentan durante el envejecimiento, el contenido celular de PRL ARNm se reduce (Mooradian 1993a).

Otros cambios relacionados a la secreción hormonal durante el envejecimiento son producidos para compensar la sensibilidad de la célula blanco a la hormona o a un aclaramiento hormonal alterado y así mantener un estado estacionario en los niveles plasmáticos de la hormona. La secreción de cortisol decrece al envejecer justamente en la misma magnitud en que es degradado y de este modo se mantiene un estado estacionario en los niveles plasmáticos de cortisol y cortisol libre a pesar de la reducción en su aclaramiento con la vejez. El aumento en los niveles de PTH en ancianos se produce en respuesta a la reducción de la absorción intestinal de calcio y eventualmente a la reducción de la producción de calcitriol (Mooradian 1993a).

Muchos estudios muestran que las glándulas pueden o no tener una respuesta alterada a estímulos inhibitorios o a secretagogos, en la tabla I16 se muestran algunos ejemplos. La mayor parte de los test de la dinámica hipofisaria que utilizan hormonas tróficas se ven influenciados por el estado nutricional y la presencia de enfermedades, los cuales son problemas comunes en el geronte. La liberación de GH en respuesta a GHRH puede estar reducida en algunos pacientes sobre todo en aquellos que tienen sobrepeso. Aunque los niveles basales de FSH y LH aumentan con la edad, la respuesta a GnRH tiende a reducirse y a retardarse durante el envejecimiento. La respuesta de TSH a la administración de TRH depende del sexo, en la anciana la reducción de la respuesta es casi imperceptible mientras que en el anciano está significativamente reducida (Mooradian 1993a).

C) Cambios en la cinética de aclaramiento hormonal :

El envejecimiento está frecuentemente asociado a cambios significativos en la función renal y en menor medida en el metabolismo hepático, entonces las tasas de aclaramiento de varias hormonas están afectadas por el envejecimiento. No se tiene certeza si estos cambios son propios del envejecimiento o secundarios a insuficiencia renal o hepática. La mayor parte de las hormonas hipofisarias poseen vidas medias relativamente cortas entonces no sufren cambios en su tasa de aclaramiento.

TABLA I16: Cambios durante el envejecimiento de la sensibilidad glandular a secretagogos o a estímulos inhibitorios (Modificado de: Mooradian 1993a).

<u>TIPO DE ESTIMULO</u>	<u>TIPO DE RESPUESTA CON LA EDAD</u>	<u>HORMONA EVALUADA</u>	<u>RESPUESTA A:</u>
<u>SECRETAGOGOS</u>	SIN CAMBIOS	TSH	TRH en mujeres
		ACTH	CRH
		ACTH	hipoglucemia inducida por insulina
		ACTH	metirapona intravenosa
		Adrenalina	cambio postural
	DISMINUIDA	LH	citrato de clomifeno
		AVP	fisostigmina
		Noradrenalina	fisostigmina
		GH	arginina
		Cortisol	TSH
<u>INHIBITORIO</u>	AUMENTADA	TSH	TRH en hombres
		PRL	TRH
		GH	GHRH en algunas personas
		GH	hipoglucemia inducida por insulina
		GH	levodopa
	SUPRESION DISMINUIDA	GH	fisostigmina
		FSH, LH	GnRH
		Testosterona	hCG
		ACTH y corticosterona	CRH en ratas
		AVP	estimulación por presión
SUPRESION AUMENTADA	Hormonas tiroideas	TSH en monos	
	Aldosterona	ACTH	
	insulina	glucosa	
	Cortisol	CRH	
	AVP	hiperosmolaridad	
SUPRESION AUMENTADA	Noradrenalina	cambio postural	
	Cortisol	fisostigmina	
	β -endorfina	fisostigmina	
	Adrenalina	fisostigmina	
	PTH	hipocalcemia	
SUPRESION AUMENTADA	ACTH	dexametasona	
	LH	estrógenos	
	LH	testosterona en monos	
	Insulina	insulina exógena	
	LH	testosterona o dihidrotestosterona	
SUPRESION AUMENTADA	GH	somatostatina	
	Insulina	somatostatina	
	TSH	hormonas tiroideas	

Las tasas de aclaramiento de las hormonas tiroideas y esteroideas están significativamente reducidas en el geronte, entonces las vidas medias de éstas hormonas y sus metabolitos están aumentadas. La vida media de la insulina aumenta levemente, mientras que la del glucagón no sufre cambios durante el envejecimiento (Mooradian 1993a).

D) Cambios en la acción hormonal:

I) Cambios en la bioactividad de la hormona:

Existen discrepancias entre inmunorreactividad y bioactividad para varias hormonas peptídicas, sobre todo en estados patológicos como en la falla renal y en la insuficiencia hipotalámica. Al parecer, el envejecimiento también está asociado a una significativa reducción de la bioactividad de ciertas hormonas. Cuatro hormonas hipofisarias (PRL, FSH, LH y TSH) poseen una bioactividad reducida en los animales envejecidos. Estos cambios se relacionan con modificaciones post-traduccionales, esencialmente glicosilación, alteradas. En estas modificaciones parecen tener mucha importancia los factores hipotalámicos ya que se demostró que para que la bioactividad de LH sea normal, se requiere una secreción de GnRH con amplitud y frecuencia adecuadas. Aunque la inmunoreactividad de PRL crece con la edad su bioactividad decrece, pero el mecanismo que gobierna este proceso se desconoce. La bioactividad de las hormonas hipotalámicas también se modifica durante el envejecimiento, por ejemplo la β -endorfina hipotalámica de ratas viejas disminuye su bioactividad porque aumenta el porcentaje de la forma acetilada que es inactiva (Mooradian 1993b).

II) Cambios en el transporte de la hormona hasta su receptor:

La unión de las hormonas a proteínas plasmáticas también puede alterarse durante el envejecimiento. Por ejemplo la unión de la testosterona a proteínas plasmáticas aumenta con el envejecimiento, lo que reduce la biodisponibilidad de la misma por los tejidos blanco. También se encuentra alterado el pasaje a través de la barrera hematoencefálica y la captación hepática (por reducción del pasaje a través de la membrana plasmática) de T_3 pero no la captación por otros tejidos (Mooradian 1993b).

III) Cambios en la interacción hormona-receptor:

El envejecimiento se asocia con el aumento de la densidad (o número) de algunos receptores hormonales, disminución en otros o sin cambios de densidad en otros. En ocasiones se han reportado conclusiones contradictorias en el estudio de un mismo receptor, posiblemente debido a diferencias metodológicas y en la especie o cepa utilizada. En algunos casos las variaciones relacionadas con el envejecimiento en el número de receptores se deben a down- o up-regulation de los receptores como consecuencia secundaria al aumento o descenso respectivamente de los niveles hormonales. Pero podrían existir otros factores que alteren cuantitativa-

mente durante el envejecimiento este tipo de regulación, ya que la capacidad de los animales envejecidos de up-regulate el número de receptores es diferente a la de los animales jóvenes (Mooradian 1993b).

Otros receptores pueden cambiar su afinidad por la hormona durante el envejecimiento lo que también conduce a un cambio en la respuesta tisular a la hormona. La afinidad de los receptores β -adrenérgicos en pulmón, corazón y linfocitos decrece con la edad. En próstata y cerebro decrece el número y la afinidad de los receptores para andrógenos durante el envejecimiento. La reducción en la actividad de adenilato ciclasa y producción de GH por las somatotrofas durante el envejecimiento parece correlacionarse con un descenso en los sitios de alta afinidad y aumento de los de baja afinidad para GHRH (Mooradian 1993b).

IV) Cambios postreceptor en la acción hormonal:

La membrana plasmática cambia su contenido en lípidos durante el envejecimiento. Aumenta la relación colesterol: fosfolípidos con el consiguiente aumento en la microviscosidad de la membrana. Se reduce el contenido en ácidos grasos poli-insaturados presumiblemente porque los radicales libres les inducen peroxidación. El aumento en la microviscosidad de las membranas sinaptosómicas se correlaciona con el aumento del número de receptores β -adrenérgicos y de receptores para 5-HT y con la agregación de los receptores en ciertos dominios de membrana. Estos cambios en la microviscosidad de la membrana disminuyen la captación de 2-desoxiglucosa y glucosa y la movilización de calcio (Mooradian 1993b).

La actividad enzimática de las vías reguladas por las hormonas también está alteradas en animales envejecidos. La enzima mejor caracterizada es la adenilato ciclasa, la cuál parece estar reducida en varios tejidos de animales envejecidos. Esta disminución contribuye a reducir la respuesta de los tejidos a los agonistas β -adrenérgicos. Con el uso de estímulos no mediados por receptor, tales como nucleótidos de guanina, NaF y forskolin, se demostró que el envejecimiento se asocia a una reducción notable de la actividad de la adenilato ciclasa. La reducción asociada al envejecimiento en la liberación de insulina estimulada por glucosa se debe en parte a la reducción de la actividad de adenilato ciclasa y oxidación de glucosa por el islote. La reducción del AMPc en respuesta a la estimulación con GHRH podría contribuir a la reducción de la liberación de GH durante el envejecimiento. La reducción de la actividad de la adenilato ciclasa de la corteza renal estimulada por PTH sería responsable de la reducción del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ en animales viejos. Los cambios mencionados son probablemente alteraciones primarias asociadas al envejecimiento que afectan a la adenilato ciclasa o secundarias, que alteran el acople hormona-receptor a la adenilato ciclasa. Por el contrario, la reducción de la producción de testosterona por animales senescentes en respuesta

al estímulo con hCG parece ocurrir en una etapa distal a la producción de AMPc. La activación de la vía del IP₃ por agonistas α -adrenérgicos se encuentra reducida en parótidas de ratas viejas. Las actividades enzimáticas de la Na⁺/K⁺-ATPasa y de la 5'-nucleotidasa en corazón y las de las ATPasas Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺ en cerebro disminuyen al envejecer. En cultivos de células que requieren EGF para dividirse en sus últimos pasajes, la respuesta mitótica a éste factor disminuye como consecuencia de la pérdida de la capacidad de su receptor para autofosforilarse. En animales envejecidos la lipólisis inducida por glucagón está reducida por al menos tres causas: disminución en el número de receptores, reducción de la actividad de la adenilato ciclasa y además incremento en la actividad de la fosfodiesterasa. Por tanto debe procederse con cautela al atribuir un cambio en la respuesta hormonal durante el envejecimiento a un factor, por ejemplo en éste caso la reducción de la densidad de receptores (Mooradian 1993b).

La disminución en la movilización de calcio por la célula blanco de animales senescentes es otro factor que reduce la respuesta a la hormona. El efecto ionotrópico de los agonistas β -adrenérgico sobre el corazón y la baja liberación de K⁺ por la estimulación α -adrenérgica sobre la parótida se ven disminuidos durante el envejecimiento por la incapacidad de las células para movilizar calcio, pero si los reservorios intracelulares de calcio están llenos las diferencias asociadas al envejecimiento en la respuesta celular no son discernibles de las que muestran los animales jóvenes. Entre los mecanismos neuroendócrinos que muestran una deficiencia asociada al envejecimiento en la movilización de calcio se incluyen la liberación de DA luego de la estimulación colinérgica y la secreción de LH estimulada por GnRH. La baja respuesta en la liberación de insulina estimulada por glucosa se debe parcialmente a cambios en la interacción calcio-calmodulina o a cambios en el calcio libre citosólico que modulan los niveles de AMPc. La disminución de la entrada de 2-desoxiglucosa en timocitos estimulados con T₃ que se asocia al envejecimiento se debe a cambios en la cinética de entrada de calcio extracelular (Mooradian 1993b).

Muchas hormonas actúan sobre los tejidos modulando la expresión génica. Los estudios realizados muestran que la mayoría de los cambios en la regulación hormonal de la expresión génica ocurren a nivel pretraduccional en general regulando la velocidad de transcripción al alterar actividad de los factores de transcripción o por cambios intrínsecos de la capacidad de los genes para ser transcritos (por ejemplo por metilación de los genes). La inducción de α 2 μ globulina en el hígado de rata macho con andrógenos se reduce con la edad en forma correlacionable con el nivel de su ARNm y parece ser el resultado de cambios en la expresión del receptor hepático de andrógenos. Este cambio relativo al envejecimiento puede ser retardado por restricción calórica (la cual permite discernir que cambio endócrino es debido al envejecimiento o secundario a las enfermedades que se encuentran frecuentemente en los animales senescentes). La reducción dependiente de la

edad en la actividad de la enzima málica estimulada por T_3 se correlaciona con los cambios en los niveles de ARNm de ésta enzima sugiriendo que éste cambio ocurre a nivel pretraduccional (Mooradian 1993b).

Entonces, existen muchos mecanismos por los cuales pueden producirse cambios en la acción y secreción hormonal durante el envejecimiento. El mecanismo predominante cambia con la hormona estudiada, el tejido blanco y a veces con la especie, cepa y sexo estudiados. Los datos disponibles no permiten afirmar que proceso en la acción hormonal es de importancia capital para envejecer y aparentemente un único mecanismo no puede explicar los múltiples cambios que se producen en el sistema endócrino de los animales senescentes (Mooradian 1993b).

4) ENVEJECIMIENTO INMUNE

El sistema inmune, al igual que el endócrino, también declina con el envejecimiento. Como consecuencia de la inmunosenescencia del organismo aumenta la tendencia a contraer alguna enfermedad, ya sea ésta autoinmune, infecciosa o neoplásica. En general, la inmunidad humoral comienza a declinar tan pronto como el individuo alcanza la madurez sexual y se debe tanto a cambios en las células inmunes como en su entorno. La pérdida de células es el factor cuantitativo de la inmunosenescencia, pero a éste se le asocia uno cualitativo ya que cambian las proporciones entre las subpoblaciones de timocitos. Los cambios más importantes que se producen durante la inmunosenescencia son: cambios en la población de las células inmunes, involución del timo y aparición de enfermedades autoinmunes y neoplásicas. El comienzo, la magnitud y la velocidad de descenso en las funciones inmunes depende de la especie, la cepa y el estado inmunológico del animal previo a la inmunosenescencia. En general, la disminución de las funciones inmunes es más rápida cuanto menor es la vida media del animal. Aquellos individuos que poseen una función inmune menor que lo normal antes de alcanzar la madurez sexual, poseen una probabilidad de muerte mayor que aquellos que poseen una función inmune normal.

1) Alteraciones en las poblaciones de células T y NK durante el envejecimiento:

En ratones de la cepa C57BL/6, que poseen una larga vida, el número de células T se incrementa gradualmente desde el nacimiento, alcanza el valor máximo alrededor de los tres meses de edad y permanece constante hasta los 12 meses, momento en el cual comienza a declinar hasta la muerte, que se produce alrededor de los 24 meses. El porcentaje de células T $CD4^+$ permanece relativamente constan-

te en los estadios adulto y senescente, mientras que para las células T CD8⁺ declina constantemente durante el envejecimiento. La relación CD4⁺/CD8⁺ que es alta en el recién nacido, disminuye mientras el animal madura, pero se vuelve a incrementar durante el envejecimiento. Aunque el porcentaje de células CD4⁺ permanezca relativamente constante durante el envejecimiento, lo que se altera es la composición de distintos subgrupos celulares dentro de esta población. Por ejemplo, desciende el subgrupo que produce altas cantidades de IL-2 y está involucrado en las reacciones de hipersensibilidad retardada, mientras que aumenta el subgrupo que produce principalmente IL-4 e IL-6 y que interviene en las reacciones de reconocimiento antigénico. En el ser humano, el número de células T comienza a declinar durante la tercera década de vida pero lo hace lentamente hasta la séptima década y luego el descenso es más pronunciado. La relación CD4⁺/CD8⁺ y los subgrupos de células CD4⁺ se comportan como en el ratón. Es probable que la baja capacidad proliferativa de las células T se deba al descenso del subgrupo que produce altas cantidades de IL-2 y por otro lado que el incremento en el porcentaje del otro grupo sea responsable del aumento relativo de IgA e IgG séricos. Sin embargo, el descenso en el número de células T con la edad podría deberse en parte a una disminución en la densidad de receptores de IL-2 (IL-2R) y en la capacidad proliferativa de éstas células frente a IL-2 seguida por un incremento en el número de células apoptóticas como consecuencia de la disminución de las señales intracelulares en respuesta a IL-2. El descenso en el número de IL-2R por célula y producción de IL-2 durante el envejecimiento podría atribuirse a un aumento de la sensibilidad de las células T a la inhibición por PGE₂ producida probablemente por monocitos y macrófagos. La molécula de CD4 es la encargada de reconocer ciertas regiones invariantes de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, el cual se encuentra en la membrana plasmática de la célula presentadora de antígenos (APC), mientras que el complejo receptor de célula T (TCR)-CD3 reconoce el antígeno montado sobre el MHC. El complejo CD4-TCR-CD3 de la célula T activada, conduce a la estimulación mediada por la IL producida por la APC. La respuesta se regula porque el anticuerpo produce down regulation sobre el CD4 de las células T de animales jóvenes, pero en animales senescentes este sistema de regulación es deficiente, lo que podría conducir al desarrollo de linfomas de células B. La regulación deficiente de la densidad de CD4⁺ celular durante el envejecimiento puede deberse a la disminución de la fluidez de la membrana plasmática por el aumento en la peroxidación de sus lípidos o a una baja capacidad para responder a las señales mediadas por calcio, PKC y nucleótidos (Hirokawa *et al* 1992, Ponnappan *et al* 1992, Song *et al* 1993, Grubeck-Loebenstein *et al* 1994).

Las funciones citotóxicas (CD8⁺) y NK que representan los mecanismos de defensa contra células infectadas por virus y células tumorales disminuyen con la senescencia. En individuos normales la mayor parte de las células doble negativas

(CD4⁻CD8⁻) no B no monocíticas generados por la médula ósea durante el envejecimiento, son células NK (CD16⁺Leu7⁺). El número de células NK producidas por la médula ósea aumenta durante el envejecimiento como consecuencia de la tendencia a compensar la disminución concomitante en el número de células citotóxicas. Pero el número de células NK circulantes, esplénicas, tímicas y de otros tejidos puede estar disminuido debido a defectos en la compartimentalización y migración de las mismas. La actividad por célula de las células NK suele estar disminuida en el animal viejo (Homo-Delarche *et al* 1995).

II) Alteraciones en las células B durante el envejecimiento:

El número de células B en la circulación permanece constante o disminuye un poco en el hombre y el ratón durante el envejecimiento. En las placas de Peyer, bazo o nódulos linfáticos de ratón el número de células B puede aumentar, disminuir o permanecer constante según la cepa. En el ratón viejo suele estar disminuida la síntesis de anticuerpos policlonales y la respuesta a mitógenos, mientras que en humanos la respuesta a mitógenos puede ser normal durante el envejecimiento (Homo-Delarche *et al* 1995).

Los mecanismos que gobiernan el descenso en la inmunidad humoral durante el envejecimiento son complejos y dependen en parte de los linfocitos T_h que presentan una actividad defectuosa y de los linfocitos T_s que pueden presentar una actividad normal, disminuida o aumentada. El fallo en las células T_h ocurre como se explicó anteriormente y conduce a la estimulación de la proliferación monoclonal en detrimento de la policlonal debido a la deficiente down regulation sobre el CD4 de las células T_h. Además, las células B de animales senescentes aumentan su sensibilidad a estímulos supresores como los de la PGE₂ (Ponnappan *et al* 1992, Song *et al* 1993).

Las células B senescentes poseen disminuida la regulación mediada por el receptor de Fc y una densidad de receptores de inmunoglobulinas μ , γ y α disminuida. Debe señalarse que a pesar de que la transcripción y traducción en las células B se mantiene normal, éstas no responden normalmente a los estímulos activadores (Reap *et al* 1993).

En general, los niveles de IgG e IgA aumentan y los de IgM decrecen o no cambian durante el envejecimiento. A veces se encuentran niveles anormalmente altos de IgE. Aumentan también los niveles de autoanticuerpos contra tiroglobulina, proteínas nucleares, ADN y factor reumatoideo. Recientemente se demostró que en el ratón senescente está disminuida la eliminación de los linfocitos B autorreactivos ("delección clonal") y la respuesta policlonal como consecuencia de la alteración en el balance de las células T, alteración en la sensibilidad y respuesta de las células B y aumento en la producción de citoquinas inflamatorias (TNF, IFN,

IL-6 y TGF) por las células B. En ratones homocigotos para el gen *lpr* el envejecimiento les produce una alteración en la inmunidad humoral semejante al lupus eritematoso humano, caracterizado por un incremento en la actividad policlonal de autoanticuerpos dirigidos contra su cromatina, IgG y ADN monocatenario (Haq and Szewczuk 1992, Song *et al* 1993, Homo-Delarche *et al* 1995).

III) Alteraciones en las células fagocíticas y polimorfonucleares (PMN) durante el envejecimiento:

Se demostró que las funciones macrofágicas de quimiotaxis, fagocitosis y ataque y digestión intracelular no se alteran durante el envejecimiento. Por el contrario, disminuye la capacidad macrofágica para secretar IL-1 y aumenta la producción de PGE₂. Este aumento asociado a la edad en la producción de PGE₂ durante la senescencia sería responsable de inhibir la secreción de IL-1 por los macrófagos y la secreción de IL-2 y expresión de IL-2R por las células T. El número de células PMN y sus funciones de adherencia, quimiotaxis y fagocitosis puede mantenerse intacta o disminuida. La generación de radicales O₂[·] por éste tipo celular se encuentra disminuido en animales senescentes (Homo-Delarche *et al* 1995).

IV) Involución tímica durante el envejecimiento:

La involución tímica comienza a partir de la pubertad y se acentúa con la edad. Dicha regresión se asocia a una reducción del área cortical, cambios en las células epiteliales, infiltración por macrófagos, células plasmáticas y mastocitos y reemplazo del tejido tímico por tejido adiposo. Varios factores podrían determinar el tamaño del timo: 1) el número de células pre-T en la médula ósea, 2) la entrada de las células pre-T al timo, 3) el índice mitótico de los timocitos dentro de éste órgano y 4) la capacidad del microambiente tímico de promover la diferenciación de las células T. El número de células pre-T producido por la médula ósea es similar en ratones jóvenes y senescentes. La migración de las células pre-T al timo sólo declina en un 13 % entre el ratón recién nacido y el senescente. El índice mitótico de los timocitos de ratones C57BL/6 se reduce al 50 % al mes de edad y al 33 % a los 24 meses con respecto al nivel máximo del recién nacido. Mediante varias clases de experimentos se determinó que la capacidad del microambiente tímico de promover la diferenciación de los timocitos juega un papel clave en la involución tímica asociada al envejecimiento. Durante el envejecimiento cambia la capacidad de las células adherentes de secretar ciertos factores, algunos de los cuales todavía no están identificados, de modular la respuesta antigénica y mitogénica de los timocitos. Los niveles de timulina, timopoyetina y timosina α_1 decrecen durante el envejecimiento. La disminución en los niveles séricos de timulina se correlaciona con la

involución tímica y se debe a una disminución de la capacidad de las células epiteliales tímicas de secretar éste nonapéptido mas que a la destrucción tisular. Esta disminución de timulina acelera la aparición de las enfermedades autoinmunes y de las inmunodeficiencias asociadas al envejecimiento en varios modelos animales. La administración de timosina α_1 en animales senescentes pudo restaurar las funciones de sus células T y NK (Goya *et al* 1990, Hirokawa *et al* 1990, Goya *et al* 1992, Hirokawa *et al* 1992, Goya *et al* 1993, Goya *et al* 1995).

Varios autores han sugerido que el timo representaría un reloj biológico para el envejecimiento inmunológico, pero la alta sensibilidad de éste órgano a factores ambientales extrínsecos a él, tales como infecciones, dietas (especialmente zinc), estrés y cambios en las hormonas neuroendócrinas, le restan peso a ésta teoría (Fabris 1990).

Se demostró que la melatonina, principal neurohormona de la glándula pineal, puede afectar las funciones tímicas y la regulación del sistema inmune. La melatonina puede regular el recambio de zinc. Durante el envejecimiento los niveles plasmáticos de zinc y melatonina caen y la administración de éste catión puede restaurar las funciones inmunológicas. El tratamiento crónico con melatonina de ratones senescentes o el transplante de pineales de ratones jóvenes dentro del timo de ratones senescentes pudieron corregir la disminución de la función del timo endócrino, aumentar el peso del timo y su celularidad, también restauraron a valores de ratones jóvenes la expresión de los timocitos de fenotipo CD. A nivel periférico, pudieron restaurar el número y subtipo de los linfocitos circulantes y esplénicos. Estos tratamientos pudieron restaurar los niveles plasmáticos de zinc y aumentaron el tiempo de vida de los ratones. Al contrario, la lesión estereotáxica de pineales de ratones jóvenes o el transplante de pineales de ratones senescentes condujeron a una rápida involución del timo, alteración del número y subtipo de linfocitos circulantes y considerable reducción del tiempo de vida de éstos animales. En base a estos datos se ha sugerido que sería a nivel de la glándula pineal que se localizaría el marcapasos que gobierna el proceso de envejecimiento (Lesnikov *et al* 1992, Lesnikov and Pierpaoli 1994, Mocchegiani *et al* 1994, Pierpaoli and Regelson 1994).

El descubrimiento de que los sistemas inmune y neuroendócrino constituyen una red integrada sugiere que algunas alteraciones en los sistemas inmune y neuroendócrino durante el envejecimiento son mutuamente interdependientes incluso a muy avanzada edad. El tratamiento de animales viejos con tiroxina, GH o GnRH inducen el re-crecimiento del timo, la recuperación del timo endócrino con aumento de la secreción de timulina y de algunas de las funciones del sistema inmune. Los individuos viejos que padecen hipertiroidismo poseen una función endócrina del timo similar a las de un adulto joven. El transplante de timos neonatales en

animales senescentes corrige los niveles circulantes de tiroxina e insulina y la expresión de receptores β -adrenérgicos en el cerebro y otros tejidos. Estos y otros datos sugieren que la descoordinación entre el sistema inmune y el neuroendócrino es responsable de por lo menos de algunas de las disfunciones asociadas al envejecimiento. Se podría asumir que el acervo genético de un individuo está puesto a punto para asegurar correcciones fisiológicas en las interacciones entre los sistemas nervioso, inmune y neuroendócrino. Este mecanismo de control se iría agotando a medida que pasa el tiempo debido a que el individuo está expuesto a estímulos estresantes (psicoemocionales, sociales, químicos, antigénicos, etc.), los que varían cuali- y cuantitativamente de individuo a individuo. Esto explicaría las diferencias individuales en el control de la red homeostática que se observan a nivel individual durante el desarrollo y el envejecimiento. Entonces, la incidencia de enfermedades podría producirse por un pobre desarrollo de la red homeostática en el individuo y/o por la acumulación del desgaste que van produciendo los diversos estímulos estresantes que afectan al individuo a medida que pasa el tiempo. A medida que se pierde la capacidad de control homeostático la respuesta al siguiente estímulo estresante causa un mayor descontrol en la red y como consecuencia la probabilidad de incidencia de enfermedades crece exponencialmente a medida que se envejece.

Una alternativa a esta idea, que propone un plan genético único modificado por las variaciones debidas a modificaciones mediante estímulos aleatorios de la red, es que hasta la madurez sexual todos los cambios en el desarrollo estén genéticamente programados y que luego de la madurez sexual: a) exista un programa para el envejecimiento o b) no haya otro programa, pero que el anterior termine y a partir de allí la red se deje sujeta a las modificaciones aleatorias del entorno. Ambas ideas se apoyan en los mismos hechos experimentales y permanecen viables, siendo necesario un mayor aporte experimental para dilucidar cual de las dos es mas probable (Fabris 1990, Goya 1991).

OBJETIVOS

RESUMEN DEL ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE EL TEMA:

El campo de la neuroinmunomodulación ha experimentado un desarrollo explosivo durante los últimos años. La visión actual es que los dos principales sistemas integrativos de los animales superiores, el inmune y el neuroendócrino, funcionan coordinadamente como una red homeostática bidireccional. En gerontología, por otra parte, la declinación progresiva asociada al envejecimiento que se observa en las funciones inmune y neuroendócrina es considerada como un factor causal clave del envejecimiento sistémico en mamíferos (Meites *et al* 1987, Goya 1991). Aunque el estudio de la neuroinmunomodulación durante el envejecimiento está aún en sus albores, algunos de los resultados publicados sugieren un enorme potencial para el desarrollo de estrategias interventivas tendientes a restaurar funciones fisiológicas en mamíferos viejos por medio de manipulaciones neuroinmunes. Por ejemplo, se ha reportado que la inyección de linfocitos maduros de ratones normales en ratones enanos de la cepa Snell-Bagg o la reconstitución de su sistema linfoide con hormona de crecimiento (GH) y tiroxina (T_4) prolonga marcadamente la vida media de estos animales de vida breve (longevidad promedio: 5 meses). No sólo fueron corregidas las deficiencias inmunes sino que también otras características no inmunes asociadas al envejecimiento tales como el encanecimiento y caída del pelo, atrofia cutánea y subcutánea, cataratas bilaterales y el recambio celular reducido, fueron prevenidos en animales de 7 meses (Fabris *et al* 1972). En otros estudios se ha demostrado que el trasplante de timo neonatal en ratones viejos es capaz de corregir sus niveles séricos anormales de triiodotironina e insulina, al igual que la respuesta disminuida de sus glándulas submandibulares al isoproterenol (Pintanelli *et al* 1978). Asimismo se ha demostrado que el trasplante de timo neonatal en ratones viejos revierte la reducción asociada al envejecimiento en la densidad de adrenoreceptores β_1 en la corteza cerebral (Viticchi *et al* 1989) y que corrige, además, el incremento en el volumen nuclear promedio de los hepatocitos de animales viejos (Pieri *et al* 1980). Estos y otros resultados están generando un creciente interés en el estudio de las interacciones timo-neuroendócrinas durante el envejecimiento.

Hormonas tímicas y envejecimiento:

El timo endócrino produce una serie de sustancias inmunoregulatorias, algunas de las cuales resultan también activas sobre ciertos circuitos nerviosos y endócrinos (Hall *et al* 1985). Goya y colaboradores han demostrado que la timosina fracción 5

(TF5) y la hormona tímica homeostática (HTH), dos preparaciones tímicas de origen bovino, tienen actividad inhibitoria sobre la secreción de tirotrófina (TSH) en ratas jóvenes pero no en animales viejos (Goya *et al* 1987, Goya *et al* 1988, Goya *et al* 1989). Además, la administración intravenosa de HTH fue capaz de reducir la GH plasmática e incrementar los niveles circulantes de corticosterona en ratas jóvenes y viejas, aunque estas respuestas fueron mucho más débiles en los animales viejos (Goya *et al* 1989, Goya *et al* 1990). Estos resultados sugieren que el envejecimiento produce una progresiva desensibilización del sistema neuroendócrino a las señales químicas del timo. La preparación de HTH utilizada por Goya y col. en los estudios *in vivo* arriba citados consistió en un extracto tímico cromatográficamente homogéneo, también conocido como la preparación de Bernardi-Comsa. En 1985 Reichhart y col. (Reichhart *et al* 1985) purificaron exhaustivamente esta preparación logrando establecer que HTH consiste en dos cadenas polipeptídicas, HTHI y HTH β , cuyas secuencias aminoacídicas resultaron ser idénticas a las de las histonas H2A y H2B, respectivamente. Estos hallazgos alentaron la exploración, por un lado la actividad de las histonas y otras sustancias relacionadas, sobre la secreción de hormonas pituitarias y por el otro, el impacto del envejecimiento sobre estos efectos. En estos estudios el grupo argentino encontró que el péptido MB35 (que es idéntico a un fragmento de la histona H2A) y los complejos histona-ADN indujeron una significativa respuesta secretoria de ACTH en células hipofisarias dispersas de rata joven y en menor medida, en células de ratas maduras (Goya *et al* 1993). Estos hallazgos sugieren que ciertos complejos nucleoproteicos (nucleosomas) al ser liberados al medio extracelular podrían actuar como señales hipofisiotropas. Por otra parte la sensibilidad hipofisaria a estas señales parece disminuir con la edad.

Recíprocamente, la actividad endócrina del timo parece ser significativamente afectada por los desbalances asociados a la edad que ocurren en la función neuroendócrina. Esto ha sido particularmente bien establecido para la timulina (conocida previamente como "facteur thymique serique" o FTS), un nonapéptido tímico inmunoregulatorio, cuya estructura y regulación han sido estudiadas extensamente en Francia, por el laboratorio de la Dra. Mireille Dardenne, con quien el Dr. Goya posee una estrecha colaboración, (Bach *et al* 1976, Dardenne *et al* 1989, Dardenne and Savino 1990). Se sabe, por ejemplo, que en roedores viejos existe una correlación significativa entre la declinación en los niveles de T₄ y la reducción de FTS circulante (Fabris and Mocchegiani 1985). Además, el tratamiento de ratones viejos con T₄ (18) o extractos hipotalámicos de ratones jóvenes (Folch *et al* 1986) resultó en la reaparición de niveles detectables de FTS circulante (típicamente, la FTS cae a niveles plasmáticos no detectables en el ratón durante el envejecimiento). En perros viejos, el tratamiento con hormona de crecimiento bovina, restaura parcialmente sus deprimidos niveles circulantes de timulina (Goff *et al* 1987).

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Se propuso estudiar el efecto del envejecimiento sobre los ejes timo-hipofisarios: el tímico-tirotrófico, el tímico-gonadotrófico y el tímico-somatotrófico.

Los objetivos específicos fueron:

- 1.- Comparar las respuestas secretorias tirotrópica, gonadotropa, somatotropa y prolactotropa en células pituitarias dispersas de ratas jóvenes y viejas cuando se perfunden con: a) diferentes dosis de histonas, y nucleoproteínas b) los péptidos tímicos sintéticos MB-35 y timulina así como otros productos secretorios provenientes de distintas líneas de células epiteliales tímicas (TEC) las cuales se hallan bien establecidas en el laboratorio francés que participa en este proyecto.

- 2.- Evaluar a) la capacidad de distintas dosis de los productos tímicos e histonas arriba mencionados para inducir la liberación de prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), hormona luteinizante (LH), hormona folículoestimulante (FSH) y tirotrófina (TSH) en células hipofisarias de ratas jóvenes y senescentes incubadas durante distintos tiempos con los productos arriba mencionados, b) la posibilidad de bloquear la actividad de la timulina y de la histona H3 con anticuerpos específicos generados contra éstas sustancias, c) las interacciones entre timulina e histonas con secretagogos específicos de las hormonas hipofisarias mencionadas, hormona liberadora de tirotrófina (TRH), hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), péptido liberador de hormona de crecimiento-6 (GHRP-6), d) que posibles segundos mensajeros (AMPc, calcio, diacilglicerol o inositoltrifosfato) estarían involucrados en la acción de éstas sustancias.

- 3.- Evaluar a) las posibles diferencias entre los niveles de DNA sérico entre ratas jóvenes y senescentes y b) si las histonas y el DNA pueden actuar como secretagogos de las hormonas hipofisarias *in vivo* utilizando como sistema experimental el de ratas canuladas conscientes y libres de estrés.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1) REACTIVOS Y DROGAS

La mayor parte de las drogas y reactivos usados fueron de grado analítico o ACS.

Sustancia: Origen

Acido ascórbico: Sigma Chem. Co.

Acido clorhídrico: Mallinckrodt.

Acido desoxirribonucleico (DNA): Sigma Chem. Co.

Anticuerpo anti - histonas (H1 + H3) (NT2): Dr. Allan L. Epstein, Univ. So. Calif. Sch. Med. Dept. Phatol., USA

Anticuerpo anti - timulina: Dra. Mireille Dardenne, Hôpital Necker, Paris, Francia.

Aprotinina (Trasylol): Bayer.

Azida de sodio: Sigma Chem. Co.

Azul Tripán: Sigma Chem. Co.

Bicarbonato de sodio: Anedra.

Bisbenzimidazole (Hoechst H 33258): Sigma Chem. Co.

Biogel P-2: Bio - Rad.

Cafeína anhidra: Sigma Chem. Co.

Carbonato de sodio: Mallinckrodt.

Cloroformo: Anedra.

Cloruro de litio: Carlo Erba.

Cloruro de sodio: Carlo Erba.

Cloruro de zinc: Sigma Chem. Co.

Colagenasa tipo IV: Sigma Chem. Co.

Desoxirribonucleasa I (DNAsa I): Sigma Chem. Co.

1,9-Didesoxiforskolin: RBI International.

EDTA: Carlo Erba.

EGTA: Sigma Chem. Co.

Estreptomina: Sigma Chem. Co.

Facteur thymique serique (FTS): Dra. M. Dardenne.

Fluoruro de sodio: Mallinckrodt.

Forskolin: RBI International.

Fosfato dibásico de sodio heptahidrato: Sigma Chem. Co.

Fosfato monobásico de sodio monohidrato: Sigma Chem. Co.
Glicerol: Sigma Chem. Co.
Glucosa: Sigma Chem. Co.
Hidróxido de sodio: Carlo Erba.
Histona H2A: Sigma Chem. Co.
Histona H2B: Sigma Chem. Co.
Histona H3: Sigma Chem. Co.
Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH o LHRH): Sigma Chem. Co.
Hormona liberadora de somatotrofina (GHRH): Sigma Chem. Co.
Hormona liberadora de tirotrófina (TRH): Sigma Chem. Co.
Iodógeno: Pierce.
[¹²⁵I]-Ioduro de sodio: NEN.
Ionóforo A23187: Sigma Chem. Co.
Nucleohistona: Sigma Chem. Co.
Penicilina: Sigma Chem. Co.
Péptido liberador de hormona de crecimiento-6 (GHRP-6): Dres. Felipe Casanueva y Carlos Dieguez, Lab. de Endocrinología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Univ. de Compostela, Santiago de Compostela, España.
Péptido MB - 35: Dr. Allan Goldstein Dept. Biochem., The George Washington Univ. Med. Center, USA.
Poli-lisina (Poly-Lys) PM 8,8 kDa: Sigma Chem. Co.
Proteína A : Sigma Chem. Co.
Reactivo de Folin-Ciocalteau: Anedra.
Sephacryl S-200: Sigma Chem. Co.
Seroalbúmina bovina (BSA): Sigma Chem. Co.
Sephadex G-25 (Columnas PD-10): Pharmacia Biotech.
Sobrenadantes de cultivos de células epiteliales tímicas (TEC) de rata: Dra. M. Dardenne.
Sobrenadantes de cultivos de células epiteliales tímicas (TEC) de ratón: Dra. M. Dardenne.
Solución Salina Balanceada de Earle (EBSS): Sigma Chem. Co.
Sulfato de cobre pentahidrato: Merck.
Tartrato de sodio y potasio: Anal Quim.
Timosina fracción 5 (TF5): Dr. Allan Goldstein
Trifluoroperazina: RBI
Tripsina: Difco.
Tris: Sigma Chem. Co.
Tritón X-100: Mallinckrodt.

2) EQUIPOS

Agitador magnético-calentador GCA Corporation

Balanza analítica con precisión de 0,1 mg Mettler tipo H6T

Balanza de torsión Torbal

Bomba peristáltica Gilson modelo M312

Centrífuga International Equipment Co. modelo UV

Centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC-2

Centrífuga Rolco modelo CM36R

Colector de fracciones Gilson modelo FC-100K

Contador gama Tracor Analytic modelo 1191

Espectrofotómetro Hitachi modelo 100-40

Espectrofluorómetro Aminco modelo SPF-125

Estufa de laboratorio Hidrogenión

Fabricadora de hielo Scotsman modelo AF-20

Freezer hasta -20 °C Kent

Freezer hasta -80 °C Forma Scientific

Incubador metabólico con agitador GCA Corporation

Microcentrífuga Eppendorf modelo 5410

Microprocesador Hewlett-Packard 41CX

Microscopio Ernst Leitz GMB Wetzlar

pHímetro Wissenschaftl-Techn Werkstätten

Refrigerador Turena

Vortex Precytec

3) MISCELANEA

Agujas 20G1 y 21G1 Terumo Corporation

Cánulas de polietileno de uso quirúrgico de 1,5 mm de diámetro exterior C&R

Guillotina Harvard Apparatus

Hemacitómetro American Optical

Jeringas de 2, 5 y 10 ml Prexajet

Material de plástico: tubos de Kahn, tubos 72, tubos 52 y vasos graduados Polistor

Material de vidrio: vasos de precipitado, probetas, matraces aforados, matraces de Erlermeyer y pipetas IVA y Pirex

Pipetas de 0,5 10, 10 100 y 100 1000 Eppendorf

Pipetas multidispensadoras Eppendorf

Pipetas P-20, P-100, P-200, P-1000 y P-5000 Gilson

Tijera para cirugía ocular Moira

Tubos para microcentrífuga de 0,5 y de 1,5 ml Eppendorf

Tweezers y tijeras Dumoxel

METODOS

1) ANIMALES

Se utilizaron ratas hembras jóvenes (4 meses), adultas (10 meses) y senescentes (31 meses) de la cepa Sprague-Dawley. Las mismas fueron gentilmente provistas por Laboratorios Bagó, Argentina con una edad de 2 meses y se dejaron envejecer hasta la edad adecuada para realizar los experimentos en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP a una temperatura de 22 ± 2 °C y con un ciclo luz/oscuridad de 14:10 horas. El alimento y el agua estuvieron disponibles *ad libitum*.

2) OBTENCION DE CELULAS DISPERSAS DE ADENOHIPOFISIS DE RATA

Ocho a doce ratas se decapitaron entre las 8 y 9 horas de la mañana, se recogió la sangre (un tubo por animal), la que se dejó coagular, se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 min. y el suero obtenido se guardó a - 20 °C hasta el momento de realizar los ensayos hormonales. Se separó con tijera la piel de la región craneana y luego se cortó el cráneo de manera de exponer el cerebro, mediante la introducción de la tijera por el agujero occipital y cortando la calota por los surcos que hay a la derecha y a la izquierda, empujando la punta de la tijera hacia arriba para no dañar el cerebro y luego levantando la calota a fin de exponer el cerebro (Fig. M1A). Se cortaron los nervios ópticos y se levantó cuidadosamente el cerebro (Fig. M1B). Con una pinza se removió la duramadre que recubre la silla turca donde se aloja la hipófisis (Fig. M1C). Una vez hecho esto, se extrajo la hipófisis con sumo cuidado, se pesó y se colocó en una cápsula de Petri conteniendo Solución Salina Balanceada de Earle (EBSS) correctamente diluida con agua destilada según lo indicado por el proveedor. A esta solución se le agregó además 2 g/l de glucosa, 0,5 % de seroalbúmina bovina (BSA), 30 µg/ml de ácido ascórbico, 20 µg/ml de penicilina y 30 µg/ml de estreptomina (Fig. M1D). Luego se separó el lóbulo posterior de la adenohipófisis (Fig. M1F). Una vez obtenidas todas las adenohipófisis, éstas se seccionaron en 8 porciones.

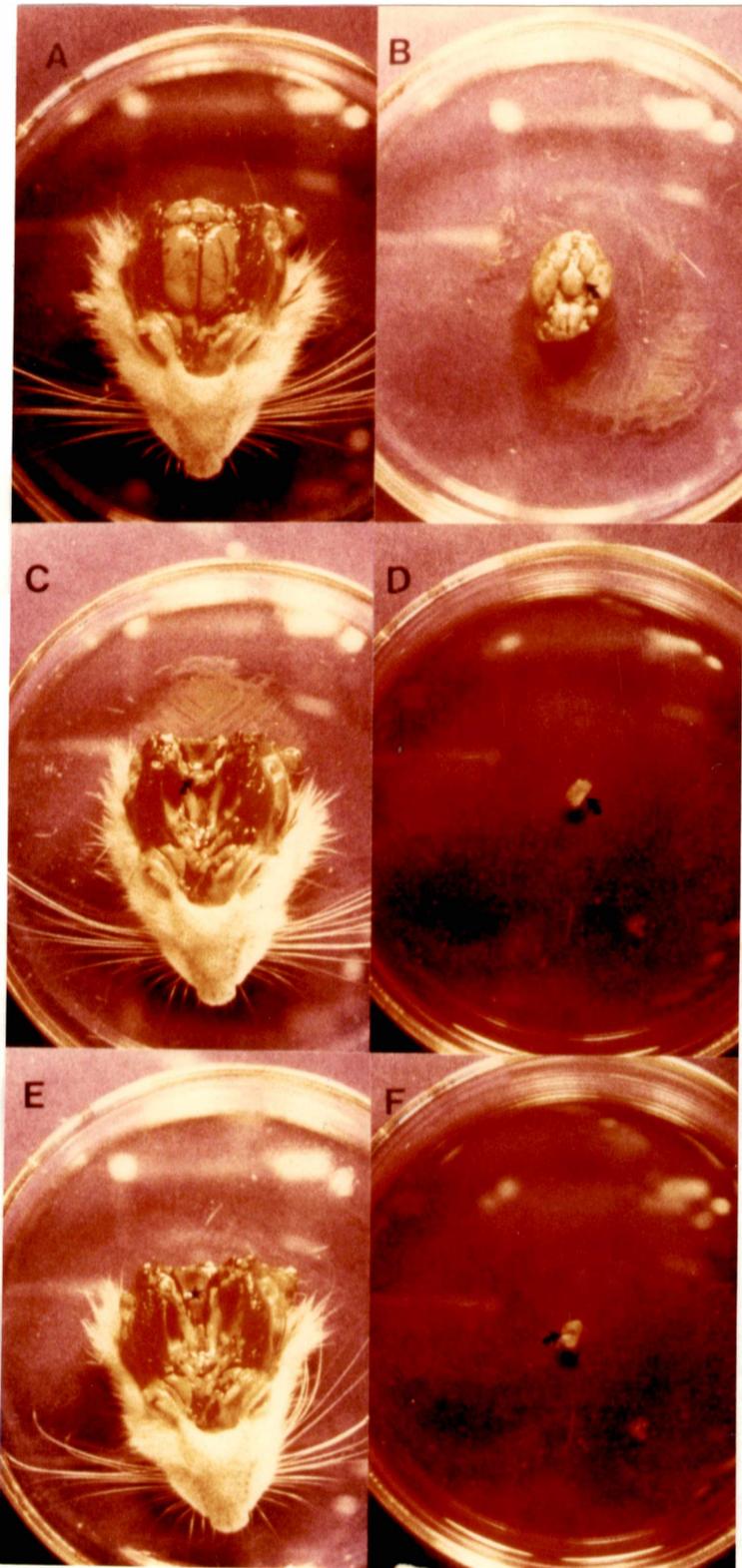


FIGURA M1: *Disección de la hipófisis en la rata. A) luego de eliminar la calota queda expuesto el cerebro, B) cerebro visto desde la región inferior, la flecha curva señala el hipotálamo, C) al remover el cerebro queda expuesta la hipófisis recubierta por la duramadre donde lo señala la flecha curva, E) el asterisco muestra el lugar que ocupó la hipófisis luego de su remoción, la silla turca, D) adenohipófisis con su porción neurointermedia, F) adenohipófisis luego de remover la neurointermedia donde muestra la flecha curva.*

A) Dispersión celular con tripsina

Las secciones se colocaron en un tubo de plástico con tapa conteniendo 8 ml del medio arriba mencionado con el agregado de 5 mg de tripsina y 5 mg de desoxirribonucleasa I (DNasa tipo I). El tubo se colocó en un incubador a 37 °C bajo agitación continua durante una hora.

B) Dispersión celular con colagenasa

Las secciones se colocaron en un tubo de plástico con tapa conteniendo 8 ml del medio arriba mencionado con el agregado de 30 mg de colagenasa tipo IV y 5 mg de DNasa tipo I. El tubo se colocó en un incubador a 37 °C bajo agitación continua durante una hora.

En ambos casos (*A* y *B*), se procedió a la dispersión celular, primero groseramente con una pipeta de vidrio de 5 ml y luego con una pipeta Pasteur con la punta flameada con el objeto de eliminar las superficies cortantes para evitar rotura celular. Luego la suspensión celular se pasó a través de una malla de 100 μm para eliminar fragmentos de tejido y grandes agregados celulares. Todos los sobrenadantes se centrifugaron a 1000 rpm (150 g) en una centrífuga refrigerada a 4 °C durante 15 a 20 min, los sobrenadantes se descartaron y los pellets se resuspendieron en el volumen adecuado de medio de incubación (MI) que contenía EBSS con los agregados mencionados en el inciso A) y 50 KIU/ml (7 $\mu\text{g/ml}$) de aprotinina (Trasylol, Bayer).

Se tomó una alícuota de 50 μl para estimar la viabilidad celular y otros 100 μl para determinar el contenido de DNA de la suspensión celular.

C) Determinación de la viabilidad celular

Las células se contaron utilizando una cámara cuenta glóbulos de Neubauer, con microscopio binocular. La viabilidad celular se estimó utilizando el colorante Azul Tripán al 0.4 % en solución salina (9 g/l de NaCl). A 50 μl de cada suspensión celular se le agregó 50 μl de solución de Azul Tripán, se mezcló con suave agitación y se contaron las células totales y viables dentro de los 10 minutos.

Según se muestra en la figura M2, la dispersión celular con colagenasa permite obtener un mayor porcentaje de células viables que mediante el uso de tripsina. Por esta razón, se optó por el uso de la dispersión celular con colagenasa en los experimentos subsiguientes.

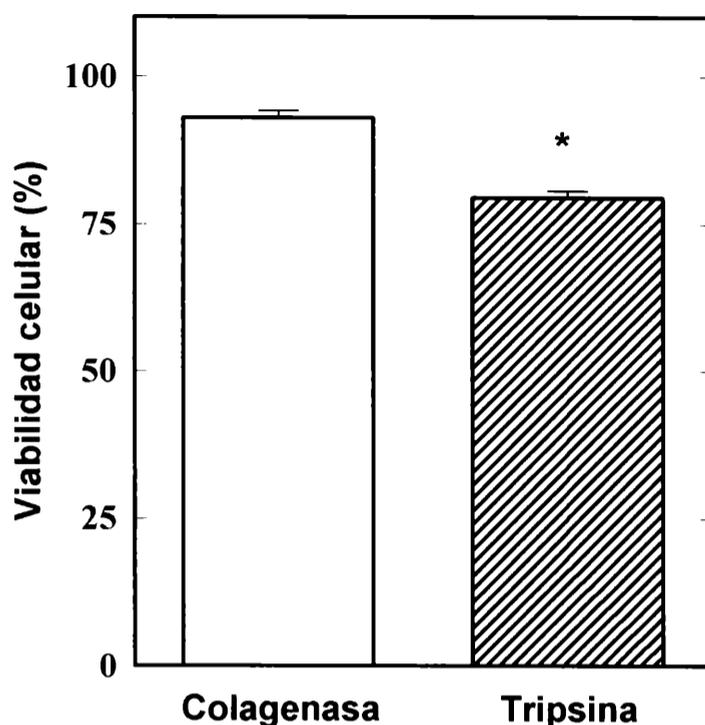


FIGURA M2: *Porcentaje de viabilidad celular según el método del azul tripán, luego de dispersar las células hipofisarias luego de una hora de tratamiento de las hipófisis de ratas hembras con 0,63 mg/ml de colagenasa o de tripsina respectivamente. En este sistema, el porcentaje de viabilidad obtenido por medio del tratamiento con colagenasa fue mayor ($p < 0,05$, $n = 4$) que mediante el uso de tripsina. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$.*

3) DETERMINACION DEL CONTENIDO DE DNA

Para determinar la concentración de DNA en homogenatos celulares se utilizó el método de Brunk (Brunk *et al* 1978). El mismo posee una sensibilidad del orden del ng y una alta especificidad. Es un método fluorométrico que utiliza como colorante fluorescente el bisbenzimidazole (Hoechst H 33258) el cual incrementa unas 20 veces su fluorescencia cuando se compleja con el DNA; ningún otro componente celular produce una fluorescencia significativa. El método es lineal hasta una concentración de 1 mg/ml de DNA y no es afectado por el pH en un rango de 5 a 10 unidades. Además, debido al empleo de un estándar interno este método evita el apagamiento (quenching) debido a los componentes celulares o el buffer. La longitud de onda de excitación es de 365 nm y la de emisión es de 450 nm.

Se preparó una solución de DNA puro, en agua destilada, se determinó su concentración midiendo absorbancia a 260 nm (1 mg/ml DNA posee una $A_{260} = 20$, según lo indicado en la planilla de control de calidad de SIGMA), se ajustó su concentración a 20 $\mu\text{g/ml}$ y se alicuotó en tubos Eppendorf de 500 μl . Cada alicuota se mantuvo a -20°C hasta el momento de su uso.

En el buffer de trabajo, constituido por 100 mM NaCl, 10 mM EDTA y 10 mM Tris pH = 7, se disolvió el Hoechst H 3358 a una concentración de 100 ng/ml.

En cada determinación, se colocaron 3 ml de buffer en la cubeta del espectrofotómetro y se midió la fluorescencia sin homogenato, luego se agregó 15 μ l del homogenato celular y se midió la fluorescencia. Esto fue seguido por una segunda, tercera y cuarta adición de homogenato. Luego se agregó 4 veces 15 μ l de estándar y se midió en cada caso la fluorescencia. Finalmente, se trazo el gráfico fluorescencia en unidades arbitrarias (%) vs. volumen (μ l) del homogenato o el estándar. Por comparación de las pendientes que determinaron ambas rectas se pudo calcular la concentración de DNA en cada homogenato, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de DNA } (\mu\text{g/ml}) = 20 \times m_h / m_s$$

siendo:

m_h = pendiente de la recta obtenida al agregar el homogenato

m_s = pendiente de la recta obtenida al agregar el estándar.

Según se aprecia en la figura M3, la existencia de una alta correlación entre el conteo celular y la determinación de su contenido de DNA permitió que en todos los experimentos se determine dicho contenido con el fin de estandarizar la cantidad de hormona liberada como ng hormona/ μ g DNA.

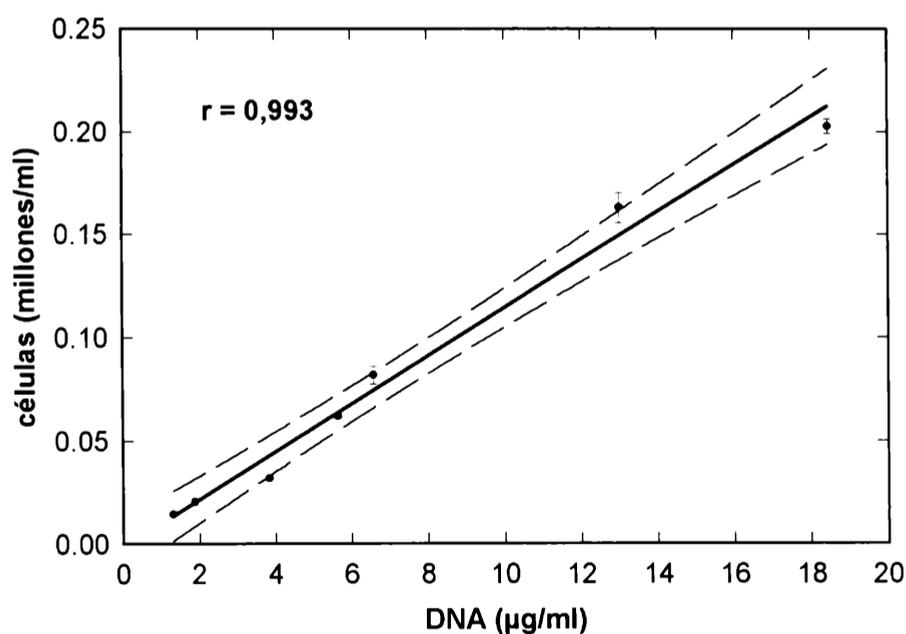


FIGURA M3: Grado de correlación existente entre el conteo de células hipofisarias de ratas jóvenes mediante el uso de una cámara de Neubauer y la determinación de DNA hipofisario total en 4 experimentos independientes en cada uno de los cuales las determinaciones se realizaron por triplicado. En línea continua se indica la recta obtenida por medio del análisis de regresión y en línea de trazos su corredor de errores para un nivel de correlación del 95 %. ($n = 4$).

4) PERIFUSION CELULAR

Cada suspensión celular preparada como se indicó anteriormente se mezcló con 750 mg de Biogel P-2, malla: 200 - 400, que previamente se había hidratado toda la noche con 10 ml de EBSS e inmediatamente antes de su uso se le eliminó el medio sobrenadante y se degaseó en un desecador al cual se le hizo vacío con una bomba de vacío. La mezcla de células dispersas y Biogel preparada como se indicó, se introdujo en una jeringa plástica de 2,5 ml (columna), aspirando la mezcla dentro de la columna y dejándola sedimentar, luego se removió el exceso de fluido y se procedió a cargar más mezcla repitiendo la operación hasta que todo el Biogel fue empaquetado y el exceso de medio eliminado. La mezcla de células y Biogel se empaquetó la mezcla en un volumen final de aproximadamente 2 ml. El émbolo de cada columna estuvo atravesado por la punta de un tip Eppendorf de 10 μ l que fue luego, cortado a ras del émbolo. Una malla de nylon de 10 μ m de tamaño de poro fue colocada sobre el émbolo para evitar pérdida de células y partículas a través de la columna. El otro extremo del émbolo fue ligado a una cánula plástica por medio de una resina epoxi (Poxipol®). Cada columna estuvo colocada en forma vertical y el MI fue bombeado desde la punta hacia el émbolo mediante una bomba peristáltica cuyo flujo fue ajustado a 1 ml/min, manteniéndose el volumen muerto entre 0,1 y 0,2 ml. En cada experimento se usaron 2 columnas sincronizadas en paralelo, siendo la longitud de la tubuladura la misma para ambos circuitos. Las columnas se mantuvieron en un baño de agua a 37 °C (Fig. M 4 y M5) y se hizo control de pH del MI durante todo el experimento.

Las columnas se dejaron perfundiendo con MI por 4 hs. a fin de estabilizar el sistema. Luego las sustancias a ser testeadas (estímulos), disueltas en MI fueron bombeadas a través de las columnas por espacio de 3 min, dejando un intervalo de 30 min. entre los sucesivos estímulos, período durante el cual se bombeó MI solo. Al final de cada columna un colector de fracciones recogió fracciones de perifusato de 1 ml. Ambos colectores de fracciones fueron sincronizados de tal manera que los mismos cambiaran simultáneamente de tubo. Las fracciones recogidas se guardaron a - 20 °C hasta el momento de realizar los ensayos hormonales.

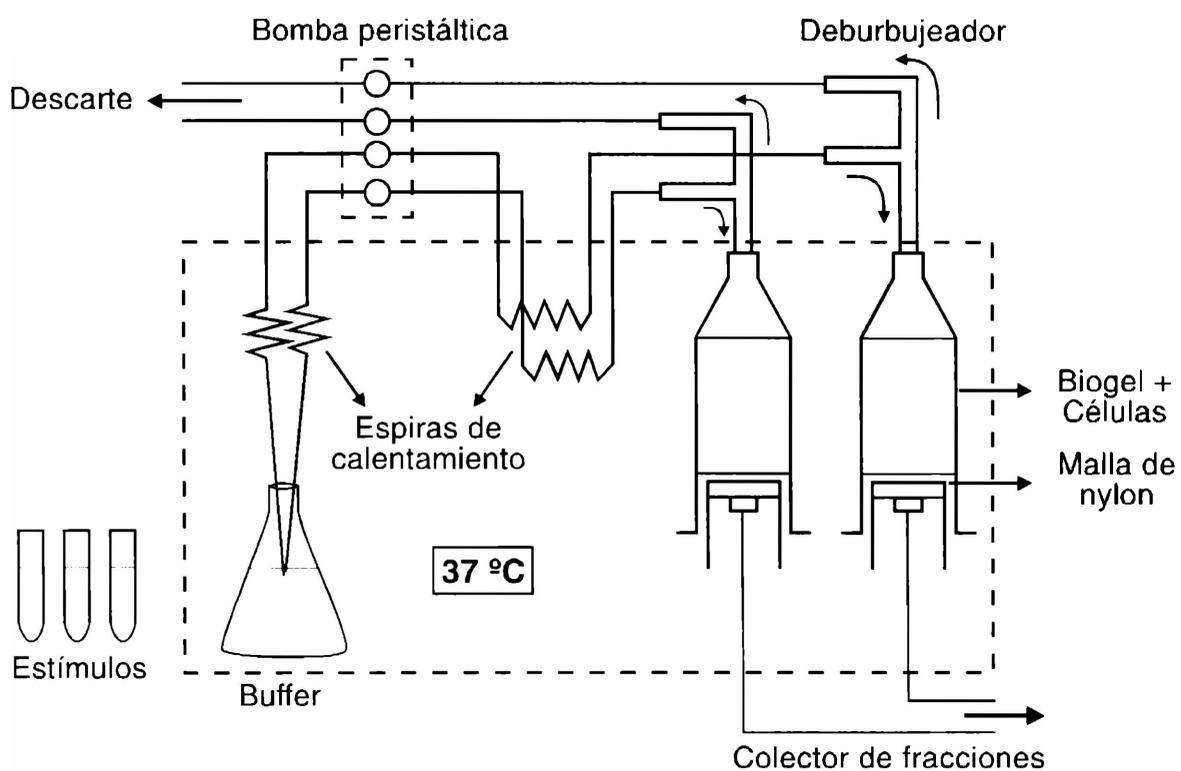


FIGURA M4: *Diagrama del sistema de perfusión utilizado.*

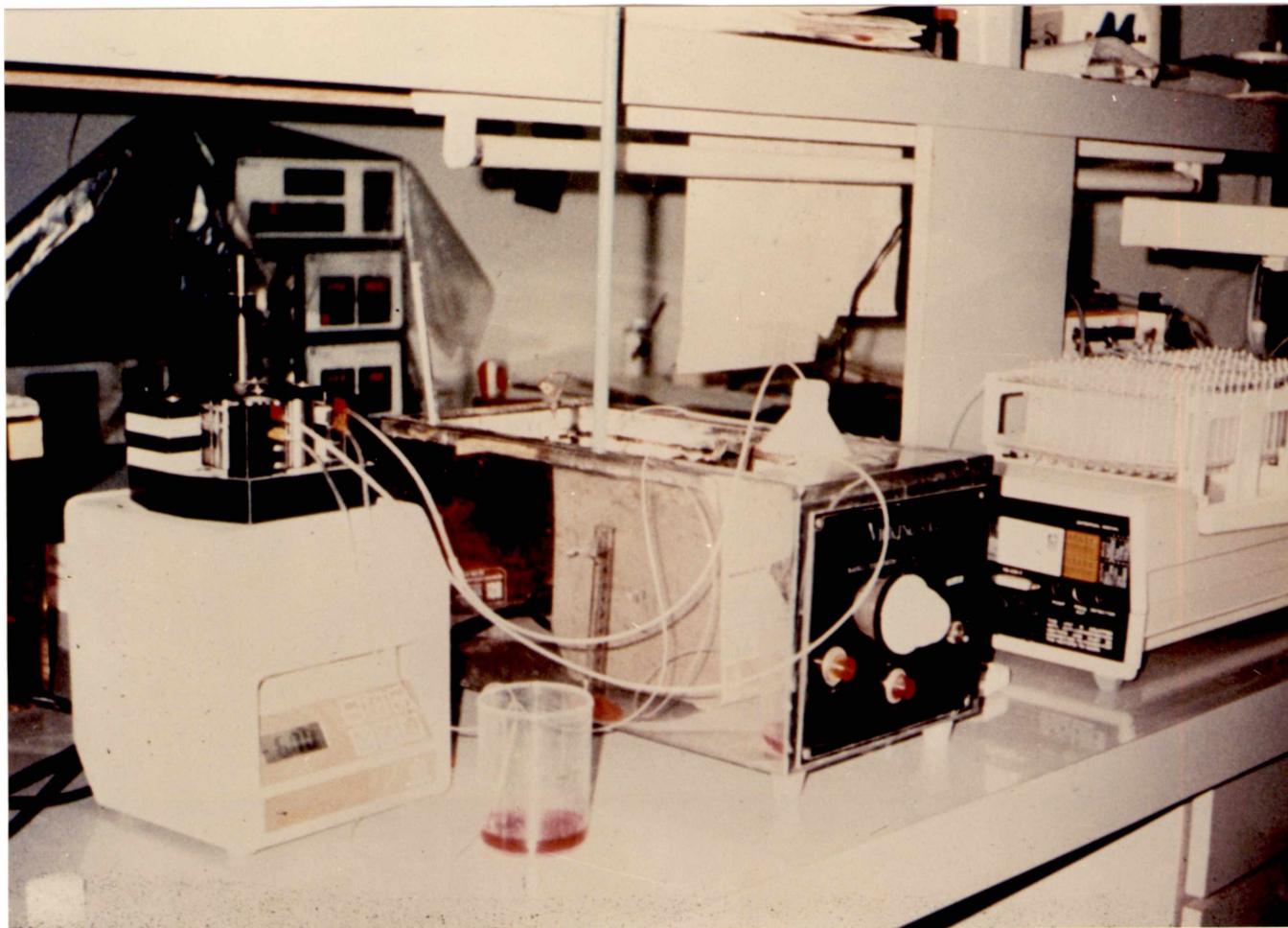


FIGURA M5: *Fotografía del sistema de perfusión utilizado, donde se muestra la bomba peristáltica, el baño termostático que contiene el MI y en este caso una sola columna y el colector de fracciones.*

5) INCUBACION DE CELULAS DISPERSAS

La dispersión celular fue diluida con MI de tal manera de obtener aproximadamente 2×10^6 células/ml y de esa suspensión celular se dispensaron 200 μ l en tubos Eppendorf de 1,5 ml, luego se agregó 0,8 ml de MI precalentado a 37 °C a cada tubo y se incubó en un incubador metabólico a 37 °C por espacio de 20 min. Al cabo de este lapso, los tubos se centrifugaron en microcentrífuga Eppendorf a 2.000 rpm durante 2 min. Los sobrenadantes de esta preincubación se recogieron en tubos de Kahn y se guardaron a - 20 °C hasta el momento de realizar las determinaciones hormonales y con el fin de poder descartar aquellos puntos en los que la cantidad de hormona liberada/ μ g de DNA estuviera por debajo (falta de respuesta) o por encima (células rotas) del intervalo de confianza para la cantidad de hormona liberada a los 20 min. Cada pellet se resuspendió 1 ml de MI conteniendo la concentración adecuada del estímulo a evaluar mediante suave agitación. Los tubos se incubaron en un incubador metabólico a 37 °C, bajo agitación continua durante los siguientes períodos de tiempo: 5, 10, 15, 20 y 40 min., al cabo de los cuales, los tubos se centrifugaron por 2 min. a 3.000 rpm con el fin de obtener un sobrenadante libre de células. El sobrenadante se guardó en tubos de Kahn hasta el momento de realizar las determinaciones hormonales. Cada pellet se resuspendió en 1 ml de solución fisiológica y se centrifugó a 3.000 rpm durante 2 min., el sobrenadante se descartó y el procedimiento de lavado se repitió una vez más. Luego, cada pellet se resuspendió en 1 % de Tritón X-100 en agua destilada y se sonicó por 1 min. al máximo de la escala. Estos homogenatos se guardaron hasta el momento de la determinación de DNA con el objeto de expresar la cantidad de hormona liberada en ng/ μ g DNA.

6) PREPARACION DE LOS EXTRACTOS DE EMINENCIA MEDIA DE RATA

Se disecó cuidadosamente el cerebro y se colocó su base hacia arriba (Fig. M1B). Cada eminencia media (EM), un cuadrado de unos 3 mm de lado que circunda al tallo hipofisario, se removió con tweezers muy finos y se colocó en un homogenizador conteniendo 1 ml de una solución de HCl 0,05 M y ácido ascórbico 1 % peso en volumen, mantenida en baño de hielo. Las EM se homogeneizaron y se agregó más solución de HCl - ácido ascórbico hasta obtener una concentración equivalente a 1 eminencia media por ml. El homogenato se pasó a tubos Eppendorf de 1.5 ml, se congeló a - 80 °C y descongeló 3 veces. Luego se sonicó 3 veces por 20 seg., dejando un intervalo de 10 seg. entre cada burst. Posteriormente, cada tubo se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min. El pellet se descartó y los sobrenadantes se pasaron a un tubo, a partir del cual se hicieron alícuotas de 100 μ l cada una, las

que se guardaron a - 80 °C hasta el momento de usarlos como estímulos (control positivo). Esto constituyó la EM no diluida.

7) DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY

La cantidad de proteína se determinó por el método de Lowry *et. al.* (1951) que se resume a continuación.

A) Reactivos necesarios

Solución A: 10 g CO_3Na_2 en 500 ml de NaOH 0,1 M.

Solución B: 0,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 25 ml de agua destilada.

Solución C: 0,5 g de tartrato de sodio y potasio en 25 ml de agua destilada.

Solución D:

100 partes de solución A

0,5 partes de solución B

0,5 partes de solución C

Solución E: partes iguales de Reactivo de Folin-Ciocalteau y de agua destilada.

Solución de BSA (testigo): 0,4 mg/ml de BSA en NaOH 0,1 M.

B) Procedimiento: se llevó a cabo según se indica en la tabla M1.

TABLA M1: Protocolo para la determinación de proteínas por el método de Lowry.

	H_2O (μl)	BSA (μl)	SOL. D (ml) *	SOL. E (μl) **	CONC. (mg/ml)	BSA (μg)
BLANCO	200	-----	1,0	100	0,00	0,0
T_1	170	30	1,0	100	0,06	12,0
T_2	155	45	1,0	100	0,09	18,0
T_3	140	60	1,0	100	0,12	24,0
T_4	125	75	1,0	100	0,15	30,0
T_5	110	90	1,0	100	0,18	36,0
MUESTRA	200 - v	v de muestra	1,0	100	?	?

* Al agregar la solución D se agitó con vortex y se deja reposar durante 25 min. a temperatura ambiente.

** Al agregar la solución E se agita con vortex y se deja reposar durante 30 min. a temperatura ambiente.

Una hora antes de leer la absorbancia a 750 nm se enciende el espectrofotómetro.

La cantidad de proteína en las muestras se expresó como equivalente de BSA en mg/ml.

Aunque el método muestra linealidad en el rango de concentraciones utilizadas, cada punto de la curva standard (asi como también las muestras) se midieron por triplicado. Las concentraciones de las muestras se determinaron usando la recta obtenida del análisis de regresión de los datos provenientes de la curva standard.

8) RADIOINMUNOANALISIS (RIA) DE LAS HORMONAS ADENOHIPOFI-SARIAS: GH, PRL, LH, FSH Y TSH

A) Kits

La cantidad de cada hormona liberada por las células hipofisarias fue determinada por RIA con los materiales donados al Director de Tesis y al suscripto por el National Hormone and Pituitary Program (NHPP), NIDDK, NICHD, USDA, USA.

B) Iodinación

Para llevar a cabo las reacciones de iodinación se utilizó el método del iodógeno. El mismo se basa en la generación de la especie del iodo electrofílica (I^+) a partir del NaI y usando iodógeno como reactivo. El iodógeno se disolvió en cloroformo a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 100 μl de la solución se colocó en cada tubo Eppendorf de 1,5 ml y se dejó evaporar a temperatura ambiente bajo campana. Una vez evaporado el solvente, los tubos recubiertos con iodógeno se guardaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

El contenido de un vial de 10 μg de la hormona de grado de iodinación fue disuelto en 10 μl de NaCO_3H , adicionándosele 40 μl de buffer fosfato (PB) 0,5 M pH = 7,6 sin NaN_3 . La dilución de hormona se fraccionó en alícuotas de 10 μl que fueron colocadas en tubos Eppendorf de 500 μl y almacenadas a - 70 °C hasta el momento de su uso.

Para llevar a cabo la iodinación, una alícuota de la hormona fue puesta dentro de un tubo revestido con iodógeno y éste fue colocado bajo campana. La reacción se comenzó con el agregado de 0,4 mCi de $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$. A los 20 min. se la detuvo por el agregado de 200 μl de PB 0,05 M conteniendo 0,02 % de NaN_3 .

Con una pipeta Pasteur se tomó la mezcla de iodinación y se colocó sobre la parte superior de una columna de Sephacryl S - 200. Entonces suavemente se aplicó una capa de buffer de elución constituido por: PBS (NaCl 0,16 M, PB 0,01 M, pH = 7,6) con el agregado de 0,5 % de BSA y 0,02 % de NaN_3 , se colocó la tubuladura de la columna pescando dentro del reservorio de buffer de elución y mediante una bomba peristáltica se eluyó el contenido de la columna a un flujo de 10 ml/h,

colectándose fracciones de 2 ml. Alternativamente, se utilizaron columnas de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), para la purificación de los trazadores, las que se dejaron eluir por gravedad con el buffer mencionado anteriormente. Luego, se tomó una alícuota de 10 μ l de cada fracción y se contó su radiactividad en un contador gamma. Se utilizó como trazador la fracción correspondiente al pico de radiactividad. De esa fracción se prepararon alícuotas de 50 μ l, las cuales, se guardaron a -20 °C hasta el momento de realizar el RIA. También se guardaron por si fuese necesario usar, las fracciones adyacentes izquierda y derecha al pico.

En la fig. M6 se muestra un gráfico típico del resultado de una iodación utilizando una columna PD-10.

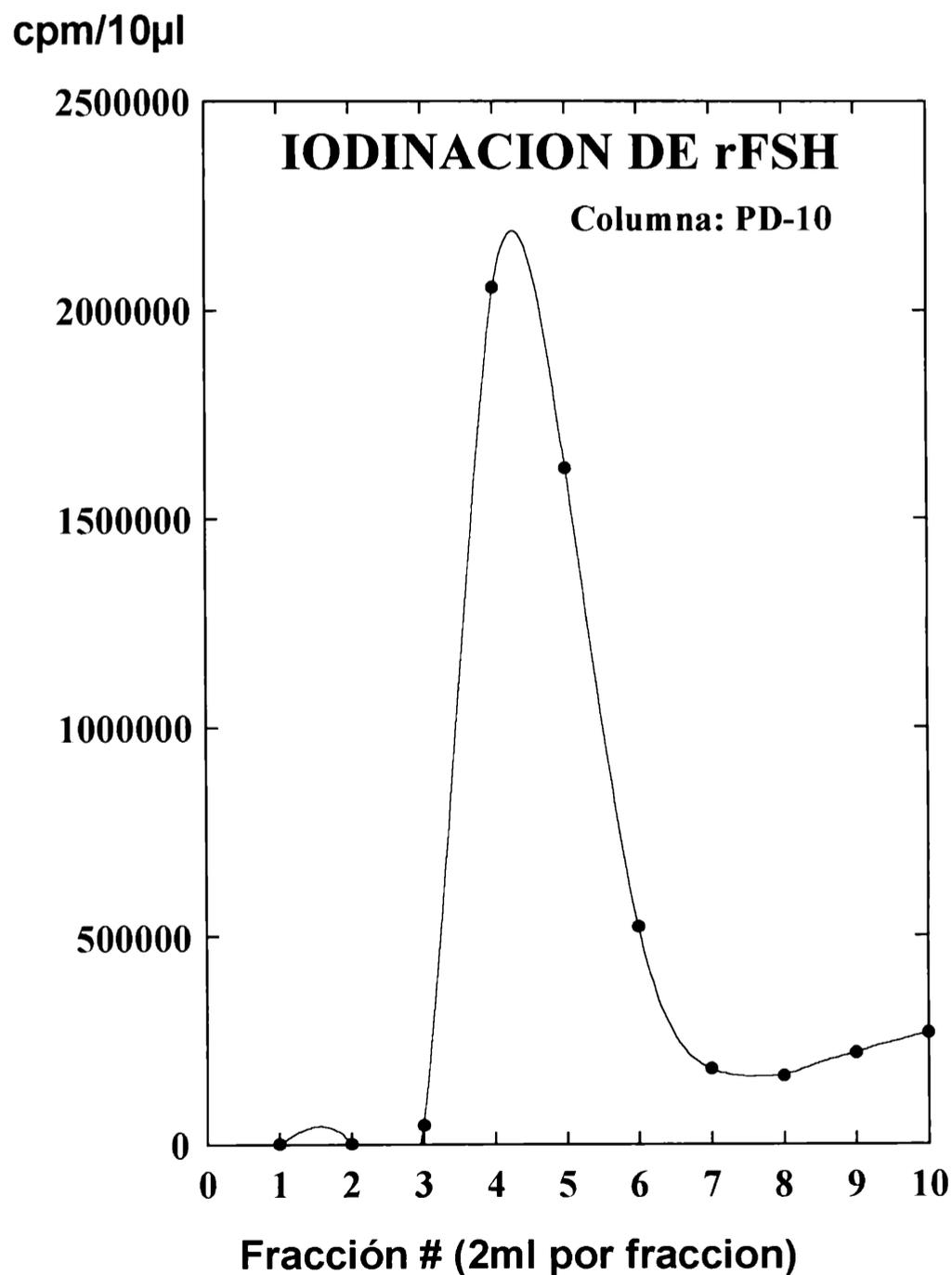


FIGURA M6: Ejemplo del resultado de una iodación utilizando una columna PD-10.

c) RIAs

Los RIAs para las diferentes hormonas se realizaron de acuerdo al esquema general indicado en la tabla M2.

Luego, se incubó toda la noche a temperatura ambiente, se agregó 50 µl de proteína A al 1 % (alternativamente se usó segundo anticuerpo) en PBS, se incubó 30 min. a temperatura ambiente y se centrifugó por 25 min. a 3000 rpm. Se aspiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a una trampa de agua y el pellet se contó en un contador gamma. Las concentraciones de hormona inmunorreactivas fueron obtenidas utilizando el programa RIA (logit - log) versión 3.3 del Laboratoire D'Endocrinologie Moleculaire, Chul, Quebec (1988). Los tubos TC, NSB, B₀ y los correspondientes a los standards fueron medidos por triplicado, mientras que las muestras lo fueron por duplicado.

TABLA M2: Protocolo general utilizado para el dosaje por RIA de las hormonas hipofisarias: GH, PRL, LH, FSH y TSH.

	<i>CUENTAS TOTALES (TC) **</i>	<i>UNIÓN NO ESPECÍFICA (NSB) **</i>	<i>UNIÓN MÁXIMA (B₀) **</i>	<i>STANDARD O MUESTRA **</i>
<i>BUFFER* (µl)</i>	-----	300	250	200
<i>STANDARD O MUESTRA (µl)</i>	-----	-----	-----	50 ***
<i>ANTICUERPO (µl)</i>	-----	-----	50	50
<i>[¹²⁵I] - HORMONA (µl)</i>	50	50	50	50

* El buffer utilizado PBS + 1,0 % de BSA y 0,02 % de NaN₃.

** Nombre asignado a los tubos.

*** Las muestras se diluyeron convenientemente a fin de obtener lecturas cercanas al 50 % B.

Las concentraciones en ng/ml de los standards utilizados se indican en la tabla M3.

TABLA M3: Concentraciones de GH, PRL, LH, FSH y TSH en ng/ml utilizadas para las determinaciones de las curvas estándares.

	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5	TUBO 6	TUBO 7	TUBO 8	TUBO 9
LH	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,81	3,91	1,95
FSH	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,91	1,95
GH	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78
PRL	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78
TSH	1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,81	3,91

Estas diluciones fueron preparadas a partir de los viales originales reconstituidos con 1 ml de una mezcla de 50 % de glicerol en agua destilada que fueron mantenidas a - 20 °C hasta el momento de usar.

La dilución óptima de cada anticuerpo (Ab) fue determinada por titulación luego de la reconstitución de cada vial, realizando 6 B₀ por triplicado con diferentes diluciones de los Abs. En general las diluciones utilizadas fueron las indicadas en la tabla M4.

TABLA M4: Dilución óptima de los anticuerpos usados en los RIAs de GH, PRL, LH, FSH y TSH.

	anti-LH	anti-FSH	anti-GH	anti-PRL	anti-TSH
1/dilución	200	300	2500	1500	800

Los viales de anticuerpos también fueron reconstituidos con glicerol-agua y mantenidos a - 20 °C hasta el momento de su uso.

Las características principales de los RIAs descriptos se indican en la tabla M5.

TABLA M5: Características principales de los RIAs utilizados.

	DE ₅₀	%B ₀ /T _C	%NSB/T _C
LH	15,0 ± 0,65*	23,8 ± 1,60	1,27 ± 0,02
FSH	19,5 ± 1,1	14,3 ± 0,49	1,88 ± 0,10
GH	9,17 ± 0,37	27,8 ± 0,54	4,76 ± 0,25
PRL	12,4 ± 0,45	21,0 ± 0,85	2,97 ± 0,08
TSH	31,7 ± 3,9	22,7 ± 2,51	1,41 ± 0,08

* media ± SEM (n = 6) DE₅₀ = concentración de hormona para la cual el %B/B₀ = 50 (ng/ml), B₀ = unión máxima (cpm), T_C = cuentas totales (cpm) y NSB = unión no específica (cpm).

9) ESTIMULOS UTILIZADOS

A) Eminencia media: se utilizó como control positivo. En el momento de usar la EM como estímulo se la diluyó convenientemente en MI y se ajustó su pH a 7,4 con NaCO₃H sólido.

B) Sobrenadantes de cultivos de células epiteliales tímicas (TEC) de rata o de ratón: se utilizaron sin diluir o diluidos 1/10 en MI.

c) ZnCl₂: se preparó una solución al 0,86 µg/ml en MI y se ajustó el pH a 7,4 con NaCO₃H sólido.

D) Facteur thymique serique (FTS): se prepararon distintas diluciones de este no-napéptido sintético en MI.

E) Timulina (FTS-Zn): a distintas diluciones de FTS se les agregó ZnCl₂ hasta llevarlo a una concentración de 0,86 µg/ml y luego se ajustó el pH a 7,4 con NaCO₃H sólido.

F) Timosina fracción 5 (TF5): se utilizó a una concentración de 0,5 mg/ml en MI.

G) Péptido MB 35: este péptido sintético se utilizó a una concentración de 1 µM en MI.

H) Nucleohistona e histonas H2A, H2B y H3: se prepararon suspensiones de estas sustancias en MI sin BSA, las cuales se sonicaron por 5 min y luego se centrifugaron por 20 min. a 10.000 rpm para eliminar toda partícula sólida. A una alícuota del sobrenadante se le determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry. Al resto se le agregó BSA hasta obtener una concentración del 0,5 %.

I) Sobrenadantes de histona H2A y de nucleohistona: se prepararon suspensiones de estas sustancias en MI sin BSA, las cuales se sonicaron por 5 min, centrifugándose luego por 20 min a 10.000 rpm. Los sobrenadantes, en volúmenes de 2 ml, se colocaron en filtros Centricón con un límite de exclusión de pesos moleculares mayores que 10 KD y se centrifugaron a 6.000 rpm durante 40 min. Se combinaron los efluentes de los filtros y a una alícuota de éstos se le determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry. Al resto se le agregó BSA hasta obtener una concentración de 0,5 %.

J) Mezcla de histona H2A y péptido MB 35: a dispersiones de 30 y de 6 µM se les adicionó péptido MB 35 hasta tener una concentración de 5 µM en dicho péptido.

K) Dilución de anticuerpo NT2 (anti - histonas H1 y H3) monoclonal: se preparó una dilución 1/50 en MI.

L) Histona H3 neutralizada con anticuerpo TNT2: a una preparación de histona H3 30 y 6 µM en MI se le agregó anticuerpo TNT2 (gentileza del Dr. Alan L Epstein, Dept. of Pathol. and Biochem., School of Medicine, Univ. of Southern California, Los Angeles, USA) y se incubó por espacio de 2 hs. a 37 °C. La mezcla se centrifugó durante 10 min. a 3.000 rpm y al sobrenadante se lo utilizó como estímulo.

M) Anticuerpo anti - timulina : se preparó una dilución de Ab conejo anti - timulina 1/500 en MI.

N) Neutralización de timulina con Ab anti - timulina: a diluciones 10^{-3} - 10^{-8} M de FTS-Zn se les agregó Ab anti - timulina hasta obtener una dilución 1/500 y se los incubó durante 2 hs. a 37 °C. Las mezclas se centrifugaron durante 10 min. a 3.000 rpm y a los sobrenadantes se los utilizó como estímulos.

O) Neutralización de TEC de rata con Ab anti - timulina: una dilución 1/10 de TEC de rata se neutralizó de igual manera en que se hizo para las preparaciones de timulina.

P) Efecto del suero normal de conejo (SNC): se utilizó una dilución de SNC 1/500 y mezclas con timulina y TEC preparadas como en los puntos anteriores.

10) SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA VERIFICAR LOS POSIBLES EFECTOS ADITIVOS O SINERGISTICOS DE TIMULINA E HISTONAS CON LOS FACTORES LIBERADORES DE LAS HORMONAS HIPOFISARIAS.

Se realizaron incubaciones de células dispersas de rata durante 40 min. (por cuadruplicado), con los siguientes estímulos disueltos en MI:

- 1) nada
- 2) TRH 10^{-1} μ M
- 3) GHRP-6 1 μ M
- 4) LHRH 10^{-2} μ M
- 5) GHRH 10^{-1} μ M
- 6) EM 1/30
- 7) Timulina 10^{-1} μ M
- 8) Timulina 10^{-1} μ M + TRH 10^{-1} μ M
- 9) Timulina 10^{-1} μ M + GHRP-6 1 μ M
- 10) Timulina 10^{-1} μ M + LHRH 10^{-2} μ M
- 11) Timulina 10^{-1} μ M + GHRH 10^{-1} μ M
- 12) Histona H2A 6 μ M
- 13) Histona H2A 6 μ M + TRH 10^{-1} μ M
- 14) Histona H2A 6 μ M + GHRP-6 1 μ M
- 15) Histona H2A 6 μ M + LHRH 10^{-2} μ M
- 16) Histona H2A 6 μ M + GHRH 10^{-1} μ M
- 17) Histona H2B 6 μ M
- 18) Histona H2B 6 μ M + TRH 10^{-1} μ M
- 19) Histona H2B 6 μ M + GHRP-6 1 μ M
- 20) Histona H2B 6 μ M + LHRH 10^{-2} μ M
- 21) Histona H2B 6 μ M + GHRH 10^{-1} μ M

- 22) **Histona H3 6 μM**
- 23) **Histona H3 6 μM + TRH 10^{-1} μM**
- 24) **Histona H3 6 μM + GHRP-6 1 μM**
- 25) **Histona H3 6 μM + LHRH 10^{-2} μM**
- 26) **Histona H3 6 μM + GHRH 10^{-1} μM**
- 27) **Poly-Lys 8 μM**
- 28) **Poly-Lys 8 μM + TRH 10^{-1} μM**
- 29) **Poly-Lys 8 μM + GHRP-6 1 μM**
- 30) **Poly-Lys 8 μM + LHRH 10^{-2} μM**
- 31) **Poly-Lys 8 μM + GHRH 10^{-1} μM**

11) INVESTIGACION DEL POSIBLE ROL DEL Ca^{+2} , INOSITOL - P, DIACILGLICEROL Y AMPc EN LA ACCION DE LA TIMULINA Y LAS HISTONAS

Se realizaron incubaciones de células dispersas de rata durante 40 min. (por triplicado), con los siguientes estímulos disueltos en MI:

- 1) **nada**
- 2) **EGTA 5 mM.**
- 3) **Ionóforo A23187 5 μM .**
- 4) **Ionóforo A23187 5 μM + EGTA 5 mM.**
- 5) **Histona H2A 6 μM .**
- 6) **Histona H2B 6 μM .**
- 7) **Histona H3 6 μM .**
- 8) **Timulina 10^{-7} M.**
- 9) **Histona H2A 6 μM + EGTA 5 mM.**
- 10) **Histona H2B 6 μM + EGTA 5 mM.**
- 11) **Histona H3 6 μM + EGTA 5 mM.**
- 12) **Timulina 10^{-7} M + EGTA 5 mM.**
- 13) **Histona H2A 6 μM + Ionóforo A23187 5 μM .**
- 14) **Histona H2B 6 μM + Ionóforo A23187 5 μM .**
- 15) **Histona H3 6 μM + Ionóforo A23187 5 μM .**
- 16) **Timulina 10^{-7} M + Ionóforo A23187 5 μM .**
- 17) **Histona H2A 6 μM + Ionóforo A23187 5 μM + EGTA 5 mM.**
- 18) **Histona H2B 6 μM + Ionóforo A23187 5 μM + EGTA 5 mM.**
- 19) **Histona H3 6 μM + Ionóforo A23187 5 μM + EGTA 5 mM.**
- 20) **Timulina 10^{-7} M + Ionóforo A23187 5 μM + EGTA 5 mM.**
- 21) **LiCl 10 mM.**
- 22) **Histona H2A 6 μM + LiCl 10 mM.**

- 23) **Histona H2B 6 μ M + LiCl 10 mM.**
- 24) **Histona H3 6 μ M + LiCl 10 mM.**
- 25) **Timulina 10^{-7} M + LiCl 10 mM.**
- 26) **EM 1/30.**
- 27) **Cafeína 10 mM.**
- 28) **Histona H2A 6 μ M + Cafeína 10 mM.**
- 29) **Histona H2B 6 μ M + Cafeína 10 mM.**
- 30) **Histona H3 6 μ M + Cafeína 10 mM.**
- 31) **Timulina 10^{-7} M + Cafeína 10 mM.**
- 32) **NaF 10 mM.**
- 33) **Histona H2A 6 μ M + NaF 10 mM.**
- 34) **Histona H2B 6 μ M + NaF 10 mM.**
- 35) **Histona H3 6 μ M + NaF 10 mM.**
- 36) **Timulina 10^{-7} M + NaF 10 mM.**
- 37) **TFP 15 mM.**
- 38) **Histona H2A 6 μ M + TFP 15 mM.**
- 39) **Histona H2B 6 μ M + TFP 15 mM.**
- 40) **Histona H3 6 μ M + TFP 15 mM.**
- 41) **Timulina 10^{-7} M + TFP 15 mM.**
- 42) **Forskolin 30 μ M.**
- 43) **Histona H2A 6 μ M + forskolin 30 μ M.**
- 44) **Histona H2B 6 μ M + forskolin 30 μ M.**
- 45) **Timulina 10^{-7} M + forskolin 30 μ M.**
- 46) **Didesoxiforskolin 30 μ M.**
- 47) **Histona H2A 6 μ M + didesoxiforskolin 30 μ M.**
- 48) **Histona H2B 6 μ M + didesoxiforskolin 30 μ M.**
- 49) **Timulina 10^{-7} M + didesoxiforskolin 30 μ M.**

12) ESTUDIOS CON RATAS CRÓNICAMENTE CANULADAS

Para evaluar los efectos *in vivo* de las distintas sustancias a ser testeadas (DNA, histona H2A y nucleohistona) sobre los perfiles secretorios de las hormonas hipofisarias, se usaron animales conscientes y con plena libertad de movimiento (i.e.: animales no estresados) de acuerdo a un diseño experimental establecido en el laboratorio (figs M7 y M8).

Se canularon ratas jóvenes bajo ligera anestesia de éter. La cánula de Silastic fue implantada en la aurícula derecha de cada animal a través de la vena yugular derecha. La parte libre del catéter se pasó por debajo de la piel hasta llegar a la parte posterior del cuello emergiendo a través de una pequeña incisión en la piel

aproximadamente 1 cm por debajo de la base del cráneo. A fin de prevenir infecciones Se aplicó tópicamente estreptomycin sulfato (polvo) antes de suturar.

Dos días después de la cirugía los animales fueron llevados al cuarto experimental en jaulas individuales. Se conectaron extensiones de Silastic (20 cm) a la parte libre de la cánula y esta tubuladura se pasó al exterior a través del enrejado de la tapa de las jaulas. Las cánulas se enjuagaron con heparina (100 IU/ml) y los animales se dejaron, sin perturbaciones adicionales, durante 1 hora como mínimo, teniendo libre acceso al alimento y al agua. Luego se tomaron muestras de sangre (0,4-0,6 ml) cada 30 min, por espacio de 5 horas. Después de cada toma, los glóbulos rojos se separaron del plasma, se resuspendieron en 0,3 ml de solución fisiológica estéril y se reinyectaron a los animales correspondientes subsecuentemente a la siguiente extracción de sangre. En todos los casos los estímulos fueron inyectados a través de las cánulas, en un volumen de 0,3-0,4 ml de solución fisiológica, inmediatamente después de la cuarta extracción . Las muestras de plasma fueron inmediatamente congeladas a -20°C hasta efectuar los dosajes hormonales.

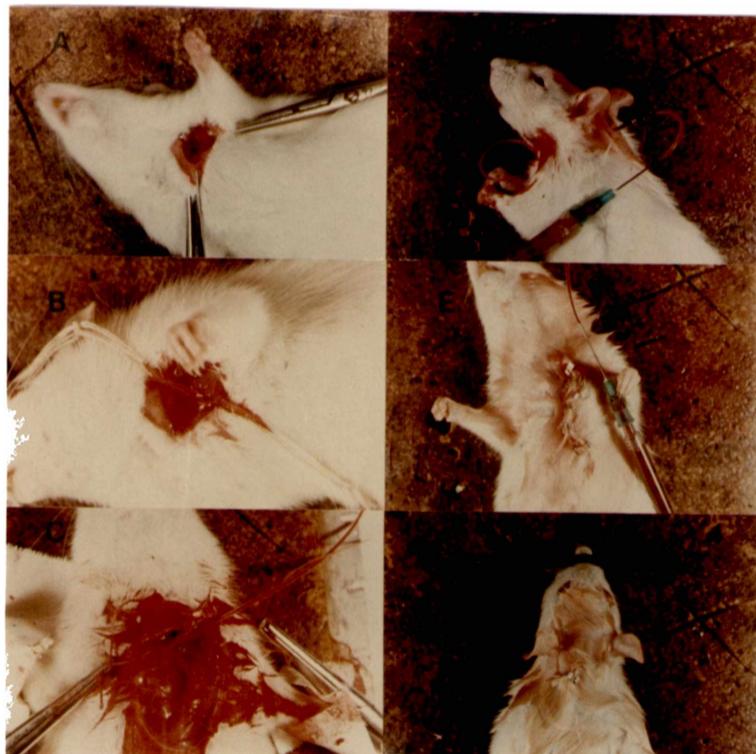


FIGURA M7: *Canulación de la rata. A) Incisión en el hemitorax izquierdo mostrando la vena yugular izquierda, B) luego de disecar la misma se pasan dos trozos de hilo de sutura por debajo de ésta, C) se realiza una pequeña incisión en la yugular por donde se pasa una cánula de silastic llegando hasta la aurícula izquierda y se sujeta firmemente la cánula atándola con el hilo, D) se atraviesa el cuello del animal con una aguja de grueso calibre por donde se introduce la cánula, E) se sutura la región ventral de la rata y F) posteriormente el cuello, luego se hepariniza la cánula y se anuda dejando una longitud aproximada por sobre el cuello de 2,5 cm.*

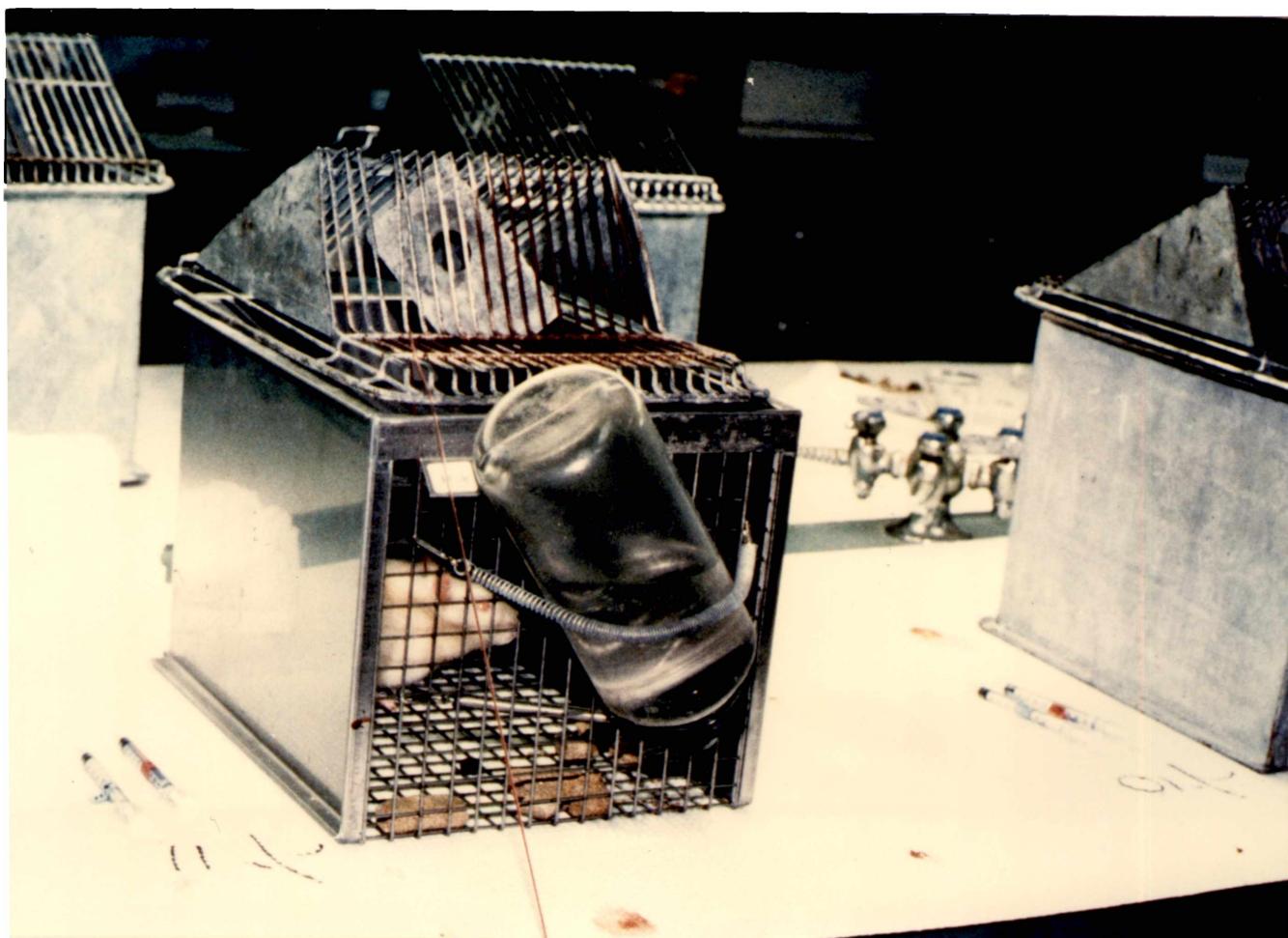


FIGURA M8: *Rata canulada, con libre acceso al agua y comida, en su jaula el día del experimento.*

13) ANIMALES TRATADOS CON DEXAMETASONA

Con el fin de correlacionar la involución tímica inducida por dexametasona, con los cambios en los niveles plasmáticos de ADN, se utilizaron en cada experimento dos grupos de cuatro animales cada uno. En ambos grupos, a cada rata se le

extrajo sangre de la vena caudal a las 10 hs del día cero e inmediatamente a un grupo se le colocó dexametasona (10 µg/ml) en el agua de bebida. A cada rata se le extrajo sangre de la cola cada día a las 10 hs durante cuatro días mas. Cada muestra de sangre fue centrifugada y su plasma se guardó a - 20 °C hasta el momento de determinar el nivel de ADN. El último día de tratamiento, las ratas fueron decapitadas y sus timos inmediatamente pesados.

14) ESTADISTICA

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante ANOVA de una o dos vías, según correspondiese, seguido por el test de múltiples rangos de Duncan para estimar el nivel de significación de las diferencias entre medias. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los cálculos estadísticos se realizaron con el uso del programa Statgraphics® versión 6.0.

RESULTADOS

A) IMPACTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA FUNCION HIPOFISARIA EN LA RATA

Las ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley utilizadas como modelo experimental mostraron diversas alteraciones endocrinas durante el envejecimiento. En efecto, una de las alteraciones observadas fue un aumento significativo, acompañado también por una mayor variabilidad, del peso de la hipófisis (fig. R1). Se detectaron también alteraciones significativas asociadas a la edad en los niveles séricos de GH, PRL, LH, FSH, TSH y T₄ pero no en el de T₃ (tabla R1). Los niveles séricos de GH, LH, TSH y T₄ disminuyeron, mientras que los de PRL y FSH aparecieron aumentados en los animales senescentes.

En un seguimiento previo se estudió longitudinalmente la incidencia acumulativa de tumores mamarios en 4 cohortes de hembras y machos Sprague Dawley, a saber : H-1 (79 hembras), H-2 (55 hembras), M-1 (42 machos) y M-2 (35 machos). La incidencia de esta patología comenzó a aparecer a los 13-14 meses de edad en las hembras y a los 20-21 meses en los machos (fig. R2). A toda edad la incidencia de tumores mamarios fue mas alta en las hembras. En el caso de los machos, nunca se vio mas de un tumor mamario por animal mientras que no resultó raro ver hembras seniles con una historia de 2 o 3 tumores mamarios espontáneos. La aparición de múltiples tumores mamarios se correlacionó con la presencia de macroprolactinomas y altos niveles séricos de PRL en los animales afectados.

Como se indicó en la introducción, la histología adenohipofisaria muestra conspicuos cambios durante el envejecimiento, particularmente en las ratas hembras. Las mayores alteraciones se observaron en la población prolactotropa de las hembras, las que mostraron una marcada hiperplasia en las hembras senescentes, llegando en muchos casos a observarse la presencia de micro o macroprolactinomas cromóforos (fig I13). Las células gonadotropas, somatotropas y tirotropas mostraron un marcado descenso en su número durante el envejecimiento (figs. I12 e I13). Las células adenohipofisarias de ratas jóvenes mostraron respuestas secretorias dosis-dependientes frente a extractos de EM y en menor medida, frente a pulsos de KCl (fig. R3). Para todas las hormonas estudiadas, las máximas respuestas secretorias fueron inducidas por extractos de EM 1/10. Las respuestas a EM 1/30 fueron submáximas, constituyendo, según la hormona, entre un 30 y un 60 % de la capacidad liberadora máxima (fig. R4). En los experimentos de perfusión que se describirán en esta tesis, se utilizó extracto de EM 1/30 al principio y al final de cada experimento, como control positivo de la performance del sistema.

Cuando se evaluó la respuesta a la EM 1/30 de las células hipofisarias provenientes de ratas jóvenes, adultas y senescentes mediante incubación de las mismas durante 40 min. con o sin EM 1/30, se observó que en todos los casos la EM indujo una respuesta estimuladora significativamente mayor que el basal correspondiente. Además, tanto el basal como la respuesta a EM fueron comparables entre las células de animales jóvenes y adultos pero resultaron significativamente mayores que las respuestas de las senescentes (fig. R5).

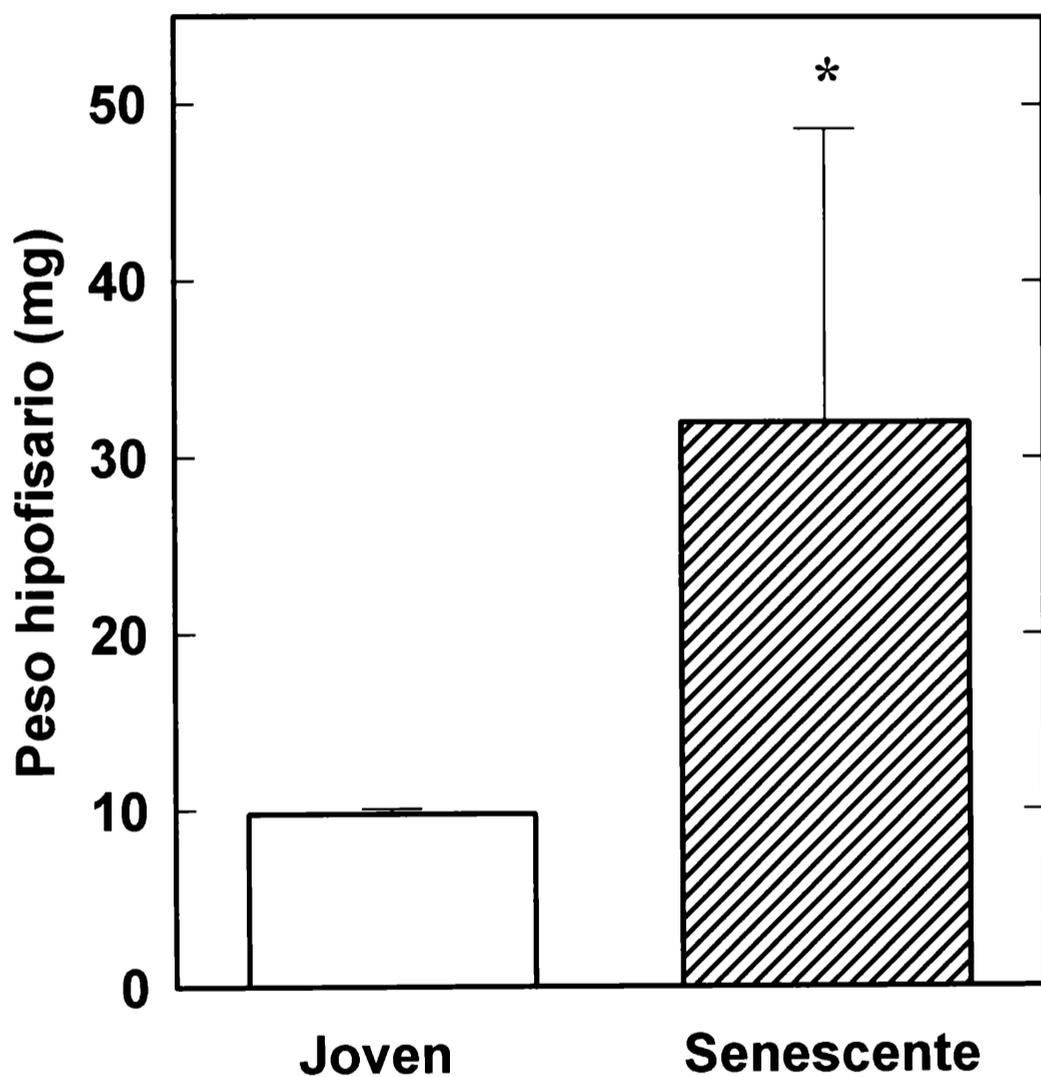


FIGURA R1: Diferencia entre los pesos de las hipófisis de ratas hembras jóvenes y senescentes. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$ para $n = 30$. * = $p < 0,05$.

TABLA R1: Niveles séricos de las hormonas hipofisarias y tiroideas de ratas hembras jóvenes y senescentes, así como la relación de niveles entre ambos grupos. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM(n)$. * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$.

	<u>JOVENES (J)</u>	<u>SENESCENTES (S)</u>	<u>RELACION S/J</u>
GH (ng/ml)	34,3 ± 5,7(18)	7,0 ± 0,7(19) **	0,20 ± 0,03(37)
PRL (ng/ml)	26,5 ± 4,2(19)	43,5 ± 3,6(19) **	1,64 ± 0,21(38)
LH (ng/ml)	6,5 ± 0,6(22)	4,8 ± 0,5(21) *	0,73 ± 0,07(43)
FSH (ng/ml)	5,1 ± 0,2(13)	7,7 ± 0,4(13) **	1,51 ± 0,08(26)
TSH (ng/ml)	4,3 ± 0,2(22)	2,2 ± 0,1(21) **	0,51 ± 0,02(43)
T ₄ (ng/dl)	5,8 ± 0,1(14)	2,5 ± 0,1(13) **	0,43 ± 0,01(27)
T ₃ (µg/dl)	77,0 ± 7,1(16)	63,5 ± 6,9(16)	0,82 ± 0,12(32)

Tumores/100 ratas

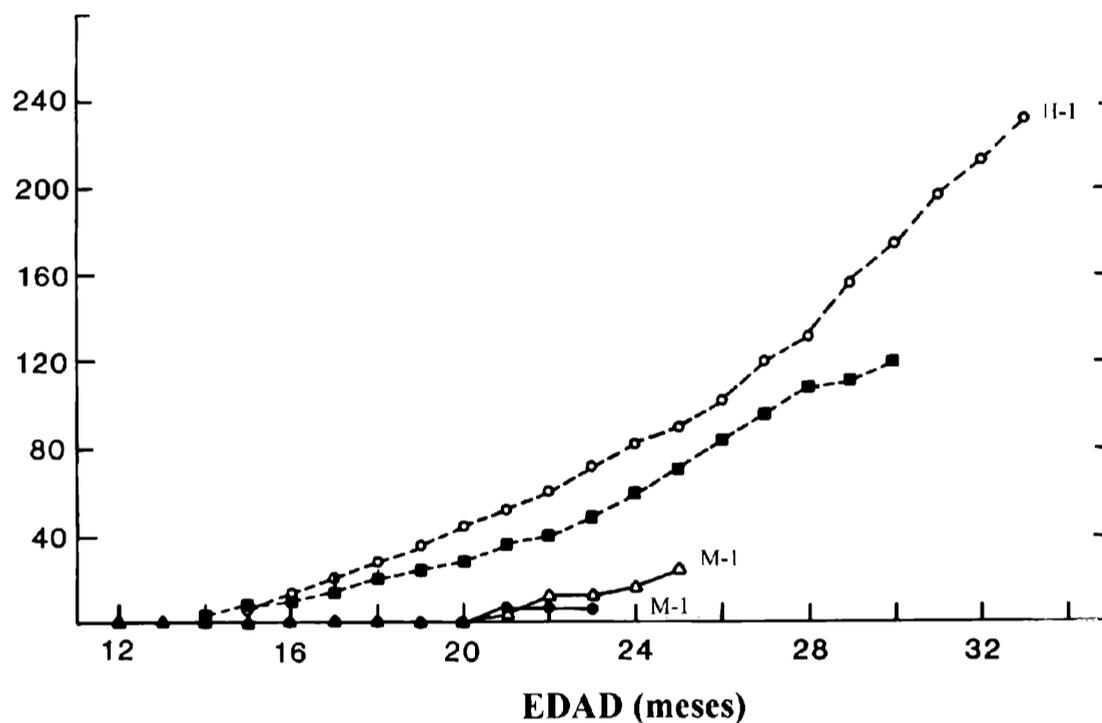


FIGURA R2: Incidencia acumulativa de tumores mamarios.

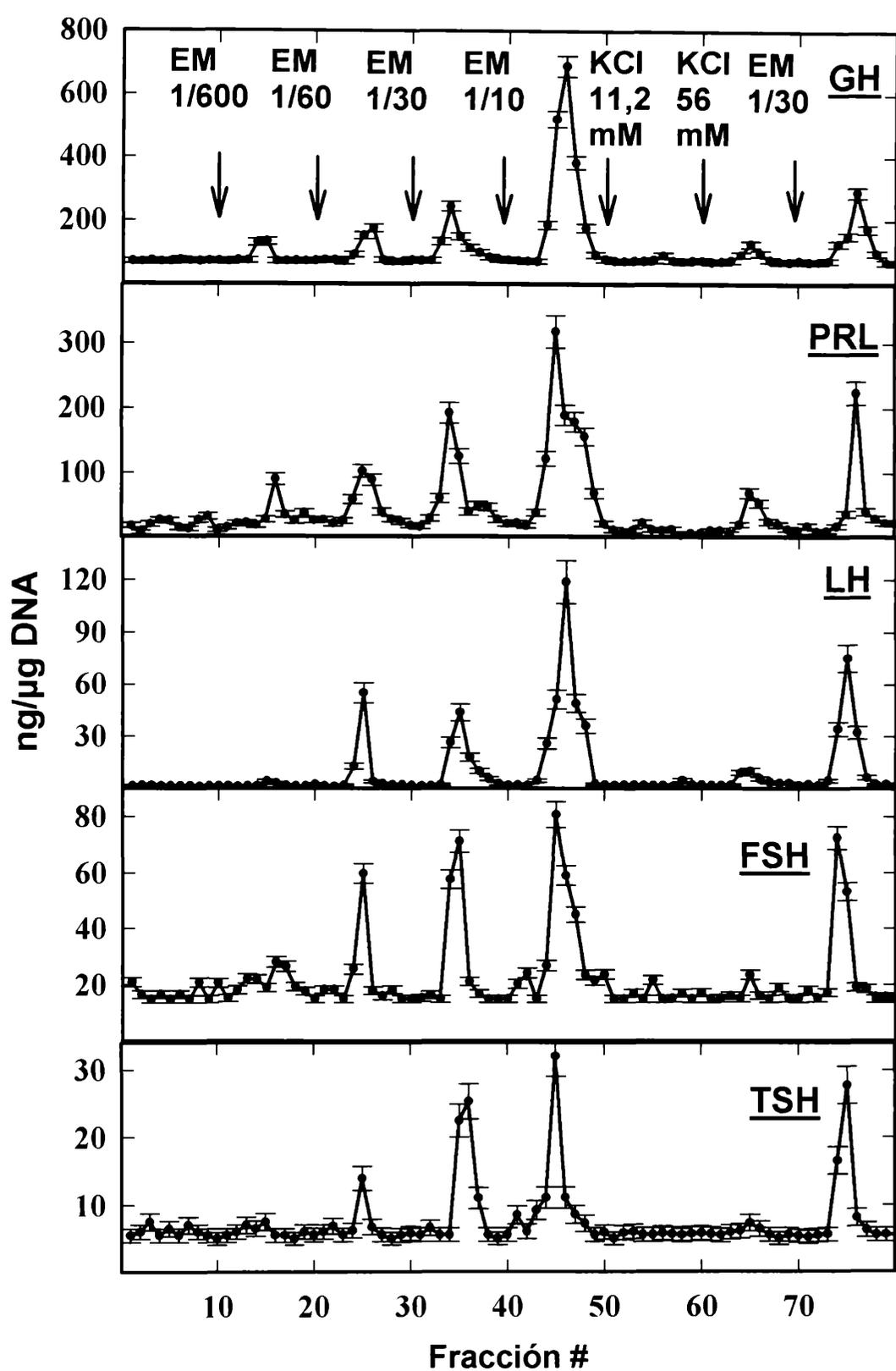


FIGURA R3: Masa de hormona, en ng/μg DNA celular, liberada luego de perfundir células de hipófisis de ratas hembras jóvenes con las diluciones indicadas de extractos de eminencia media (EM) en medio de incubación (MI) y de KCl en MI. En cada panel se indica el tipo de hormona dosada. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 6$.

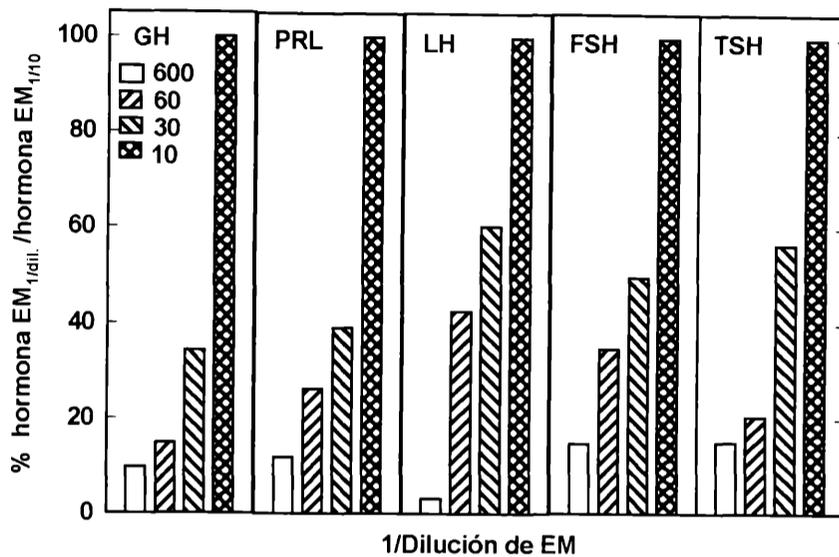


FIGURA R4: Masas totales (áreas por debajo de los picos) de GH, PRL, LH, FSH y TSH liberadas en los experimentos anteriores y expresadas como porcentaje de la cantidad de hormona liberada por una dilución de EM 1/10. Se observa que la dilución de EM 1/30 es capaz de inducir una liberación de un 30 a 60 %, según la hormona en cuestión, de la cantidad de hormona que es capaz de liberar la dilución de EM 1/10.

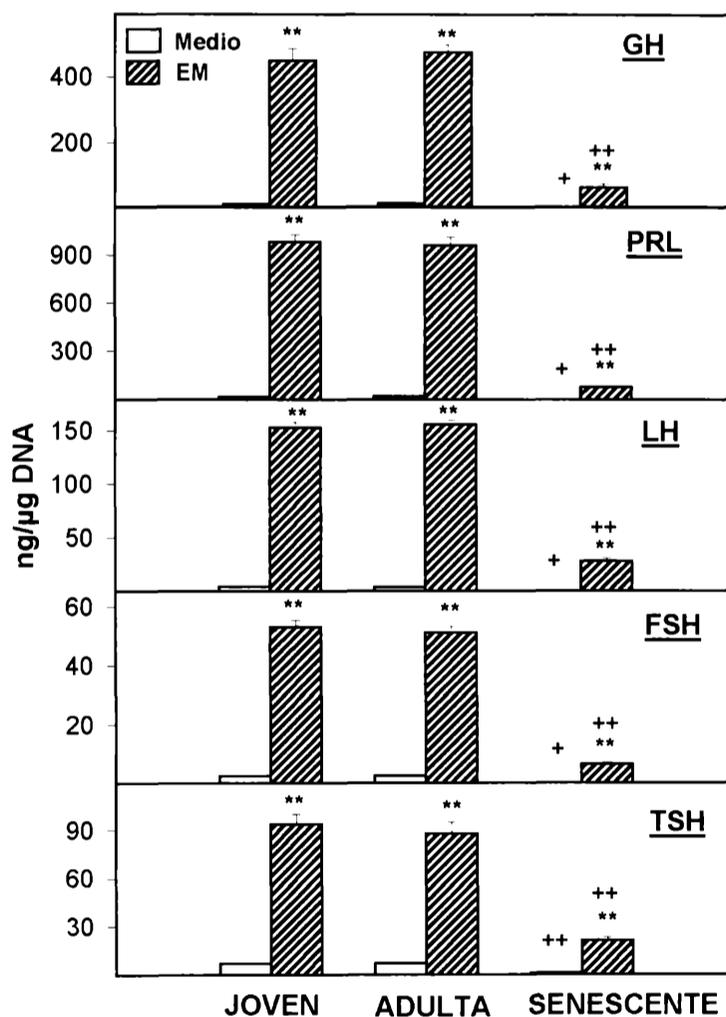


FIGURA R5: Efecto de EM 1/30 sobre la liberación hormonal en incubados de células hipofisarias de ratas hembras jóvenes, adultas y senescentes. En cada panel se indica la hormona dosada. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 8$. ** = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta a EM dentro del mismo grupo etáreo. + = $p < 0,05$ y ++ = $p < 0,01$ cuando de compara la respuesta al mismo tratamiento con la de las células de animales jóvenes. Para otros detalles ver el texto.

B) COMPORTAMIENTO DE LAS CELULAS HIPOFISARIAS FRENTE A LA TIMULINA: CAMBIOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Estudios en células perifundidas

Se perifundieron células hipofisarias de ratas jóvenes y senescentes (fig. R6) con EM, FTS, $ZnCl_2$, diferentes dosis de timulina (FTS-Zn) y con sobrenadantes provenientes de líneas de células epiteliales tímicas (TEC) de rata o ratón, observándose que tanto la FTS como el $ZnCl_2$ por separado resultaron inactivos en relación a la secreción de GH, PRL, LH, FSH y TSH. Por el contrario, la timulina mostró una actividad secretagoga dosis-dependiente para las hormonas mencionadas, salvo FSH. Tanto los sobrenadantes de TEC de rata como los de ratón estimularon significativamente la secreción de GH, PRL, LH y TSH. En todos los casos, la cantidad de hormona liberada por la EM 1/30 fue similar al comienzo y al final del experimento, indicando así un buen funcionamiento del sistema. En todos los casos, los picos secretorios de las células de animales senescentes fueron menores que los producidos por las células de ratas jóvenes. Además, la secreción basal de las células de ratas senescentes fue algo menor para GH, FSH y TSH pero no para PRL ni para LH.

Estudios con incubados celulares

Los estudios de cinética de liberación de las cinco hormonas hipofisarias mencionadas, realizados por incubación de células de ratas jóvenes con distintas dosis de timulina, mostraron que esta hormona tímica estimula la liberación hormonal en forma tiempo- y dosis-dependiente con un perfil dosis-respuesta acampanado y un máximo correspondiente a una concentración de timulina de 10^{-7} M (fig. R7 panel A). Para evaluar la respuesta de las ratas senescentes, se incubaron células de ratas jóvenes y senescentes durante 40 min con las mismas dosis de timulina y se determinó la cantidad de hormona liberada por sobre el basal ; se observó que en las células de ratas senescentes la timulina también indujo un perfil de liberación hormonal acampanado con un máximo correspondiente a una concentración de timulina de 10^{-7} M. No obstante, la masa de hormona liberada fue menor que la de la contraparte joven (fig. R7 panel B).

Estudios de inmunoneutralización, utilizando células hipofisarias de ratas jóvenes mostraron que la preincubación de timulina o sobrenadantes de TEC por tres horas con suero de conejo a-timulina bloquea completamente la capacidad

secretagoga de estas preparaciones. Este efecto inmunoneutralizante no se observó cuando se utilizó suero normal de conejo en lugar del suero a-timulina (fig. R8).

El estudio del efecto de combinaciones de timulina con secretagogos de cada hormona en células de ratas jóvenes, adultas y senescentes incubadas durante 40 min mostró que : a) GHRH produce un efecto aditivo y GHRP-6 un efecto sinérgico sobre la liberación de GH, b) TRH produce un efecto sinérgico sobre la liberación de PRL y TSH, c) GnRH produce un efecto aditivo sobre la liberación de FSH y sinérgico sobre la de LH y d) las células de ratas jóvenes y adultas se comportaron de idéntica manera mientras que las células de animales senescentes, aunque mostraron las mismas respuestas cualitativas, lo hicieron con una liberación hormonal significativamente menor (fig. R9).

Los experimentos en los que se examinó el posible efecto del EGTA, ionóforo A23187 (A), EGTA+A, LiCl y TFP sobre la secreción de las cinco hormonas estudiadas estimulada por timulina en células hipofisarias de ratas jóvenes mostraron que para todas las hormonas, EGTA y EGTA+A disminuyeron significativamente la secreción estimulada, mientras que A, *per se*, careció de efecto. El LiCl incrementó significativamente la secreción hormonal, mientras que la trifluoroperazina (TFP) no produjo efecto alguno (fig. R10). En experimentos similares en los que se usó cafeína, NaF, 1,9-dideoxiforskolin (dideoxi.) y forskolin (forsk.) se encontró que todos, exceptuando al dideoxi. fueron capaces de incrementar significativamente la secreción estimulada (fig. R11).

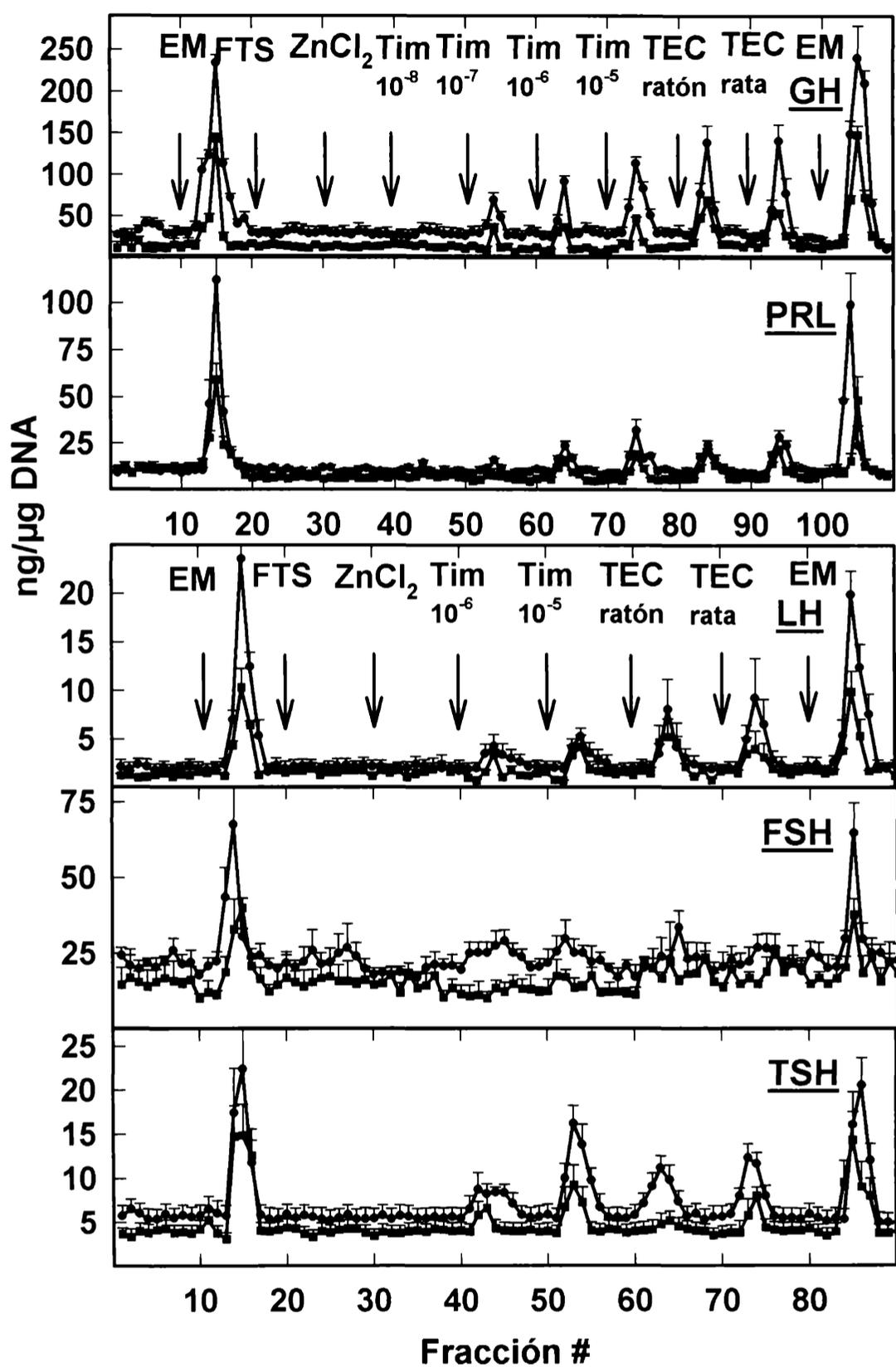


FIGURA R6: *Respuestas secretorias de las células hipofisarias de ratas hembras jóvenes y senescentes frente a EM 1/30, FTS 10^{-5} M, $ZnCl_2$ 0,86 $\mu g/ml$, sobrenadantes de TEC de rata y de ratón y timulina (Tim) a las siguientes concentraciones: 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M. En cada panel se indica el tipo de hormona dosada. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 9$. Con $\bullet-\bullet-$ se indica la cantidad de hormona liberada por las células de ratas jóvenes y con $\blacksquare-\blacksquare-$ la liberada por las células de ratas senescentes.*

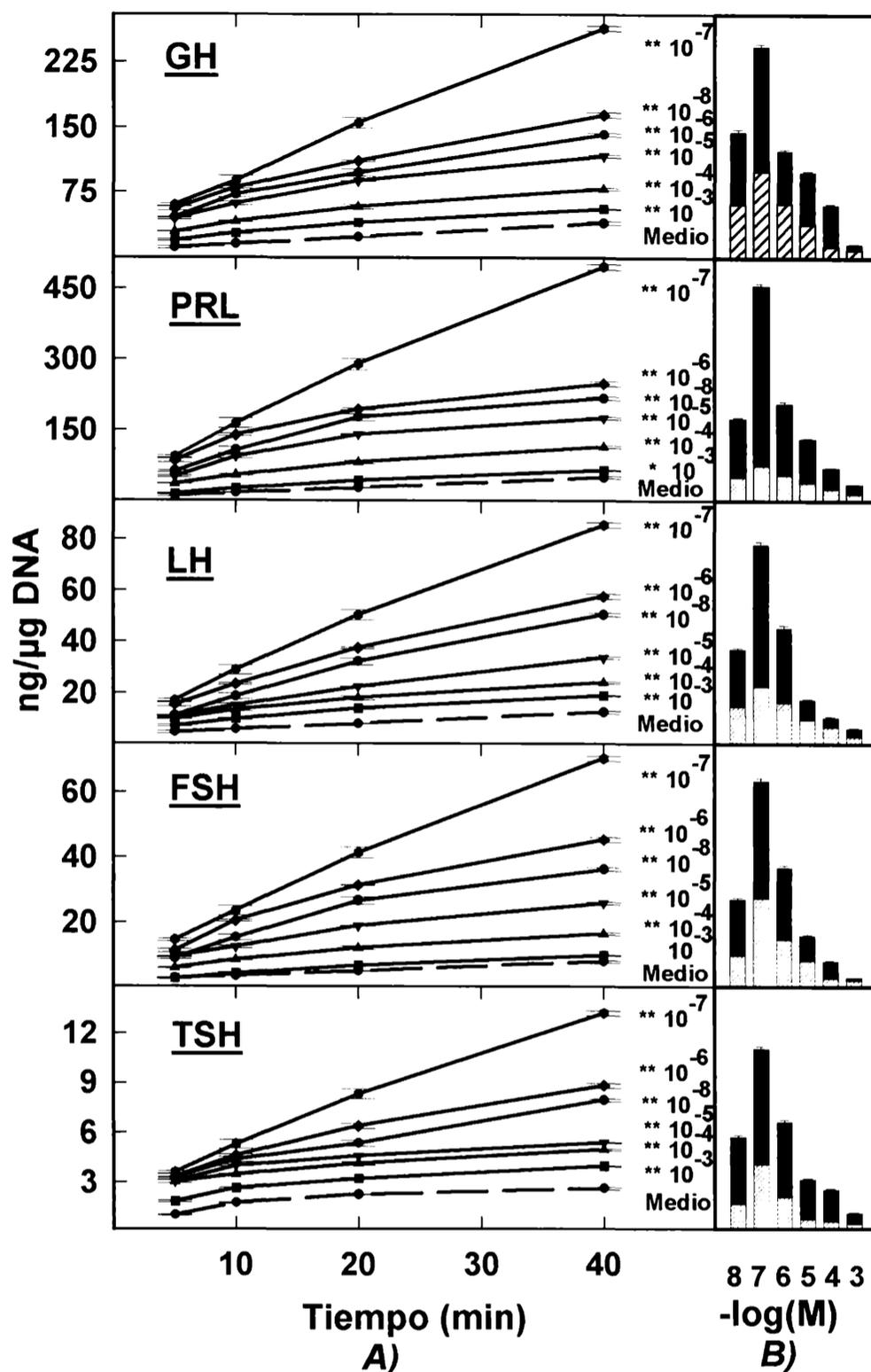


FIGURA R7: A) Cinética de liberación de GH, PRL, LH, FSH y TSH en células hipofisarias de rata hembra joven incubadas con timulina a concentraciones de 10^{-8} a 10^{-3} M. En B se pueden observar las curvas dosis respuesta para liberación de las diferentes hormonas por sobre su nivel basal a los 40 min de incubación de células hipofisarias de rata joven (barras negras) y senescentes (barras tramadas) frente a las dosis molares de timulina indicadas anteriormente. Las barras tramadas solapan la parte inferior de las barras sólidas. En cada panel del grupo A se indica la hormona dosada. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 6$. ** = $p < 0,01$ y * = $p < 0,05$ cuando se comparan con sus respectivos basales.

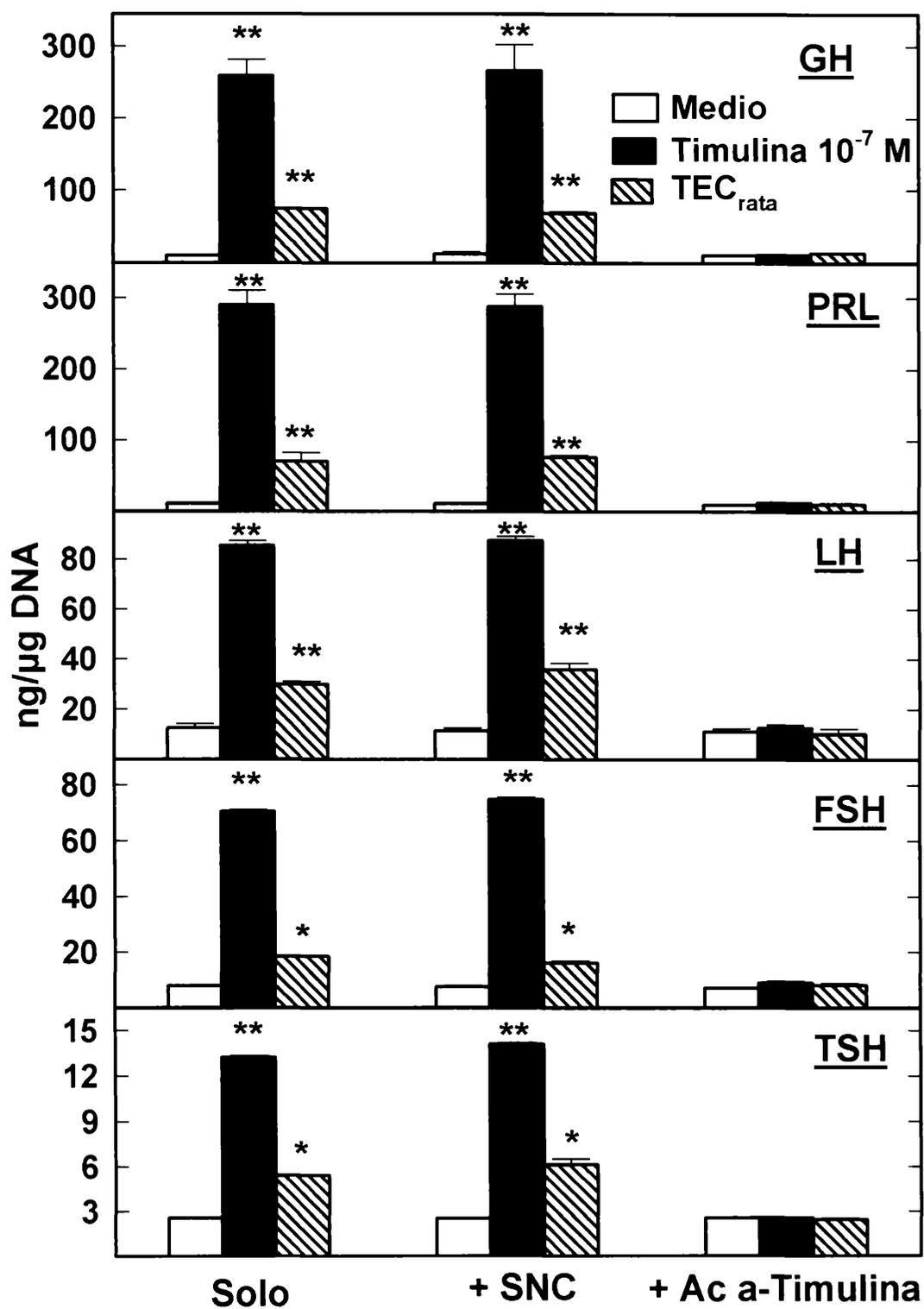


FIGURA R8: Efecto del suero normal de conejo (SNC) 1/500 o de anticuerpo anti-timulina 1/500 generado en conejo, sobre la secreción de GH, PRL, LH, FSH y TSH inducida por timulina 10^{-7} M o por sobrenadantes de TEC de rata (es de resaltar que el anticuerpo fue capaz de bloquear la secreción de de las hormonas hipofisarias cuando se usaron dosis de 10^{-3} a 10^{-8} M, datos no mostrados). En cada panel se indica la hormona dosada. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 5$.

** = $p < 0,01$ y * = $p < 0,05$ cuando se comparan con sus respectivos basales.

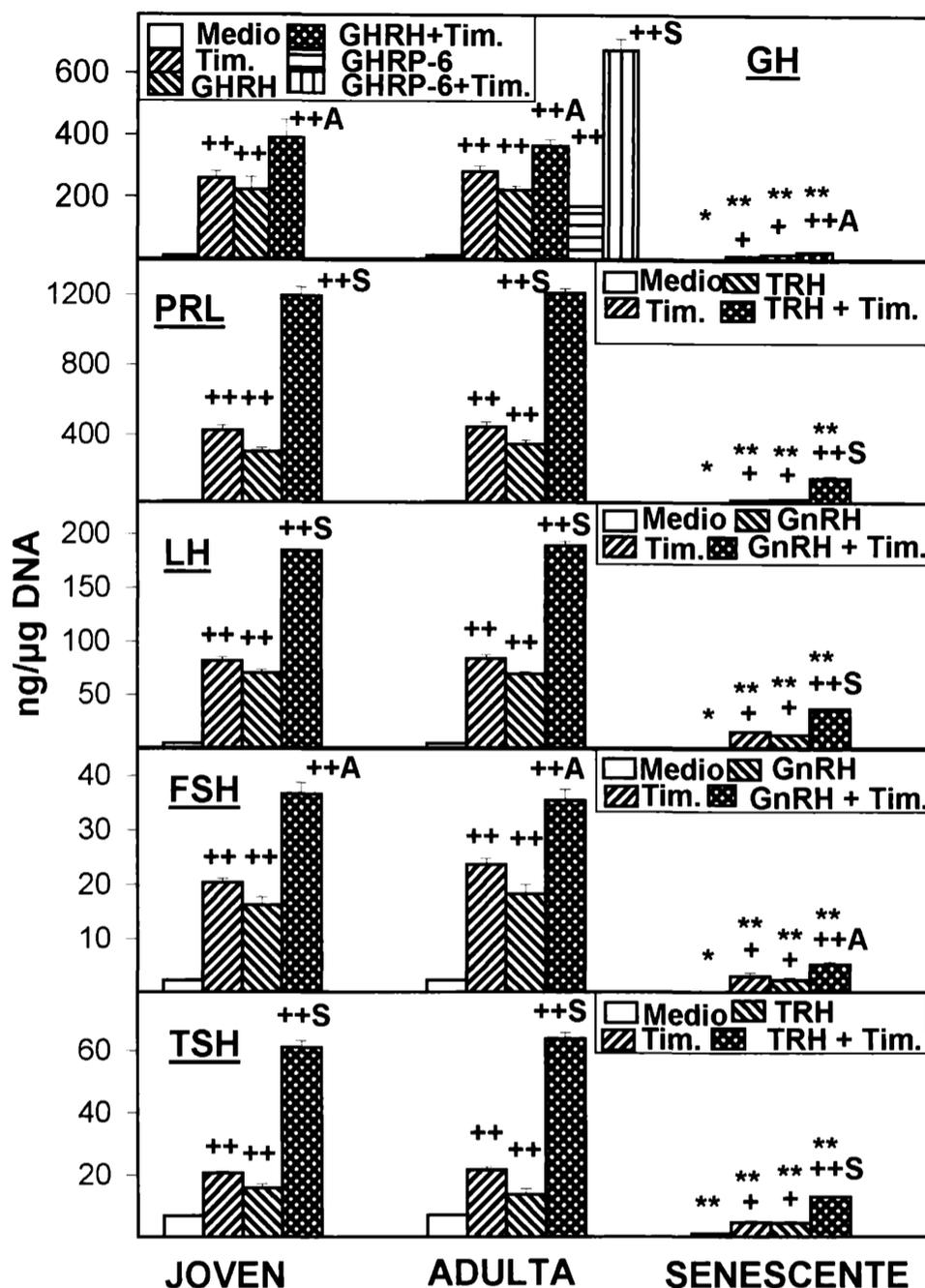


FIGURA R9: Efecto de GHRH $0,1 \mu\text{M}$, GHRP-6 $1,0 \mu\text{M}$, TRH $0,1 \mu\text{M}$ y GnRH $10^2 \mu\text{M}$ sobre la liberación de GH, PRL, LH, FSH y TSH estimulada por timulina $0,1 \mu\text{M}$ en células hipofisarias de ratas hembras jóvenes, adultas y senescentes. En cada panel se indica la hormona dosada y las sustancias usadas. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 8$. * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta al mismo tratamiento con la de las células de animales jóvenes; + = $p < 0,05$ y ++ = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta estimulada con su basal dentro del mismo grupo etáreo; S = efecto sinérgico, A = efecto aditivo. Se considera efecto sinérgico cuando la respuesta obtenida es significativamente ($p < 0,05$) mayor que la suma de las respuestas obtenidas por los estímulos individuales y aditivo cuando es significativamente mayor que la respuesta de los estímulos individuales pero menor que la respuesta sinérgica.

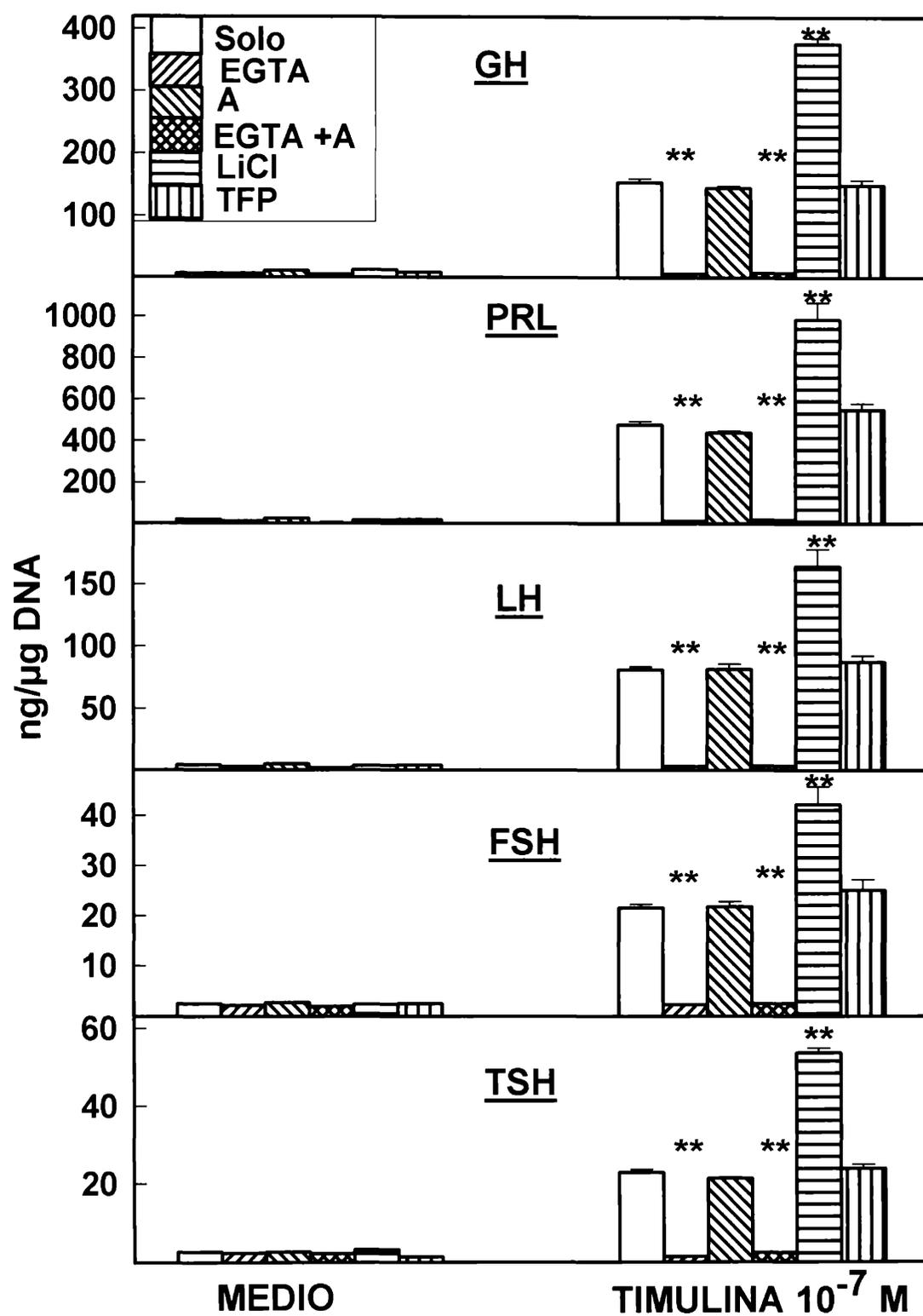


FIGURA R10: Efecto de EGTA 5 mM, ionóforo A23187 5 μM, ionóforo A23187, 5 μM + EGTA 5 mM, LiCl 10 mM y TFP 15 mM sobre la secreción de GH, PRL, LH, FSH y TSH inducida por timulina 10⁻⁷ M en células hipofisarias de rata hembra joven. En cada panel se indica la hormona dosada. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, n = 4. * = p < 0,05 y ** = p < 0,01 cuando se comparan contra sus respectivas secreciones basales.

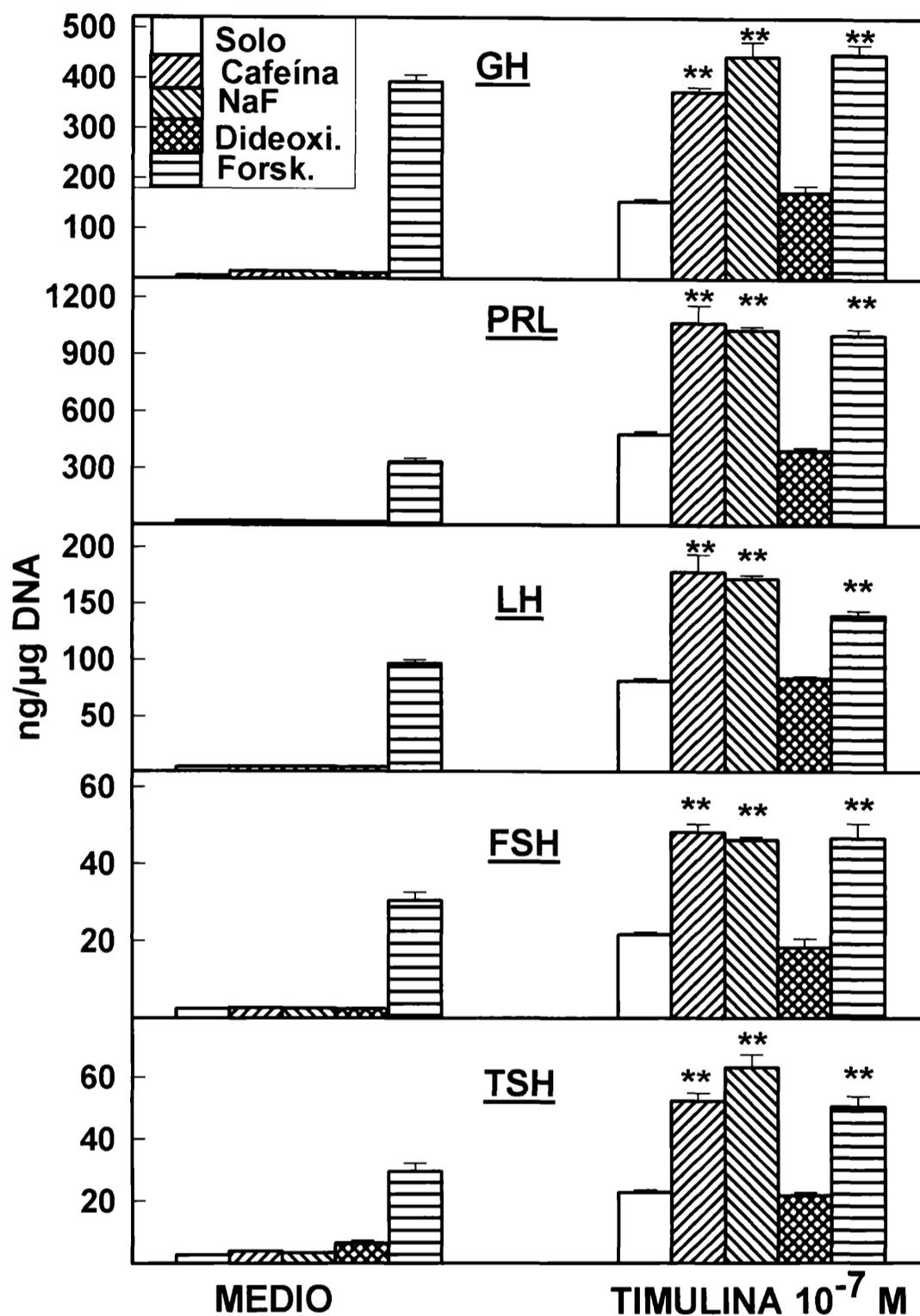


FIGURA R11: Efecto de cafeína 10 mM, forskolin 30 μM y dideoxyforskolin 30 μM sobre la secreción de GH, PRL, LH, FSH y TSH inducida por timulina 10⁻⁷ M en células hipofisarias de rata hembra joven. En cada panel se indica la hormona dosada. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, n = 4. * = p < 0,05 y ** = p < 0,01 cuando se comparan contra sus respectivas secreciones básicas.

C) COMPORTAMIENTO SECRETORIO DE LAS CELULAS HIPOFISARIAS FRENTE A HISTONAS Y NUCLEOHISTONAS

Estudios de perfusión

Con el fin de examinar un posible efecto hipofisotrófico de la timosina fracción 5 (TF5), histona H2A o nucleohistonas (NH), se perfundieron células hipofisarias de ratas hembras jóvenes con EM, TF5, histona H2A, NH y los filtrados de histona H2A y NH, a través de un filtro de límite de exclusión de 12 kDa, capaz de retener estas dos sustancias. Así se halló que TF5 es incapaz de ejercer efecto alguno sobre la liberación de las hormonas estudiadas, razón por la cual no se siguió investigando sus efectos en los experimentos subsiguientes. La histona H2A y la NH estimularon la liberación de GH, PRL, LH y TSH pero no FSH, mientras que los filtrados conteniendo sustancias de menor peso molecular que la histona H2A o la NH no estimularon la liberación de ninguna de las cinco hormonas (fig. R12). En el siguiente experimento de perfusión se comparó la respuesta de las células hipofisarias de ratas hembras jóvenes y senescentes frente al péptido MB35, la NH y a las histonas H2A, H2B y H3, observándose que mientras el péptido MB35 no ejerció efecto secretagogo alguno, las otras cuatro preparaciones fueron capaces de estimular la liberación de GH, PRL, LH y TSH aunque no la de FSH. Se observó una respuesta disminuida de las células de ratas senescentes en relación a de las jóvenes frente a estos mismos estímulos. Los niveles basales de FSH y PRL no variaron con la edad, pero los de GH, LH y TSH fueron menores en las células adenohipofisarias provenientes de ratas senescentes (fig. R13).

Estudios con incubados celulares

Los estudios de la cinética de liberación hormonal en células hipofisarias de ratas jóvenes y senescentes incubadas durante 5 a 40 min con dos concentraciones diferentes de la histona H2A mostraron que la misma es capaz de producir la liberación de las cinco hormonas estudiadas en forma tiempo- y dosis-dependiente. Esta respuesta se observó en ambos grupos etáreos pero con menor intensidad en el grupo senescente. A estos tiempos de incubación el péptido MB35 resultó inactivo como secretagogo bloqueando además la secreción hormonal inducida por la histona H2A (fig. R14 panel A). Sin embargo, durante incubaciones más prolongadas, el péptido MB35 fue un moderado secretagogo de GH, PRL, LH, FSH y TSH (fig. R14 panel B). En un estudio similar donde se utilizaron tres concentraciones diferentes de la histona H2B, se observó que tanto para las células hipofisarias de ratas

jóvenes como para las de senescentes esta histona pudo estimular la liberación hormonal en forma tiempo- y dosis-dependiente. En todos los casos, la estimulación fue menor en las células derivadas de animales senescentes (fig. R15). Cuando las células hipofisarias de ratas jóvenes y senescentes fueron incubadas con tres dosis diferentes de la histona H3 se observó un patrón idéntico al antes mencionado. El anticuerpo TNT2, que reconoce epitopes específicos para las histonas H1 y H3, bloqueó totalmente el efecto estimulador de la histona H3 cuando ésta fue preincubada por 3 hs con dicho anticuerpo (fig. R16).

El estudio del efecto de la combinación de las histonas H2A, H2B y H3 con los secretagogos GHRH y GHRP-6 y de la posible actividad del péptido básico poly-Lys sobre la liberación de GH en células hipofisarias de ratas jóvenes, adultas y senescentes mostró que GHRH sinergiza la secreción estimulada por histonas, que GHRP-6 produce un efecto aditivo con éstas y que, poly-Lys no ejerce efecto alguno sobre la secreción basal de GH ni sobre la secreción de GH estimulada por GHRH o GHRP-6 (Tabla R2). Se estudió también la acción de TRH, observándose que este tripéptido ejerce un efecto aditivo sobre la secreción de PRL y TSH estimuladas por las histonas H2A, H2B y H3 y que la poly-Lys resultó incapaz de alterar la secreción basal o estimulada por TRH de PRL y TSH (tablas R3 y R6). Además, el uso de GnRH condujo a los mismos resultados para la secreción de LH y FSH que los explicados anteriormente (tablas R4 y R5).

Los experimentos en los que se examinó el posible efecto de EGTA, A, EGTA+A, LiCl y TFP sobre la secreción de las cinco hormonas estimulada por las histonas H2A, H2B y H3 estudiadas usando células de ratas jóvenes, mostraron que EGTA, EGTA+A y TFP reducen la secreción estimulada, que el LiCl la incrementa y que A sólo, no posee efecto alguno (fig. R17). En experimentos similares en los que se utilizaron cafeína, NaF, dideoxi. y forsk. se observó que ninguno fue capaz de incrementar la secreción estimulada por las histonas H2A y H2B (no se ensayó la combinación con H3) (fig. R18).

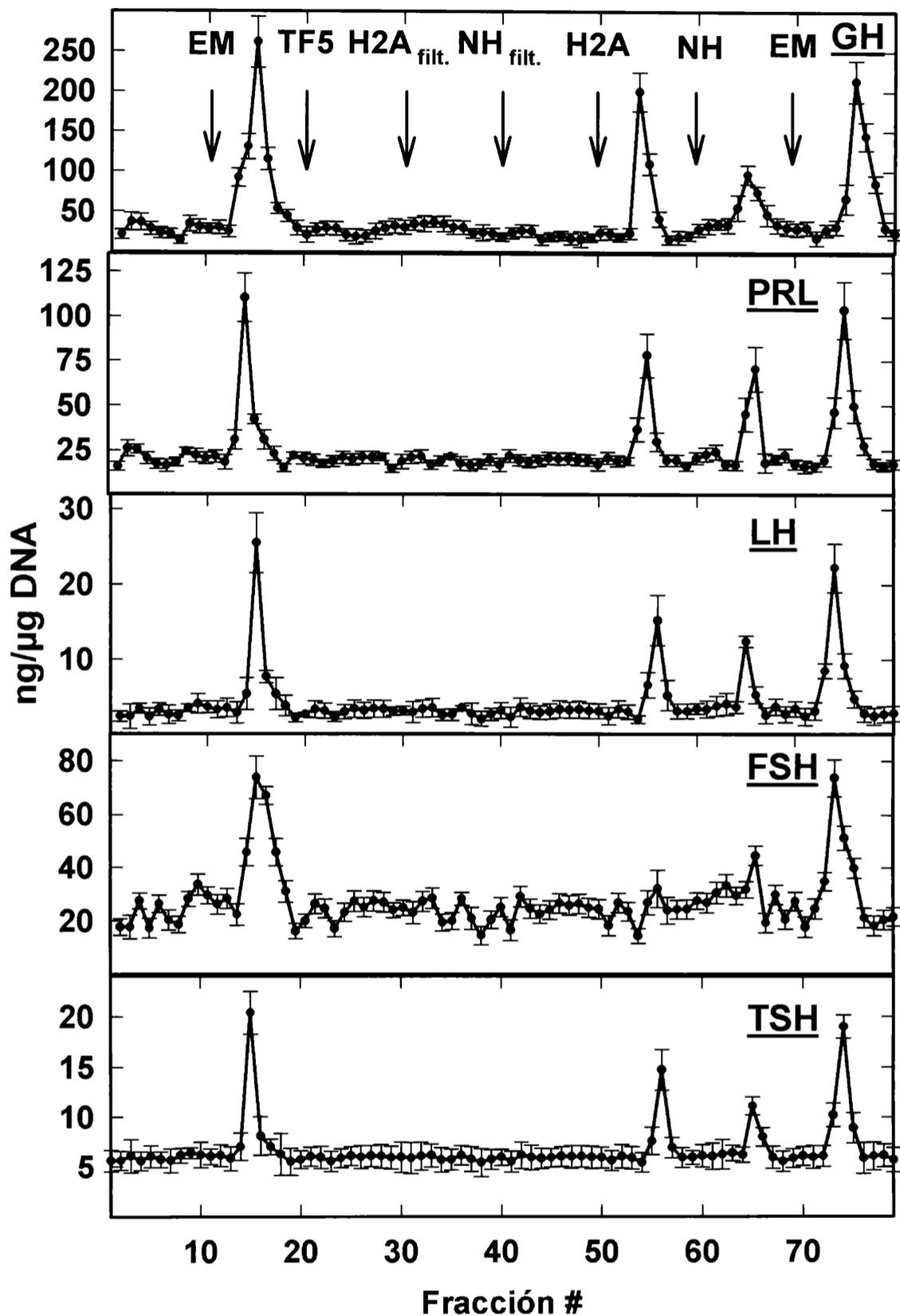


FIGURA R12: Masa de hormona liberada durante la perfusión de células hipofisarias de ratas hembras jóvenes con EM 1/30, 0,5 mg/ml de timosina fracción 5 (TF5), 0,5 mg/ml de nucleohistona (NH), 6 μ M de histona H2A y los filtrados de peso molecular menores de 12 Kd de las diluciones de NH e histona H2A preparadas a las concentraciones indicadas anteriormente. En cada panel se indica el tipo de hormona dosada. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 7$.

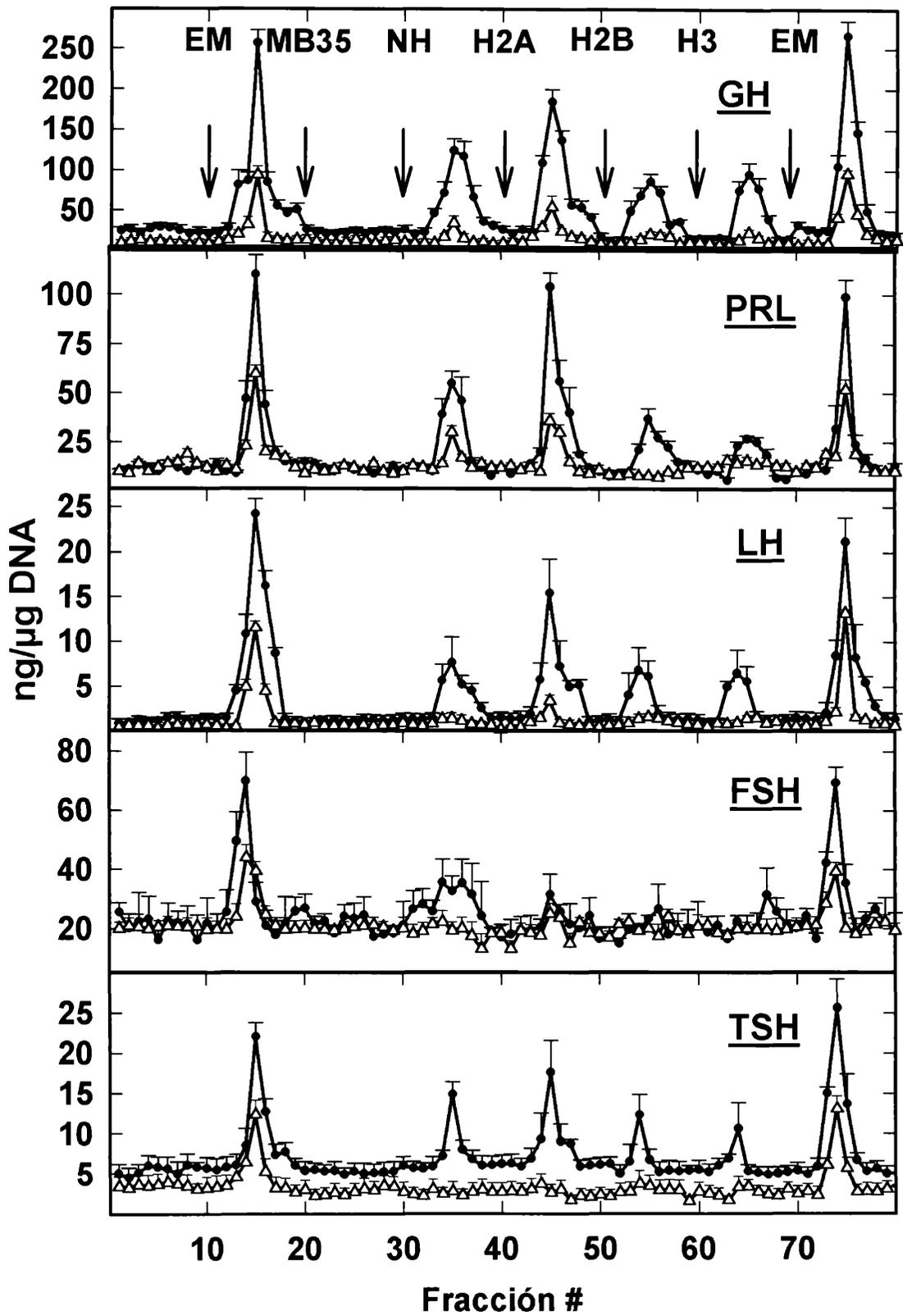


FIGURA R13: Efecto de EM 1/30, NH 0,5 mg/ml, péptido MB35 6 μ M y las histonas H2A, H2B y H3 todas a las concentraciones de 6 μ M sobre la secreción de GH, PRL, LH, FSH y TSH en células hipofisarias de ratas hembras jóvenes y senescentes. En cada panel se indica el tipo de hormona dosado. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 9$. Con $\bullet\text{---}\bullet$ se indica la cantidad de hormona liberada por las células de ratas jóvenes y con $\Delta\text{---}\Delta$ la liberada por las células de ratas senescentes.

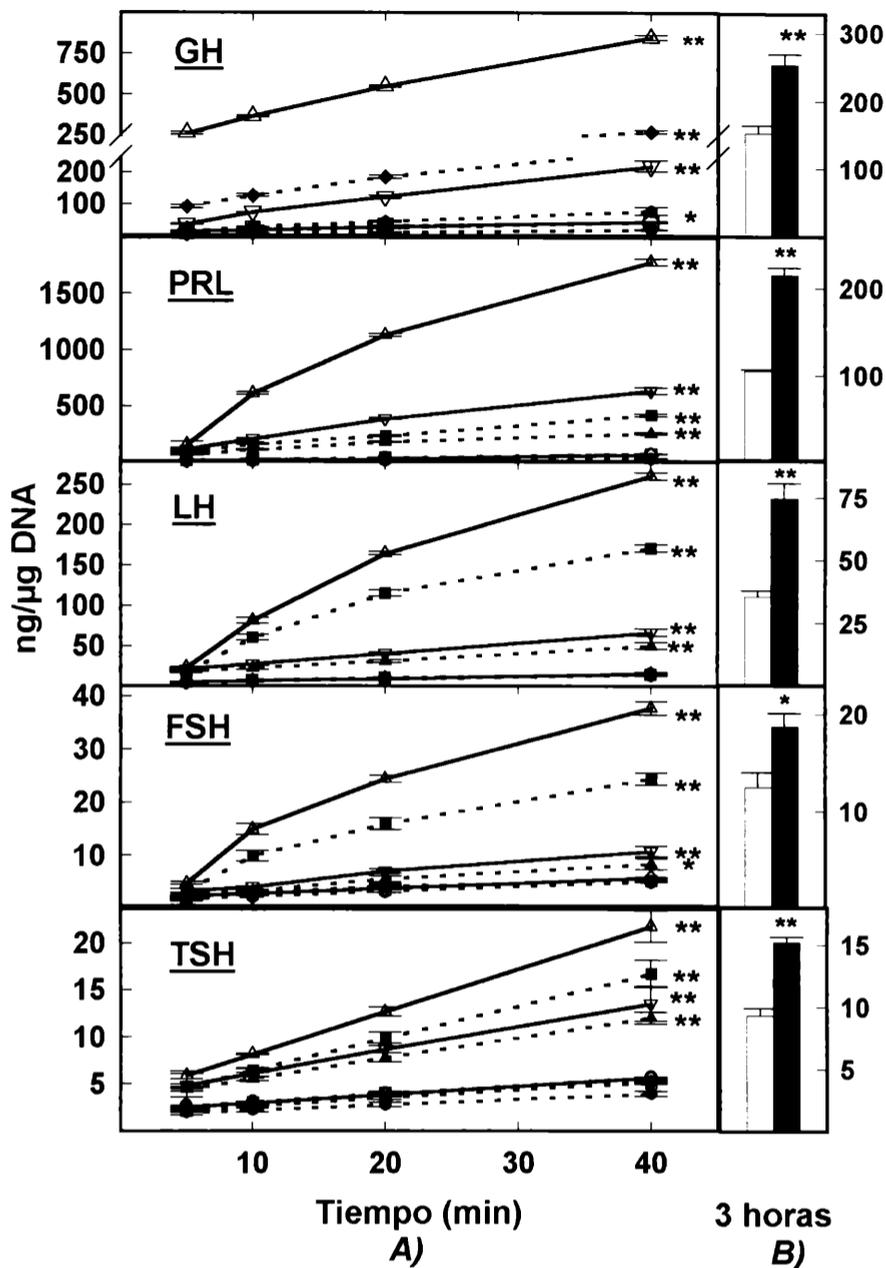


FIGURA R14: Cinética de liberación de GH, PRL, LH, FSH y TSH (Panel A) en células hipofisarias de ratas hembras jóvenes o senescentes incubadas con la histona H2A a concentraciones de 6 y 30 μM , con péptido MB35 1 μM o con combinaciones de ambas sustancias. Panel B: comparación entre la masa de hormona secretada en condiciones basales o en presencia de péptido MB35, 1 μM en células hipofisarias de ratas jóvenes incubadas por espacio de 3 horas. El tipo de hormona dosada se indica en cada panel A. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 6$. ** = $p < 0,01$ y * = $p < 0,05$ cuando los datos se comparan contra su correspondiente basal. Referencias: panel A: $\text{---}\Delta\text{---}\Delta\text{---}$ células hipofisarias de ratas jóvenes incubadas con histona H2A 30 μM $\text{---}\nabla\text{---}\nabla\text{---}$ células hipofisarias de ratas jóvenes incubadas con histona H2A 6 μM , $\text{.....}\blacktriangle\text{.....}\blacktriangle\text{.....}$ células hipofisarias de ratas jóvenes incubadas con histona H2A 30 μM y péptido MB35 1 μM , $\text{.....}\blacktriangledown\text{.....}\blacktriangledown\text{.....}$ células hipofisarias de ratas jóvenes incubadas con histona H2A 6 μM y péptido MB35 1 μM , $\text{---}\square\text{---}\square\text{---}$ liberación basal de las células hipofisarias de ratas jóvenes, $\text{.....}\bullet\text{.....}\bullet\text{.....}$ liberación basal de las células hipofisarias de ratas senescentes, $\text{.....}\circ\text{.....}\circ\text{.....}$ células hipofisarias de ratas jóvenes incubadas con péptido MB35 1 μM , $\text{.....}\blacklozenge\text{.....}\blacklozenge\text{.....}$ células hipofisarias de ratas senescentes incubadas con histona H2A 30 μM , $\text{.....}\bullet\text{.....}\bullet\text{.....}$ células hipofisarias de ratas senescentes incubadas con histona H2A 6 μM . Panel B: columnas vacías: liberación basal y columnas sólidas: liberación estimulada por el péptido MB35 a las 3 hs de incubación de células hipofisarias de ratas jóvenes.

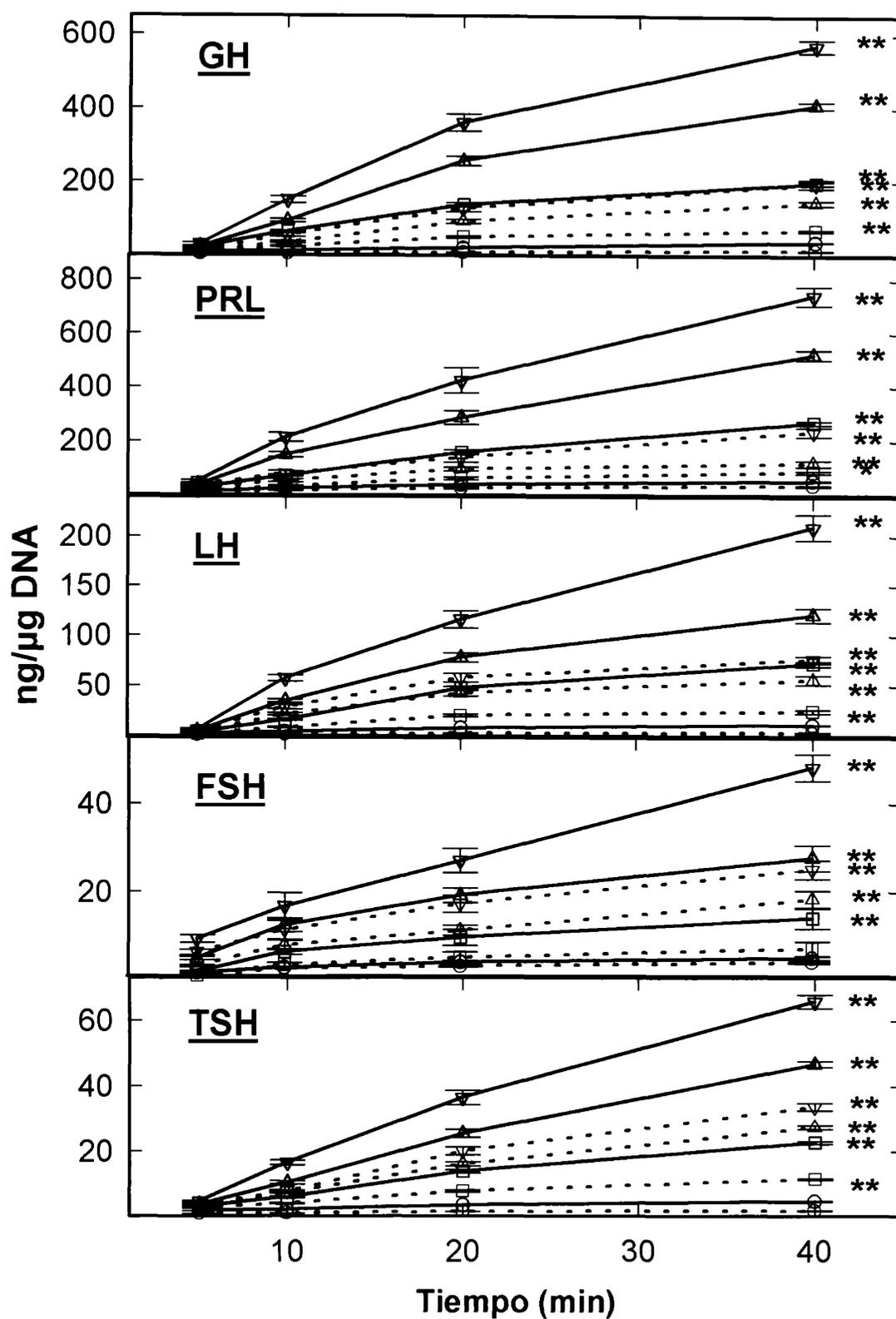


FIGURA R15: Cinética de liberación de GH, PRL, LH, FSH y TSH en células hipofisarias de ratas hembras jóvenes o senescentes incubadas con histona H2B a concentraciones de 1, 6 y 30 μM . En cada panel se indica la hormona dosada. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 6$. ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$ cuando los resultados se comparan con sus respectivos basales. Referencias: — células hipofisarias de ratas jóvenes, células hipofisarias de ratas senescentes, ○ secreción basal, □ secreción estimulada por histona H2B 1 μM , Δ secreción estimulada por histona H2B 6 μM , ∇ secreción estimulada por histona H2B 30 μM .

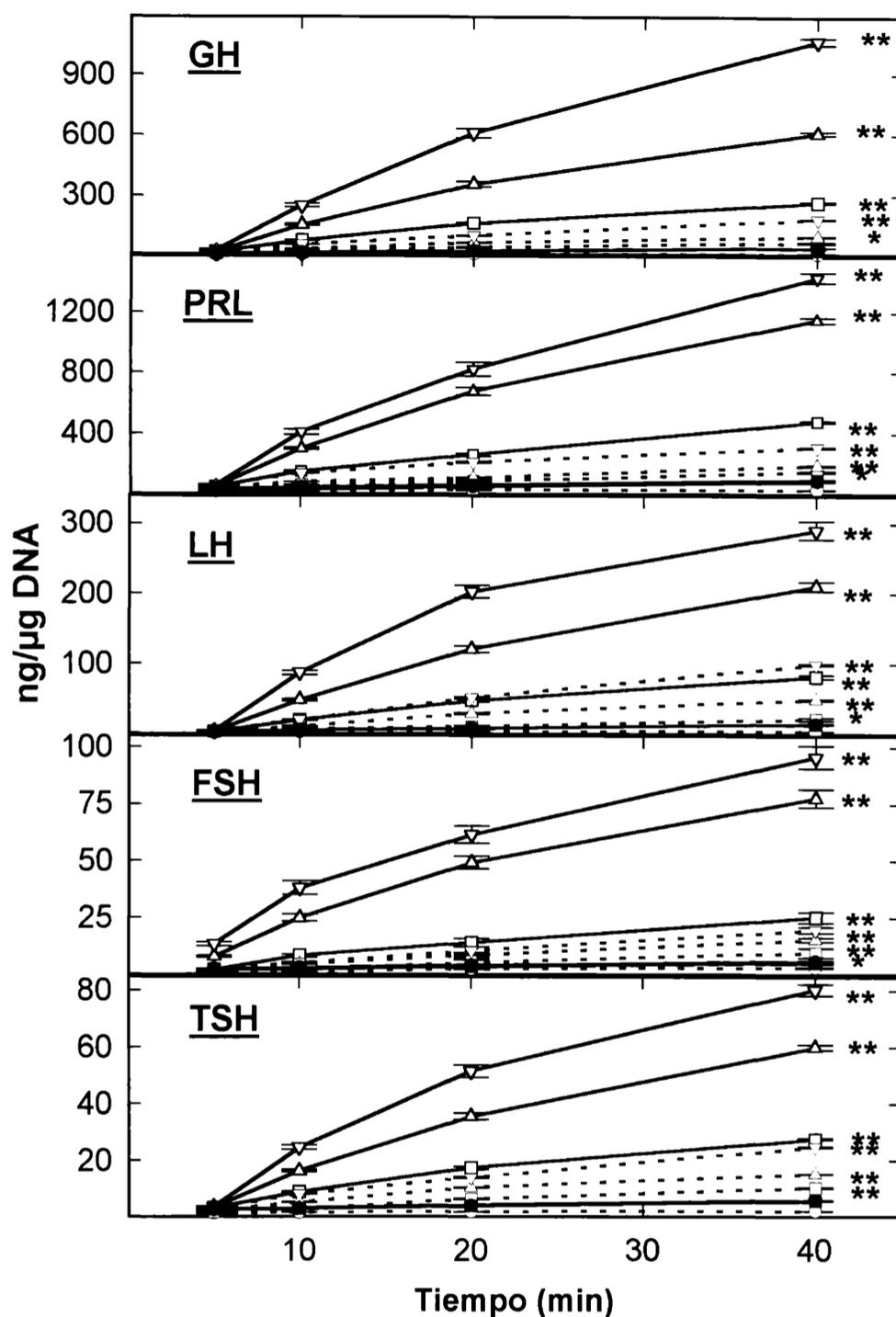


FIGURA R16: Cinética de liberación de GH, PRL, LH, FSH y TSH en células hipofisarias de ratas hembras jóvenes o senescentes con la histona H3 a concentraciones de 1, 6 y 30 μM . Además, se muestra el efecto de una dilución 1/50 del anticuerpo TNT2 sobre la acción secretagoga de la histona H3 sobre las células hipofisarias de animales jóvenes. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 6$. ** = $p < 0,01$ y * = $p < 0,05$ cuando los resultados se comparan con sus respectivos básicos. Referencias: — células hipofisarias de ratas jóvenes, células hipofisarias de ratas senescentes, ○ secreción basal, □ secreción estimulada por histona H3 1 μM , Δ secreción estimulada por histona H3 6 μM , ∇ secreción estimulada por histona H3 30 μM , ● secreción hormonal en presencia del anticuerpo NT2 1/50, \blacktriangle secreción estimulada por la mezcla de la histona H3 6 μM con el anticuerpo NT2 1/50, \blacktriangledown secreción estimulada por la mezcla de la histona H3 30 μM con el anticuerpo NT2 1/50.

TABLA R2: Efecto de GHRH o de GHRP-6 sobre la liberación de GH inducida por histonas H2A, H2B y H3 y poly-Lys en células hipofisarias de ratas jóvenes, adultas y senescentes incubadas durante 40 min. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM(n)$ expresados en ng hormona/ μ g ADN. * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta al mismo tratamiento con la de las células de animales jóvenes; ++ = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta estimulada con su basal dentro del mismo grupo etáreo; S = efecto sinérgico, A = efecto aditivo y A(-) sin efecto aditivo. ND = no hay datos (no se realizaron las incubaciones).

<u>ESTIMULO</u>	<u>JOVENES</u>	<u>ADULTAS</u>	<u>SENESCENTES</u>
MEDIO	9,6 \pm 1,9 (6)	11,2 \pm 2,4 (8)	1,1 \pm 0,3 (6) *
GHRH 0,1 μ M	223,6 \pm 39,2 (6) ++	222,8 \pm 11,7 (8) ++	16,4 \pm 3,5 (6) ***+
GHRP-6 1,0 μ M	ND	170,9 \pm 3,9 (8) ++	ND
H2A 6 μ M	235,4 \pm 18,3 (6) ++	243,6 \pm 18,7 (8) ++	16,3 \pm 2,3 (6) ***+
H2A 6 μ M + GHRH 0,1 μ M	738,6 \pm 27,5 (6) ++S	697,3 \pm 19,7 (8) ++S	65,4 \pm 6,4 (6) ***+S
H2A 6 μ M + GHRP-6 1,0 μ M	ND	339,9 \pm 10,7 (8) ++A	ND
H2B 6 μ M	217,0 \pm 11,8 (6) ++	210,5 \pm 13,1 (8) ++	12,2 \pm 1,9 (6) ***+
H2B 6 μ M + GHRH 0,1 μ M	526,6 \pm 22,4 (6) ++S	540,2 \pm 11,7 (8) ++S	57,1 \pm 10,3 (6) ***+S
H2B 6 μ M + GHRP-6 1,0 μ M	ND	259,8 \pm 13,7 (8) ++A	ND
H3 6 μ M	240,7 \pm 18,5 (6) ++	279,7 \pm 16,5 (8) ++	14,7 \pm 4,0 (6) ***+
H3 6 μ M + GHRH 0,1 μ M	705,3 \pm 46,0 (6) ++S	690,6 \pm 20,4 (8) ++S	78,9 \pm 15,4 (6) ***+S
H3 6 μ M + GHRP-6 1,0 μ M	ND	405,0 \pm 10,6 (8) ++A	ND
POLY-LYS 8 μ M	8,5 \pm 2,3 (6)	12,9 \pm 1,7 (8)	1,0 \pm 0,6 (6) *
POLY-LYS 8 μ M + GHRH 0,1 μ M	238,9 \pm 15,4 (6) ++A(-)	231,3 \pm 6,9 (8) ++A(-)	20,1 \pm 2,3 (6) ***+A(-)
POLY-LYS 8 μ M + GHRP-6 1,0 μ M	ND	180,6 \pm 3,0 (8) ++A(-)	ND

TABLA R3: Efecto de TRH sobre la liberación de PRL inducida por histonas H2A, H2B y H3 y poly-Lys en células hipofisarias de ratas jóvenes, adultas y senescentes incubadas durante 40 min. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM(n)$ expresados en ng hormona/ μ g ADN. * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta al mismo tratamiento con la de las células de animales jóvenes; ++ = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta estimulada con su basal dentro del mismo grupo etáreo; S = efecto sinérgico, A = efecto aditivo y A(-) sin efecto aditivo.

<u>ESTIMULO</u>	<u>JOVENES</u>	<u>ADULTAS</u>	<u>SENESCENTES</u>
MEDIO	15,3 \pm 2,2 (6)	16,5 \pm 2,6 (8)	1,5 \pm 0,5 (6) *
TRH 0,1 μ M	301,1 \pm 21,7 (6) ++	349,5 \pm 19,3 (8) ++	29,7 \pm 4,1 (6) ***+
H2A 6 μ M	563,1 \pm 27,4 (6) ++	595,0 \pm 28,7 (8) ++	28,2 \pm 5,4 (6) ***+
H2A 6 μ M + TRH 0,1 μ M	894,0 \pm 56,1 (6) ++A	923,1 \pm 35,7 (8) ++A	35,4 \pm 8,1 (6) ***+A
H2B 6 μ M	331,2 \pm 39,7 (6) ++	375,3 \pm 21,7 (8) ++	18,1 \pm 3,5 (6) ***+
H2B 6 μ M + TRH 0,1 μ M	639,5 \pm 16,6 (6) ++A	625,8 \pm 29,6 (8) ++A	30,0 \pm 6,2 (6) ***+A
H3 6 μ M	647,3 \pm 39,5 (6) ++	612,3 \pm 45,1 (8) ++	38,6 \pm 9,2 (6) ***+
H3 6 μ M + TRH 0,1 μ M	964,9 \pm 31,4 (6) ++A	1001,0 \pm 57,0 (8) ++A	49,8 \pm 11,3 (6) ***+A
POLY-LYS 8 μ M	17,2 \pm 1,6 (6)	20,3 \pm 3,3 (8)	2,0 \pm 0,7 (6) *
POLY-LYS 8 μ M + TRH 0,1 μ M	324,5 \pm 19,1 (6) ++A(-)	362,1 \pm 12,4 (8) ++A(-)	27,1 \pm 3,7 (6) ***+A(-)

TABLA R4: Efecto de GnRH sobre la liberación de LH inducida por histonas H2A, H2B y H3 y poly-Lys en células hipofisarias de ratas jóvenes, adultas y senescentes incubadas durante 40 min. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM(n)$ expresados en ng hormona/ μ g ADN. * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta al mismo tratamiento con la de las células de animales jóvenes; ++ = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta estimulada con su basal dentro del mismo grupo etáreo; S = efecto sinérgico, A = efecto aditivo y A(-) sin efecto aditivo.

<u>ESTIMULO</u>	<u>JOVENES</u>	<u>ADULTAS</u>	<u>SENESCENTES</u>
MEDIO	4,02 \pm 0,35 (6)	3,93 \pm 0,42 (8)	0,31 \pm 0,03 (6) *
GnRH 10 ⁻² μ M	70,22 \pm 2,87 (6) ++	69,83 \pm 1,54 (8) ++	12,36 \pm 0,96 (6) ***+
H2A 6 μ M	120,00 \pm 2,15 (6) ++	131,12 \pm 3,41 (8) ++	21,13 \pm 1,12 (6) ****+
H2A 6 μ M + GnRH 10 ⁻² μ M	191,62 \pm 4,16 (6) ++A	180,15 \pm 5,63 (8) ++A	28,11 \pm 2,16 (6) ****+A
H2B 6 μ M	115,36 \pm 2,73 (6) ++	112,80 \pm 4,62 (8) ++	19,74 \pm 0,82 (6) ****+
H2B 6 μ M + GnRH 10 ⁻² μ M	145,12 \pm 2,11 (6) ++A	150,47 \pm 3,28 (8) ++A	25,64 \pm 0,85 (6) ****+A
H3 6 μ M	130,92 \pm 3,36 (6) ++	124,61 \pm 5,24 (8) ++	23,81 \pm 0,95 (6) ****+
H3 6 μ M + GnRH 10 ⁻² μ M	175,81 \pm 5,16 (6) ++A	168,11 \pm 6,15 (8) ++A	28,13 \pm 1,23 (6) ****+A
POLY-LYS 8 μ M	3,98 \pm 0,12 (6)	4,17 \pm 0,79 (8)	0,25 \pm 0,02 (6) *
POLY-LYS 8 μ M + GnRH 10 ⁻² μ M	72,18 \pm 2,74 (6) ++A(-)	76,28 \pm 4,13 (8) ++A(-)	10,69 \pm 1,08 (6) ****+A(-)

TABLA R5: Efecto de GnRH sobre la liberación de FSH inducida por histonas H2A, H2B y H3 y poly-Lys en células hipofisarias de ratas jóvenes, adultas y senescentes incubadas durante 40 min. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM(n)$ expresados en ng hormona/ μ g ADN. * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta al mismo tratamiento con la de las células de animales jóvenes; ++ = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta estimulada con su basal dentro del mismo grupo etáreo; S = efecto sinérgico, A = efecto aditivo y A(-) sin efecto aditivo.

<u>ESTIMULO</u>	<u>JOVENES</u>	<u>ADULTAS</u>	<u>SENESCENTES</u>
MEDIO	2,42 \pm 0,13 (6)	2,45 \pm 0,24 (8)	0,08 \pm 0,01 (6) *
GnRH 10 ⁻² μ M	16,25 \pm 1,43 (6) ++	18,32 \pm 1,76 (8) ++	2,41 \pm 0,52 (6) ***+
H2A 6 μ M	34,15 \pm 2,21 (6) ++	34,87 \pm 1,56 (8) ++	4,16 \pm 0,35 (6) ***+
H2A 6 μ M + GnRH 10 ⁻² μ M	46,23 \pm 2,15 (6) ++A	41,13 \pm 2,18 (8) ++A	5,63 \pm 0,11 (6) ****+A
H2B 6 μ M	26,87 \pm 1,51 (6) ++	28,72 \pm 1,93 (8) ++	3,90 \pm 0,39 (6) ***+
H2B 6 μ M + GnRH 10 ⁻² μ M	40,01 \pm 1,97 (6) ++A	39,63 \pm 1,29 (8) ++A	5,48 \pm 0,36 (6) ****+A
H3 6 μ M	35,02 \pm 3,17 (6) ++	33,62 \pm 2,25 (8) ++	4,58 \pm 0,18 (6) ***+
H3 6 μ M + GnRH 10 ⁻² μ M	46,73 \pm 3,87 (6) ++A	50,81 \pm 3,12 (8) ++A	6,95 \pm 0,41 (6) ****+A
POLY-LYS 8 μ M	2,51 \pm 0,25 (6)	2,71 \pm 0,36 (8)	0,10 \pm 0,03 (6) *
POLY-LYS 8 μ M + GnRH 10 ⁻² μ M	18,14 \pm 1,15 (6) ++A(-)	19,24 \pm 2,24 (8) ++A(-)	1,99 \pm 0,17 (6) ****+A(-)

TABLA R6: Efecto de TRH sobre la liberación de TSH inducida por histonas H2A, H2B y H3 y poly-Lys en células hipofisarias de ratas jóvenes, adultas y senescentes incubadas durante 40 min. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM(n)$ expresados en ng hormona/ μ g ADN. * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta al mismo tratamiento con la de las células de animales jóvenes; ++ = $p < 0,01$ cuando se compara la respuesta estimulada con su basal dentro del mismo grupo etáreo; S = efecto sinérgico, A = efecto aditivo y A(-) sin efecto aditivo.

<u>ESTIMULO</u>	<u>JOVENES</u>	<u>ADULTAS</u>	<u>SENESCENTES</u>
MEDIO	6,82 \pm 0,12 (6)	6,95 \pm 0,08 (8)	0,93 \pm 0,07 (6) **
TRH 0,1 μ M	15,67 \pm 1,18 (6) +	13,64 \pm 1,78 (8) +	4,42 \pm 0,36 (6) ***
H2A 6 μ M	27,15 \pm 2,13 (6) ++	31,24 \pm 4,42 (8) ++	5,12 \pm 0,17 (6) ***
H2A 6 μ M + TRH 0,1 μ M	38,12 \pm 1,28 (6) ++A	43,69 \pm 3,96 (8) ++A	8,64 \pm 0,25 (6) ***+A
H2B 6 μ M	22,36 \pm 0,95 (6) ++	20,14 \pm 1,68 (8) ++	4,68 \pm 0,12 (6) ***
H2B 6 μ M + TRH 0,1 μ M	30,47 \pm 1,03 (6) ++A	32,57 \pm 3,26 (8) ++A	7,53 \pm 0,11 (6) ***+A
H3 6 μ M	32,15 \pm 4,72 (6) ++	28,12 \pm 4,41 (8) ++	4,96 \pm 0,43 (6) ***
H3 6 μ M + TRH 0,1 μ M	43,28 \pm 1,24 (6) ++A	45,62 \pm 3,96 (8) ++A	7,87 \pm 0,62 (6) ***+A
POLY-LYS 8 μ M	6,15 \pm 0,69 (6)	7,10 \pm 1,05 (8)	0,85 \pm 0,10 (6) *
POLY-LYS 8 μ M + TRH 0,1 μ M	12,14 \pm 2,61 (6) ++A(-)	11,22 \pm 0,98 (8) ++A(-)	4,56 \pm 0,31 (6) ***+A(-)

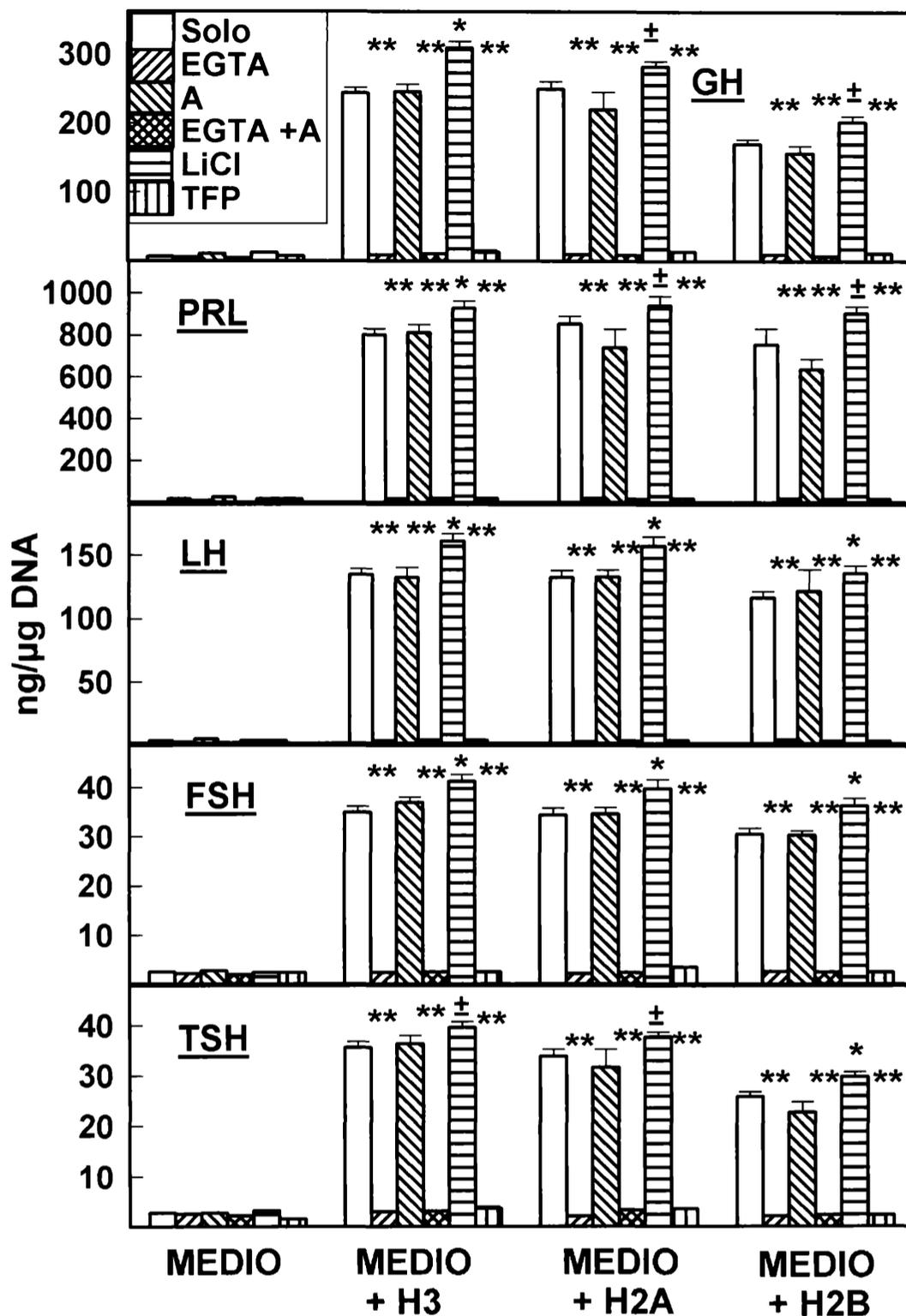


FIGURA R17: Efecto de EGTA 5 mM, ionóforo A23187 5 μ M, ionóforo A23187 5 μ M + EGTA 5 mM, LiCl 10 mM y trifluoroperazina (TFP) 15 mM sobre la secreción de GH, PRL, LH, FSH y TSH por las células hipofisarias de rata hembra joven inducida por las histonas H2A, H2B y H3 6 μ M. En cada panel se indica la hormona dosada. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 4$. $\pm = p < 0,08$, $* = p < 0,05$ y $** = p < 0,01$ cuando se comparan contra sus respectivas secreciones básicas.

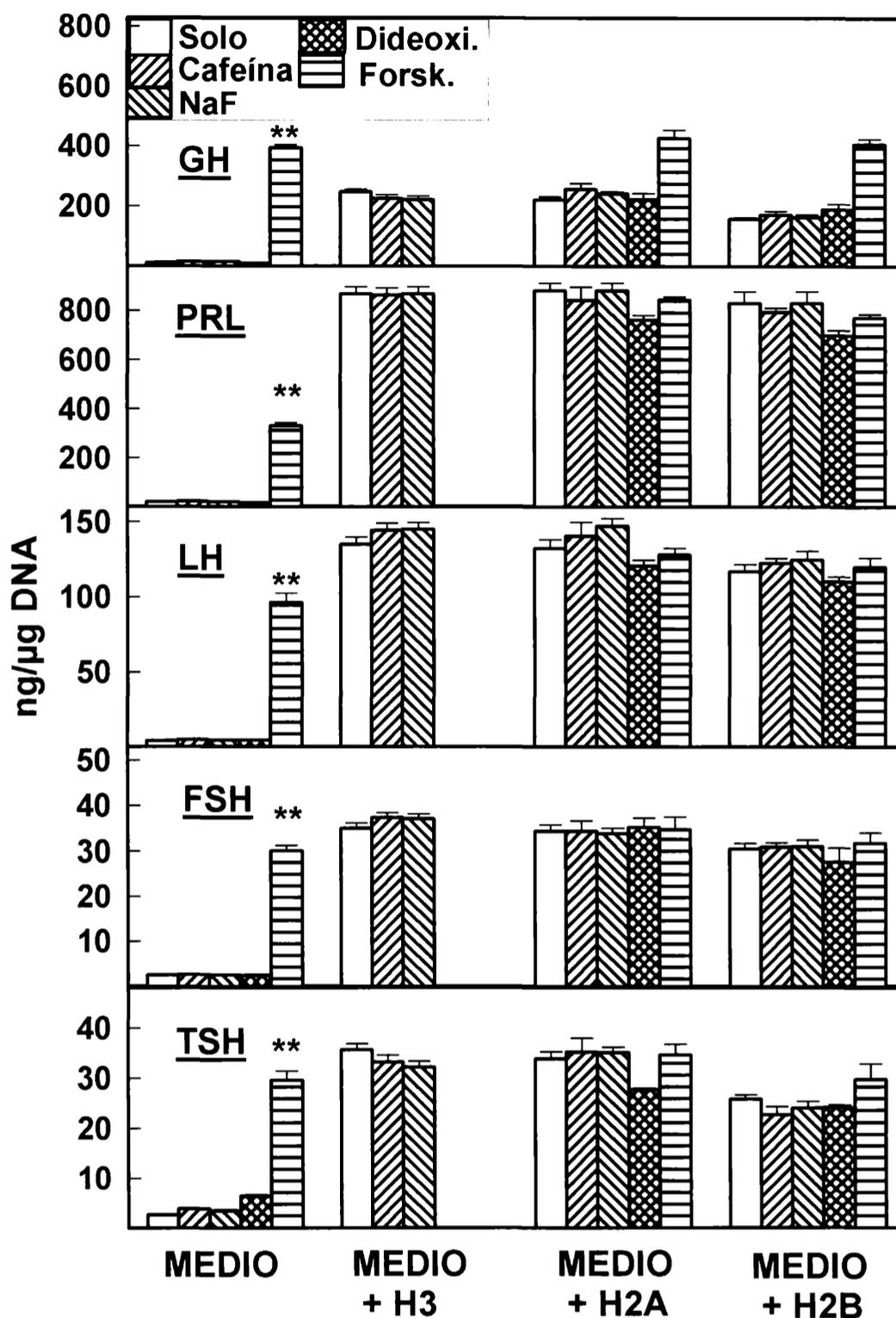


FIGURA R18: Efecto de cafeína 10 mM, NaF 10 mM, 15 mM, forskolin 30 μ M (forsk.) y dideoxiforskolin 30 μ M (dideoxi.) sobre la secreción de GH, PRL, LH, FSH y TSH por las células hipofisarias de rata hembra joven inducida por las histonas H2A, H2B y H3 6 μ M. En cada panel se indica la hormona dosada. No se investigó el efecto de forsk. o dideoxi sobre la secreción hormonal estimulada por la acción de la histona H3. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 4$. * = $p < 0,05$ y ** = $p < 0,01$ cuando se comparan contra sus respectivas secreciones basales.

D) DNA CIRCULANTE Y MUERTE CELULAR SISTEMICA

La comparación de los niveles sérico y plasmático de DNA en ratas jóvenes no mostró, con el método utilizado, diferencias significativas entre los dos grupos de determinaciones (fig. R19). Cuando se determinó el nivel de DNA sérico para ratas jóvenes y senescentes se encontró que en los animales senescentes el DNA sérico estuvo incrementado en relación a su contraparte joven (fig. R20). La inducción de apoptosis masiva en los órganos linfoides (particularmente el timo) de ratas jóvenes por tratamiento con dexametasona en el agua de bebida (10 µg/ml) indujo un progresivo aumento en los niveles plasmáticos de DNA en los animales. A los tres días de tratamiento el timo se encontró reducido a alrededor de un 25 % del peso original (fig. R21).

Cuando se trató de testear un posible efecto secretagogo de DNA, histona H2A y NH inyectándolos intrayugularmente en ratas crónicamente canuladas no se detectó ningún efecto sobre los niveles circulantes de PRL, LH o FSH (fig. R22).

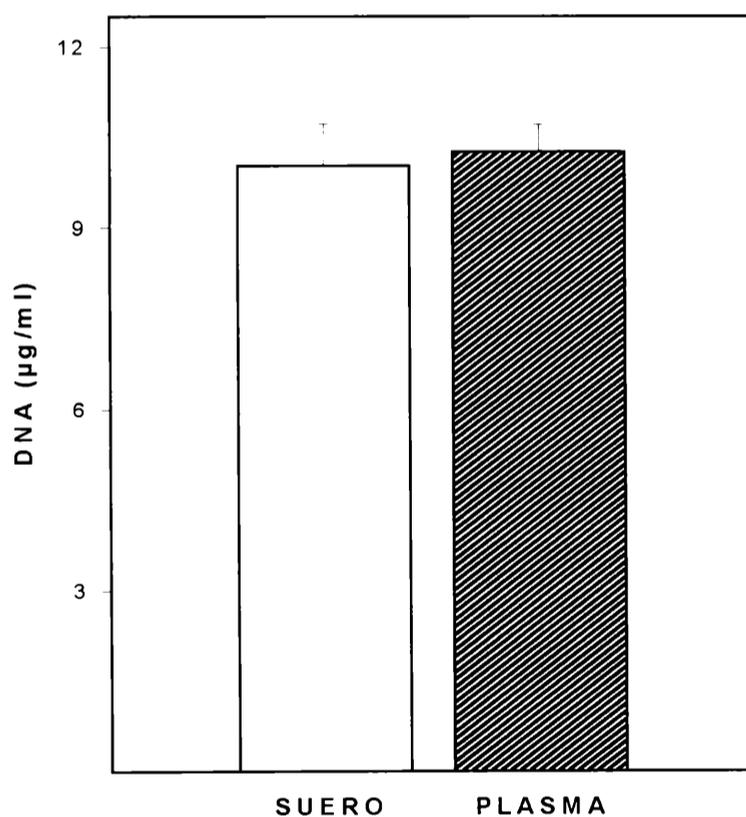


FIGURA R19: Niveles sérico y plasmático de DNA en ratas hembras jóvenes. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 10$.

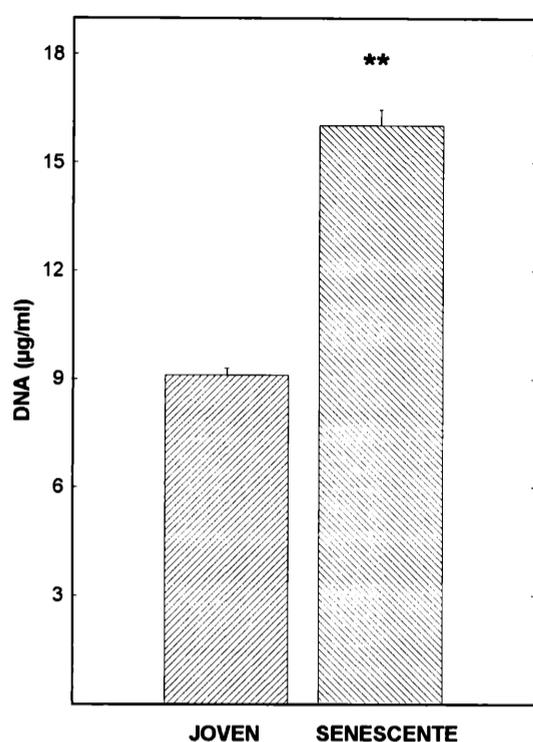


FIGURA R20: Niveles séricos de DNA en ratas hembras jóvenes y senescentes. . Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 20$. ** $p < 0,01$.

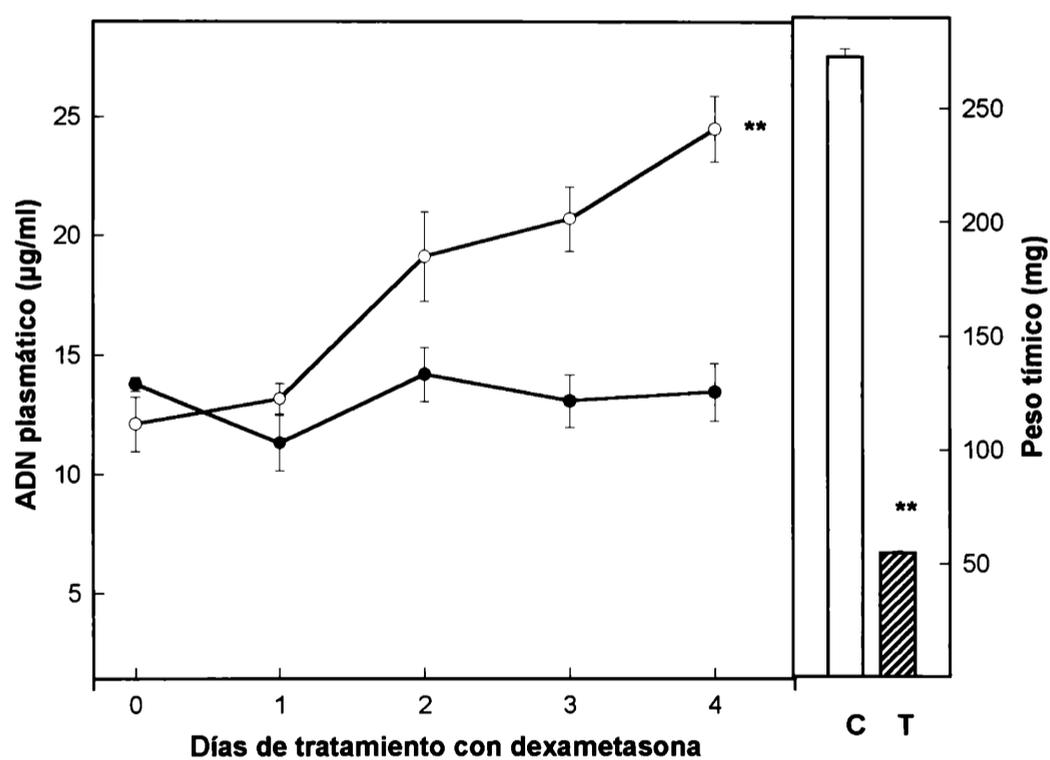


FIGURA 21: Tratamiento de ratas con dexametasona $10 \mu\text{g/ml}$ en el agua de bebida de los animales. Panel izquierdo: niveles de ADN plasmático de los animales control (●) o tratados (○). Panel derecho: peso de los tímicos de animales controles (barra vacía, C) o tratados (barra rayada, T) durante tres días. Los resultados se muestran como $\bar{x} \pm SEM$, $n = 5$. ** $p < 0,01$.

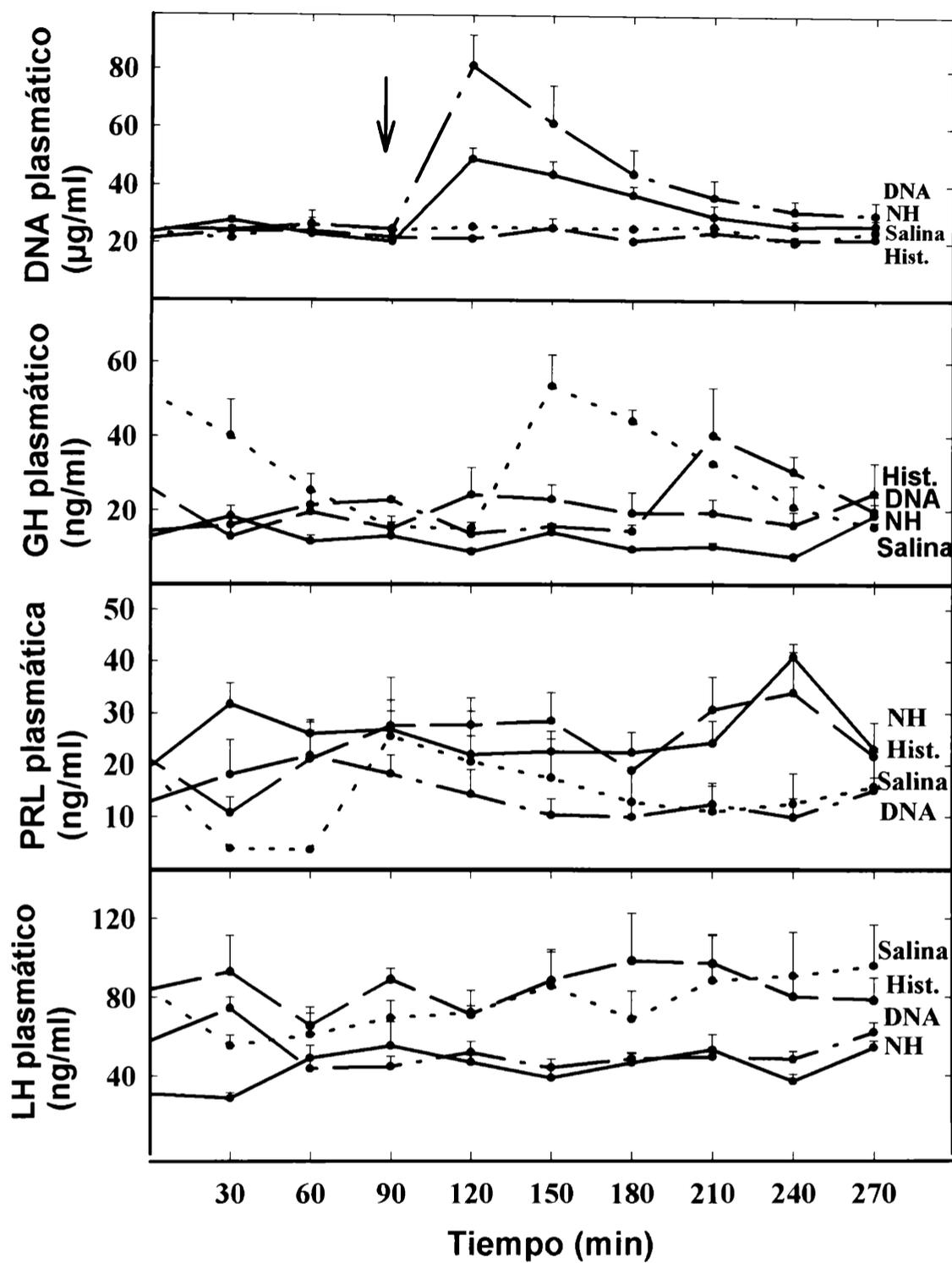


FIGURA R22: Perfil de liberación de GH, PRL y LH *in vivo*, cuando ratas hembras jóvenes canuladas intrayugularmente son inyectadas con DNA, histona H2A ó NH a una concentración de 2 mg en 0,4 ml de solución salina. También se muestra la variación de los niveles de DNA durante el transcurso del experimento. Se muestra el resultado de un único experimento en el cual se utilizaron 8 animales por estímulo y los datos se muestran como $\bar{x} + SEM$. La flecha indica el momento de la inyección (por la cánula) del estímulo correspondiente:, basal; -.-.-, DNA; ____, NH; ----, histona H2A.

DISCUSION

A) IMPACTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA FUNCIÓN HIPOFISARIA

Las alteraciones morfológicas y funcionales a nivel hipofisario registradas en el presente estudio confirman observaciones previamente documentadas por otros en la rata, particularmente en la cepa Sprague-Dawley aquí utilizada. En efecto, el aumento del peso adenohipofisario asociado a la edad y al sexo así como la progresiva hiperprolactinemia que se da con la edad y la subsecuente aparición de micro y macroprolactinomas, particularmente en la hembra, han sido previamente documentados en distintas cepas de rata, incluyendo la cepa Sprague Dawley (Davis *et al* 1956, Kim *et al* 1960, Boorman and Hollander 1973, Takahashi and Kawashima 1983, Goya *et al* 1990c, Cónsole *et al* 1997). En la hembra, la incidencia de esta patología comienza a aumentar poco después del primer año de vida, edad a la cual la mayoría de las hembras comienzan a manifestar ciclos estrales irregulares (Huang and Meites 1975, Le Fevre and Mc Clintock 1988) frecuentemente caracterizados por prolongados períodos de cornificación vaginal, fenómeno típicamente vinculado con una sostenida secreción estrogénica y bajos niveles de progestágenos circulantes (Huang *et al* 1978, Lu *et al* 1980). Se piensa que tanto en la rata como en el ratón, la exposición crónica a niveles moderadamente elevados de estrógenos circulantes, no contrabalanceados por la acción antiproliferativa de la progesterona, conducen inicialmente a un progresivo aumento de la secreción de PRL y más tardíamente al desarrollo de adenomas hipofisarios PRL-secretantes (Lu *et al* 1979, Nelson *et al* 1980, Nelson *et al* 1981), alteración que conduce a su vez a la aparición de tumores mamarios prolactino-dependientes (Meites 1981). Aunque la incidencia de estas patologías es en general significativamente menor en el macho, se han documentado niveles comparables de incidencia tumoral hipofisaria en machos y hembras de algunas cepas de rata (Berkvens *et al* 1980, McComb *et al* 1984). Debe señalarse, no obstante, que aún para una misma cepa, los datos de incidencia tumoral pueden variar considerablemente de un estudio a otro.

La marcada diferencia asociada al sexo en la incidencia de tumores mamarios que se registró en el presente trabajo, concuerda con estudios previos en ésta y otras cepas (Davis *et al* 1956, Feldman and Woda 1980, Goodman *et al* 1980). Los datos acumulativos sobre incidencia tumoral mamaria aquí presentados muestran un buen acuerdo con aquellos informados por Durbin *et al* (Durbin *et al* 1966) en hembras Sprague Dawley. El autor no conoce publicaciones que documenten la

incidencia acumulativa de tumores mamarios en ratas machos. Debe señalarse que en la rata hembra Sprague Dawley, la patología tumoral mamaria es un factor limitante de su longevidad. Si se extirpan sistemáticamente los tumores mamarios cuando se tornan palpables, los animales extienden marcadamente su longevidad promedio (Goya *et al* 1990c). La misma intervención carece de impacto sobre la longevidad media de los machos. En el grupo de animales H-2 se observó que, a partir de los dos meses subsecuentemente a la palpación de los primeros tumores mamarios, los animales intactos comenzaron a morir, probablemente a causa de los efectos caquéxicos producidos por la acción del crecimiento tumoral. Sin embargo, en el grupo H-1, el cual fue sujeto a la extirpación de tumores ni bien éstos se hacían palpables, la sobrevida aumentó considerablemente demostrando que al menos uno de los factores limitantes de la sobrevida máxima en la rata hembra Sprague Dawley es el desarrollo de los tumores mamarios. Cuando la población de ratas machos se somete a la misma maniobra quirúrgica (población M-2) el efecto sobre la sobrevida de los mismos es pequeño en relación a la población de machos no tratados (M-1). Además, en general la sobrevida de la rata macho no es tan larga como la de la hembra. Esto podría ser consecuencia de la gran susceptibilidad de la rata macho de la cepa Sprague-Dawley a desarrollar severas nefropatías durante el envejecimiento (Bolton *et al* 1976), aunque hay ciertas subcepas Sprague-Dawley donde esto no se observa (RG Goya, observaciones personales inéditas). A pesar de que el impacto de la patología mamaria sobre la longevidad no se exploró en este trabajo se usaron ratas hembras a las que sistemáticamente se les extirpó los tumores mamarios ni bien se los palpaba, a fin de poder observar la respuesta adenohipofisaria en el límite de vida de estos roedores.

A pesar de que el tamaño hipofisario aumenta con la edad, la funcionalidad de esta glándula parece disminuir durante el envejecimiento. La disminución en los niveles plasmáticos de GH podría deberse a la disminución del número, y en menor medida el tamaño de las células somatotrofas durante el envejecimiento (fig. I12 B y E) (Cónsole *et al* 1993, Mooradian 1993a). Existen también evidencias que muestran que la frecuencia y nadir de los pulsos no cambian durante el envejecimiento, aunque existe una reducción significativa de la amplitud de los pulsos y secreción diurna de GH con la edad asociados al descenso en los sitios de alta afinidad y aumento de los de baja afinidad para GHRH que conducen a una menor producción de AMPc (Goya *et al* 1990, Mooradian 1993a, Mooradian 1993b). Cualquiera de estos fenómenos asociados a la edad, por separado o en combinación podrían explicar los resultados aquí presentados.

En el presente trabajo se observa que existe una disminución en los niveles plasmáticos de TSH que conducen a un descenso secundario de T_4 , aunque los niveles de T_3 permanecen inalterados durante el envejecimiento. La reducción de los niveles plasmáticos de TSH parece estar asociada al descenso en el número y tama-

ño de las tiotropas durante el envejecimiento (fig. I12 C y F) (Cónsole *et al* 1995) y a la disminución en la amplitud de los pulsos de TSH que suele ser menor al 50 % del hallado en las ratas jóvenes (Mooradian 1993b). Lo antedicho sería la causa de la reducción observada en los niveles de T_4 pero no de T_3 , lo que está de acuerdo con los hallazgos que muestran una adaptación de las células tiroideas a los bajos niveles de T_4 total circulante con una liberación preferencial de T_3 (Pekary *et al* 1983).

En este trabajo se encontró una leve disminución en los niveles plasmáticos de LH y un aumento en los de FSH, concomitantemente a una reducción en el número y tamaño de las gonadotrofas (fig. I13 B, C, E,F) (Cónsole *et al* 1993, Mooradian 1993a). El hecho de que los niveles de LH no disminuyan grandemente podría explicarse en parte postulando la existencia de una redundancia en la población gonadotrofa en la rata joven lo que permitiría el mantenimiento o incluso aumento de los niveles basales de estas hormonas pese a la disminución del número de las células correspondientes (Lu 1983, Mooradian 1993a). Sin embargo, el ligero descenso de LH y el aumento en la FSH podría también ser una consecuencia del descenso en el ARNm para la cadena β de LH, de la alteración en la amplitud y frecuencia de la GnRH y/o del aumento en los niveles de PRL que darían origen en la rata hembra a la pérdida de ciclicidad y comienzo del anestro (Lu 1983, Mooradian 1993 a, Wise 1994).

El alto nivel de PRL circulante encontrado se puede explicar debido al incremento en el número de micro y macroprolactinomas mencionado anteriormente en esta sección (fig I13 A y D), que se asocian a una deficiente liberación de DA hipotalámica luego de la estimulación colinérgica y al mantenimiento de la secreción estrogénica inalterada (Goya *et al* 1990c, Mooradian 1993b).

La respuesta hormonal de GH, PRL, LH, FSH y TSH a EM de las células adenohipofisarias perifundidas con distintas diluciones de EM sigue un patrón dosis-dependiente similar al obtenido cuando otros autores lo utilizaron en un sistema de perfusión de células adenohipofisarias de pato para estudiar el efecto sobre la liberación de ACTH y α -MSH (Castro *et al* 1984). El extracto EM es un potente secretagogo para las hormonas hipofisarias que quizás actúe estimulando varias vías. Su acción es muy reproducible a nivel inter e intraensayo. El KCl, que actúa a través de un mecanismo dependiente del calcio (Castro *et al* 1984), en el sistema experimental utilizado en la presente tesis resultó menos potente como secretagogo. Se trabajó con EM 1/30 ya que a esta dilución los picos secretorios de las hormonas adenohipofisarias determinadas fueron submáximos pero evidentes. A esta dilución de EM, responden tanto las células adenohipofisarias de ratas jóvenes, como las de adultas y senescentes. En este estudio, la secreción basal y estimulada por EM 1/30 fue mas baja en las células provenientes de ratas senescentes que en las de jóvenes y adultas.

Teniendo en cuenta que las hipofisis de las hembras senescentes mostraron altos niveles de hiperplasia prolactotropa e incluso presencia de microprolactinomas, y que los niveles basales de liberación de PRL fueron menores en las columnas de células senescentes que en aquellas de células jóvenes, se puede concluir que las células prolactotropas de los animales seniles liberan en promedio, menos PRL que las células jóvenes normales. Esta conclusión no se puede aplicar a las células foliculotropas, ya que si bien la secreción basal *in vitro* disminuye con la edad, también disminuye el número de células foliculotropas en las hipófisis seniles. Volviendo al caso de las prolactotropas seniles, existe una explicación alternativa para justificar la aparente disminución de la capacidad secretoria basal de PRL en estas células. Podría ser que las células prolactotropas seniles normales y/ o tumorales secreten variantes moleculares de PRL que sean mas débilmente reconocidas por el anticuerpo utilizado en el RIA correspondiente y que además difieran en bioactividad (Asawaroengchai *et al* 1978, Bollengier *et al* 1989, Bollengier *et al* 1993). Debe señalarse que la existencia de heterogeneidad de tamaño en la PRL sérica e hipofisaria esta bien documentada (Mitra 1980, Sinha and Gillian 1981, Lewis *et al* 1984, Oetting and Walker 1986, Oetting *et al* 1986, Sinha and Jacobsen 1988, Ho *et al* 1989, Kelly *et al* 1992, Stroud *et al* 1992). Las formas moleculares de mayor tamaño representan PRL recientemente sintetizada (Takahashi *et al* 1990), mientras que las formas mas pequeñas representan moléculas sintetizadas hace mas tiempo, las que han sufrido modificaciones post-traduccionales tales como clivaje proteolítico (Larson and Wise 1991, Ouhtit *et al* 1993), deaminación (van Putten *et al* 1988), glicosilación (Rossi *et al* 1991) o fosforilación (Ho *et al* 1993). Se ha demostrado que estas formas variantes de PRL poseen una inmunoreactividad disminuída (Cocchi *et al* 1986).

B) COMPORTAMIENTO DE LAS CELULAS ADENOHIPOFISARIAS FRENTE A LA TIMULINA: CAMBIOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Los experimentos mostrados aquí documentan, por primera vez, que la timulina puede estimular en forma dosis-dependiente la liberación de GH, PRL, LH y TSH por las células adenohipofisarias perifundidas con diferentes dosis de la hormona. Además, para el caso de LH los hallazgos previos del grupo de Kendall (Zaidi *et al* 1989), son coherentes con los presentados ya que demuestran que cuando se perifunden células de rata con concentraciones de timulina de 10^{-5} a 10^{-7} M inducen la secreción de LH, siguiendo un patrón dosis dependiente viéndose la máxima respuesta a una concentración de timulina de 10^{-5} M. En el presente estudio también se demuestra que tanto los sobrenadantes de TEC de rata, como los de ratón pueden actuar como secretagogos para las cuatro hormonas hipofisarias mencionadas. En el modelo de perifusión celular, la velocidad de aclaramiento de los estímulos y productos de secreción celular es igual a la velocidad de flujo del sistema y lo cual impide la acumulación de productos celulares, quedando así eliminadas las influencias autócrinas y parácrinas que sí se hallan presentes en sistemas tales como la incubación y el cultivo celular. Entonces, es poco probable que la actividad hipofisotrófica de timulina y de los sobrenadantes de TEC de rata y de ratón sean consecuencia de la influencia paracrina de un tipo celular sobre otro. Esto es cierto si la velocidad de perifusión es de 0,5 a 5 ml/min, como la usada en este sistema experimental; si el flujo de perifusión fuese de 1 a 5 ml/h ya sería evidente la presencia de las acciones autócrinas y parácrinas (Stachura *et al* 1990), que dependen de la duración del pulso, la dosis y la frecuencia. Si el espacio interpulso es menor de 10 min, un pulso influencia al posterior, lo que no se hizo en la serie de experimento presentados aquí. Si las concentraciones son bajas, la aplicación de los pulsos a la misma concentración producen respuestas reproducibles. Al aumentar la concentración del estímulo la respuesta es reproducible por la misma concentración de estímulo y además con el aumento de la concentración se obtiene una curva del tipo dosis-respuesta. Si la concentración del estímulo es alta llega un punto en que se alcanza una respuesta máxima y la repetición del pulso disminuye la liberación hormonal, es decir ocurrió una desensibilización, esto también ocurre con perifusión continua de altas dosis del secretagogo (Liu and Jackson 1984). Es decir, la desventaja del sistema de perifusión es que como las células poseen "memoria", si los estímulos se aplican poco espaciados temporalmente, la respuesta a un estímulo dado estaría influenciada según las condiciones utilizadas por el "recuerdo" que dejó el estímulo previo (Weiss and Jameson 1993, Hu and Lawson 1996), pero esto es poco probable por las concentraciones, duración y dis-

tancia interpulso utilizadas aquí. Además, la alteración del orden en que se introdujeron los estímulos no modificó las respuestas secretorias. También se hicieron experimentos en los cuales luego de pasar por segunda vez EM 1/30 se cambió el orden de los pulsos y las respuestas secretorias, incluso a EM, permanecieron inalteradas. Sin embargo cuando se hicieron tres secuencias similares de perfusión con las mismas células la respuesta disminuyó notablemente (datos no mostrados). Este fenómeno de decaimiento en la tercer tanda de estimulación podría deberse a una pérdida de la respuesta de las células o a una pérdida de viabilidad celular, lo que no se pudo comprobar ya que el Biogel P-2 interfirió con el conteo de viabilidad celular por el método del azul tripán.

Los extractos de EM usados en este estudio muestran que las células no perdieron su funcionalidad al final de los experimentos. La máxima dilución de EM utilizada fue 1/10 considerándola como 100 % estimuladora, no se ensayó una menor dilución porque como el preparado de EM contiene HCl, en su neutralización con NaHCO_3 se produce NaCl. el cual puede incrementar la secreción basal (pero no de la estimulada) de las hormonas debido al incremento en el flujo de Ca^{+2} extracelular (Halilimanabat *et al* 1995). Se eligió por tanto aquella dilución de EM menor posible pero que fuera capaz de estimular francamente la secreción de todas las hormonas hipofisarias aquí estudiadas.

La observación de que el FTS o el Zn^{+2} por separado son, al contrario de la timulina, inactivos como secretagogos hipofisarios está de acuerdo con la observación de que este nonapéptido requiere Zn^{+2} como cofactor para ejercer su efecto sobre los linfocitos (Dardenne *et al* 1982). Estos hallazgos contrastan con los de otro autor que señala que el ion Zn^{+2} inhibe en forma aguda, sostenida y rápidamente reversible la liberación de PRL sin influenciar la secreción del resto de las hormonas. Debe señalarse que estos autores utilizaron una concentración 5 veces mayor que la usada aquí, pulsos de 15 min a un flujo de 2 ml/h (Judd *et al* 1984) lo que origina un mayor contacto de este ion en su modelo que en el mostrado aquí. Otros autores también muestran que el Zn^{+2} inhibe específicamente la liberación de PRL por las células prolactotropas ya que estabiliza los grupos sulfhidrilos evitando la oligomerización de las cadenas de PRL y manteniendo los gránulos secretorios osmóticamente inertes (Brandao-Neto *et al* 1995, Lorenson *et al* 1996).

La hipófisis de rata puede sintetizar diversos factores que actúan en forma autócrina o parácrina, como por ejemplo el TRH, GHRH, GnRH, somatostatina, VIP, galanina, sustancia P, polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP), activina, inhibina, proteína S-100, NO o folistatina (Donato 1991, Weiss and Jameson 1993, Arita *et al* 1994, Tasaka *et al* 1994, Brunetti *et al* 1995, Diaz *et al* 1995, Chew *et al* 1996, Croissandeau *et al* 1996, Vertongen *et al* 1996). En incubados celulares estos factores posiblemente llegan a acumularse en el medio de incubación en niveles suficientes como para afectar autócrina o parácrinamente la

liberación de las hormonas hipofisarias. Esto podría explicar las posibles diferencias entre los resultados obtenidos con células perifundidas e incubados celulares. Existen además una serie de factores que dependen de la historia previa del animal y que podrían afectar los resultados obtenidos con ambos modelos experimentales. Por ejemplo, si los animales tuvieron altos niveles de estradiol 48 h antes de la perfusión con GnRH se observan altas respuestas en la secreción de LH; ésta liberación aumenta si reciben una corta exposición a progesterona, pero si la exposición a progesterona mas estradiol se prolonga por 48 h antes de la perfusión con GnRH se obtienen picos de muy baja amplitud (Ortamann *et al* 1995) y como en esta serie de experimentos las ratas fueron elegidas al azar esto podría contribuir a la variabilidad del sistema. Por otro lado, ni en los experimentos de perfusión ni en los de incubación se agregó DA. Esta catecolamina inhibe tónicamente la liberación de PRL porque inactiva los canales de Ca^{+2} . Entonces, si se la elimina del medio produce una hiperpolarización que aumenta los niveles basales de PRL como así también los estimulados con TRH u otras sustancias como el forskolin; este último se produce porque la masiva entrada de Ca^{+2} invierte la actividad inhibitoria producida por la proteína G_i al acoplarse al receptor D_2 , de la secreción de PRL producida por el AMPc cuando la DA esta presente en el medio (Gregerson 1994a, Gregerson 1994b). Es de suponer que la liberación de PRL en los estudios aquí realizados es la máxima debido a la carencia de DA en el medio.

Los experimentos de perfusión también muestran que los sobrenadantes derivados de cultivos de TEC de rata y de ratón son efectivos secretagogos de GH, PRL, LH y TSH y que ambos generan una respuesta muy similar. El hecho de que la actividad de los sobrenadantes sea completamente abolida por preincubación con anticuerpos anti-timulina, indica en forma virtualmente inequívoca que la timulina es la hormona responsable de la actividad hipofisotropa de ambos sobrenadantes de TEC. Esto está en línea con el hecho de que FTS es una molécula con identidad propia (ver introducción) que parece estar muy altamente conservada en la escala zoológica, ya que es idéntica en rata, ratón, humano, porcino y otros mamíferos. Esto la diferencia de otros péptidos tímicos que pueden diferir en especies distintas (Bach 1983).

La falta de respuesta de la FSH en el sistema de perfusión podría deberse a que la timulina no ejerce efecto alguno sobre la liberación de esta hormona o a que el RIA para FSH no es suficientemente sensible como para detectar eventuales cambios inducidos por la timulina.

Los experimentos de cinética de liberación de GH, PRL, LH, FSH y TSH inducida por la timulina muestran respuestas tiempo- y dosis-dependientes. Estas respuestas dosis-dependientes exhiben curvas de tipo acampanada con un máximo a una concentración de timulina de 10^{-7} M. Muchos péptidos de origen inmune tales como las interleuquinas inducen patrones acampanados de liberación de

hormonas hipofisarias en función de la dosis de citoquina aplicadas (Mc Cann *et al* 1994). Se sabe que la concentración de timulina 10^{-7} M corresponde al rango fisiológico y que además, es la que ejerce el máximo efecto en el bioensayo para timulina utilizando linfocitos T (Homo-Delarche *et al* 1990). El hecho de que en los experimentos de perfusión celular, en los cuales se usaron pulsos cortos de timulina, se produjeran patrones de liberación de GH, PRL, LH y FSH que aumentan continuamente (y no en forma acampanada) con las concentraciones de timulina usadas, puede deberse al continuo lavado de las células, con la subsecuente disminución del tiempo de contacto con la timulina. De este modo, la cantidad de nonapéptido que “ven” las células sería menor al que verían frente a idénticas dosis de timulina en los incubados celulares. Esto justificaría el hecho de que las células adenohipofisarias muestren un desplazamiento del pico secretorio hacia concentraciones mas elevadas. Ya se han discutido los efectos autócrinos y parácrinos como otra posible causa de las diferencias de respuesta secretorias entre incubados y perfusatos celulares.

Como se vio, cuando la timulina se neutraliza con un anticuerpo específico generado en conejo, se suprime totalmente su actividad hipofisiotropa, mientras que el suero normal de conejo no ejerce efecto alguno sobre la liberación de las hormonas hipofisarias estudiadas. Esto indica que no hay ningún factor en el suero normal de conejo responsable del bloqueo de la secreción inducida por la timulina y que este efecto es propio del anticuerpo anti-timulina.

Considerando la falta de actividad del FTS sin Zn^{+2} y la respuesta de tipo dosis-dependiente que induce la FTS-Zn, se puede sugerir que las acciones de la timulina a nivel hipofisario podrían estar mediadas por receptores específicos. Esto está de acuerdo con el hallazgo de la presencia de receptores para timulina en las líneas tumorales derivadas de linfocitos T como la 1301, CEM, HSB2 y JM (Pléau *et al* 1980, Gastinel *et al* 1982). Sin embargo, como no se han podido encontrar receptores específicos en células no tumorales (JM Pléau y M Dardenne, comunicación personal), resulta difícil discriminar si la acción de la timulina a nivel hipofisario se ejerce a través de receptores propios o sobre otros receptores que modulan la respuesta hormonal.

La liberación de GH inducida por GHRH está mediada por un incremento en los niveles de AMPc y calcio intracelular (Frohman and Jason 1986, Cuttler *et al* 1992). Por otra parte, la liberación de GH por acción de GHRP-6 está mediada por un incremento en los niveles de calcio intracelular y por la activación de las vías del IP_3 y DAG (Chen *et al* 1996). Además, la coincubación de células hipofisarias con GHRH y GHRP-6, que posiblemente no compartan etapas en común, produce un efecto sinérgico sobre la liberación de GH (Chen *et al* 1996). Esto podría implicar que algunos de los efectos de la timulina sobre las células somatotropas no comparten las etapas involucradas en la liberación de GH por parte de

GHRP-6 y que podrían estar mediados fundamentalmente por la producción de AMPc o alguna etapa distal a este debido a su efecto aditivo con GHRH. Esta afirmación podría resultar meramente especulativa, pero otros autores que encuentran un efecto sinérgico sobre la liberación de GH estimulada por GHRH y galanina, concluyen de que ambos péptidos no comparten vías comunes en el mecanismo de secreción de GH (Lindström and Sävendahl 1993). La insulina y el AMPc estimulan de modo sinérgico la liberación de PRL, indicando que la insulina actúa por una vía diferente a la del AMPc sobre las prolactotropas (Jacob and Stanley 1995). La sustancia P actúa de manera aditiva sobre la secreción de PRL estimulada por TRH indicando que ambos péptidos comparten vías comunes en la liberación de PRL (Henriksen *et al* 1995).

El TRH estimula la liberación de PRL y TSH por un mecanismo trifásico: primero ocurre una despolarización de unos 30 s independiente de la liberación de Ca^{+2} , segundo ocurre una respuesta de hasta 3 min que inicia la liberación de LH o TSH inducida por una repolarización mediada por la inhibición de los canales de Ca^{+2} voltaje dependiente y tercero una despolarización por salida de calcio que activa la exocitosis de las hormonas y las vías del IP_3 y calcio-DAG que la mantienen. En el caso de las tirotrpas, el TRH también podría actuar, aunque en menor medida por la vía del AMPc. Entonces, un mismo neuromodulador puede emplear varios mecanismos temporalmente diferentes para estimular la secreción peptídica (Hemmings *et al* 1989, Rondeel and Jackson 1993, Fomina and Levitan 1995). En los casos en que las células prolactotropas se coincuban con TRH y sustancias capaces de elevar el AMPc intracelular como lo son el PACAP, forskolin, IBMX o la toxina colérica, se observó un efecto sinérgico para la liberación de PRL, pero en la coincubación con VIP que actúa vía IP_3 y en menor medida vía AMPc, se observó una respuesta aditiva (Chen *et al* 1993, Tena-Sempere *et al* 1996, Vertongen *et al* 1996, Mau *et al* 1997). En el caso de las tirotrpas, el forskolin y los análogos del AMPc estimulan la expresión del ARNm de β -TSH (Steinfelder *et al* 1992), mientras que el péptido 1 glucagón similar (GLP-1) produce la liberación de TSH por activación de la adenilato ciclasa (Small *et al* 1996). Es de destacar que el autor no encontró ningún trabajo relacionado con la interacción entre TRH y activadores de la vía del AMPc. De esto se podría inferir que la timulina actúa sobre las células prolactotropas via AMPc pero no se podría concluir nada al respecto sobre la acción de esta hormona sobre las tirotrpas.

La coincubación de células hipofisarias de ratas jóvenes, adultas y senescentes con timulina y GnRH conduce a un efecto sinérgico para la liberación de LH y aditivo para la liberación de FSH. En la secreción de LH mediada por GnRH intervienen IP_3 , calcio extracelular, calcio/calmodulina y la PKC, mientras que su síntesis está regulada por la PKC (Rondeel and Jackson 1993, Kile and Nett 1994, Sim *et al* 1995). Por otro lado, GnRH estimula la liberación de FSH vía PKC, cal-

cio extracelular, calcio/calmodulina y AMPc (Kile and Nett 1994, Sim *et al* 1995). Tanto GnRH como forskolin estimulan la síntesis de cadenas de β -LH y la síntesis de ambas cadenas de FSH con posterior secreción de FSH (Ishizaka *et al* 1993). El PACAP, que activa la adenilato ciclasa, es capaz de ejercer un efecto sinérgico con GnRH sobre la liberación de LH (Leonhardt *et al* 1995). Esto permitiría pensar que la secreción de LH inducida por acción de la timulina podría ocurrir vía AMPc, pero el efecto sobre la secreción de FSH es todavía incierto.

Los resultados obtenidos al tratar las células hipofisarias de ratas jóvenes con EGTA o con EGTA + el ionóforo A23187 indican que la actividad hipofisotropa de la timulina depende de la presencia de niveles adecuados de calcio extracelular.

El hallazgo de que la TFP, la cual inhibe la PKC, no ejerce efecto inhibitorio alguno sobre la secreción estimulada por la timulina de las hormonas adenohipofisarias estudiadas sugiere que el DAG no estaría involucrado en la acción secretagoga de la timulina. Mientras que el LiCl, que inhibe varias enzimas involucradas en la degradación del IP₃, potencia la respuesta a la timulina lo que permitiría pensar que la vía del IP₃ estaría mediando la acción secretagoga de la timulina.

Dado que la inhibición de la fosfodiesterasa con cafeína o la activación de la proteína G, con NaF o de la adenilato ciclasa con forskolin, producen la facilitación de la liberación de GH, PRL, LH, FSH y TSH, parece razonable pensar que el AMPc puede estar involucrado en las acciones hipofisotropas de la timulina. Esto está de acuerdo con la evidencia indirecta de que la timulina podría tener como segundo mensajero al AMPc ya que el aumento de AMPc mimetiza el efecto de esta hormona en linfocitos T (Bach and Bach 1973). Como era de esperar (en base a lo mencionado en párrafos anteriores) el forskolin estimuló la secreción basal de las hormonas adenohipofisarias estudiadas, mientras que su control negativo, el 1,9-dideoxiforskolin resultó inactivo.

Las células de ratas senescentes mostraron respuestas cualitativamente idénticas pero cuantitativamente menores a las de su contraparte joven en los experimentos de perfusión celular, cinética de liberación hormonal y coincubación con factores hipofisotropos. Esto se debería a las razones ya expuestas en la parte A) de la discusión (disminución en el número de cierto tipo de células endocrinas y/o desensibilización a la timulina).

C) COMPORTAMIENTO DE LAS CELULAS ADENOHIPOFISARIAS FRENTE A LAS HISTONAS Y NUCLEOHISTONAS: CAMBIOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO. DNA CIRCULANTE Y MUERTE CELULAR SISTEMICA

Los experimentos mostrados aquí, demuestran, por primera vez, que las histonas H2A, H2B y H3 y las NH pueden actuar directamente sobre las células adenohipofisarias estimulando la liberación de GH, PRL, LH y TSH. Este hallazgo está en línea con el hecho de que las histonas y nucleohistonas pueden inducir la liberación de ACTH en el sistema de perfusión células adenohipofisarias (Goya *et al* 1993). Como se indicó previamente, en la sección de esta discusión correspondiente a timulina, resulta poco probable que los efectos observados se deban a interacciones parácrinas entre las distintas poblaciones adenohipofisarias. El hecho de que los filtrados de histona H2A y de NH resulten inactivos como secretagogos de las cuatro hormonas adenohipofisarias arriba mencionadas permite descartar la presencia de contaminantes activos de peso molecular menor que 12 Kd en nuestras preparaciones comerciales de histonas, pero no permiten concluir nada acerca de posibles contaminantes de mayor peso molecular. Los extractos de EM media utilizados en este estudio demuestran, como se indicó en la sección anterior, que las células adenohipofisarias no perdieron su funcionalidad durante el transcurso de los experimentos. El péptido MB-35 resultó inactivo como secretagogo tanto a la concentración mostrada de 6 μ M, como a concentraciones de 1 y 30 μ M (no mostrada con el objeto de simplificar los gráficos), mientras que la timosina fracción 5 resultó inactiva como secretagogo aunque sólo se ensayó una concentración. El hecho de que las histonas y nucleohistonas resulten ineficaces como secretagogos de FSH, sumados al mismo hecho ya señalado para la timulina, estaría confirmando la baja sensibilidad del RIA para FSH utilizado en estos experimentos ya que dos tipos de sustancias no emparentadas conducen al mismo resultado negativo.

Los experimentos de cinética de liberación de las cinco hormonas adenohipofisarias estudiadas muestran respuestas tiempo- y dosis-dependientes (aunque solo se usaron dos concentraciones para la histona H2A y tres para H2B y H3). El bloqueo completo de la actividad hipofisotropa de la histona H3, a las tres concentraciones ensayadas, por el anticuerpo monoclonal TNT2 da un indicio de que las actividades secretagogas observadas residen en la histona y no en las posibles impurezas acompañantes (al menos de la histona H3). La misma dilución de este an-

ticuerpo no causó efecto alguno sobre la liberación de GH, PRL, LH, FSH y TSH indicando que este no es un efecto inhibitorio del anticuerpo *per se*. No obstante, no se puede descartar que la actividad de H3 se deba a una contaminación por la histona H1 ya que el anticuerpo TNT2 reacciona contra un epítopo común a las histonas H1 y H3 (Miller *et al* 1993).

El presente trabajo demuestra que el polication poly-Lys, el cual posee un peso molecular promedio similar al de las histonas H2A y H2B, no posee actividad hipofisotropa a concentraciones a las cuales las histonas ensayadas son activas. También se demuestra que este polication no modifica la secreción de las hormonas hipofisarias estimuladas con GHRH, GHRP-6, TRH y GnRH. Esto sugiere que la acción hipofisotropa de las histonas no se debe a un efecto inespecífico originado en la alta carga electrostática de estas moléculas. Esto está de acuerdo con observaciones previas de que las concentraciones efectivas a las que las histonas ejercen sus efectos de tipo hormonal están en el rango de 1 a 20 μM , mientras que los péptidos básicos espermina y espermidina para mimetizar algunos de los efectos de las histonas requieren concentraciones de 100 a 1.000 veces mayores que las usadas para las histonas (Aten and Behrman 1989a). Para mimetizar ciertos efectos de tipo hormonal de las histonas se requieren niveles 50 a 100 veces mayores de poly-Lys y poly-Arg (Louters *et al* 1993), requiriéndose concentraciones de 100 a 200 veces a la de las histonas para el caso de la protamina, la espermina, la spermidina, la cadaverina y la putrescina (Mellgren and Schlender 1983). La poli-ornitina, poly-Arg o poly-Lys son incapaces de ejercer efectos histona-simil aún en altas concentraciones (Mc Croskey *et al* 1989).

Los estudios de cinética de liberación muestran que el péptido MB-35 es inactivo como secretagogo de las hormonas hipofisarias a cortos tiempos de incubación, mientras que el efecto es moderado (no tan grande como el de las histonas a cortos tiempos) cuando este péptido se incubaba con las células hipofisarias durante tiempos mayores. Esto está en línea con el hallazgo de que el péptido MB-35 induce la liberación de GH y PRL cuando se incuban cultivos de células hipofisarias durante cuatro horas con el mismo (Badamchian *et al* 1990). El hecho de que este péptido, además, sea capaz de bloquear muy efectivamente la liberación de las hormonas adenohipofisarias estimuladas con la histona H2A y de que las histonas produzcan un patrón de liberación hormonal dosis- dependiente podría indicar que las histonas actúan a través de algún receptor específico presente en las células hipofisarias estudiadas.

Una vez más, no se podría descartar que algunos de los efectos secretagogos observados en el sistema de incubación celular se deban a efectos parácrinos.

Cuando se estudió la interacción de las histonas con los factores hipofisotróficos se encontró que la coincubación con las histonas con GHRH produce un efecto sinérgico, mientras que con GHRP-6, TRH o GnRH se obtienen respuestas

del tipo aditivo. Sin entrar en los detalles ya discutidos en la sección correspondiente a la timulina, los resultados obtenidos conducen a pensar que las histonas comparten algunas de las etapas principales de la acción secretagoga de GHRP-6, TRH y GnRH. El único trabajo que está en línea con los efectos descritos aquí se relaciona con el péptido MB-35, el cual, coincubado con GHRH, produce una respuesta de tipo sinérgico para la liberación de GH, mientras que con TRH genera una respuesta aditiva para la liberación de PRL. Los autores especulan que este péptido actúa vía IP_3 -DAG como segundos mensajeros, pero no vía AMPc (Badamchian *et al* 1991).

Los resultados obtenidos al tratar las células hipofisarias de ratas jóvenes con EGTA o con EGTA + ionóforo A23187 indican que la actividad hipofisotropa de las histonas dependen de la presencia de niveles adecuados de calcio extracelular. Lo que es enigmático es la acción del ionóforo A23187, el cual no modifica la respuesta secretoria de las células adenohipofisarias a la timulina o las histonas. Como el nivel de calcio presente en el medio de incubación es unas 10 veces mayor que el del calcio intracelular, se esperaría que el ionóforo estimule tanto los niveles basales como los estimulados.

Dado que la cafeína, el NaF y el forskolin carecen de efecto sobre la secreción de GH, PRL, LH, FSH y TSH estimulada por las histonas es posible concluir que la vía del AMPc no está involucrada en el efecto estimulador de estas proteínas.

El LiCl produce un leve efecto estimulador, lo que señala la posibilidad de que el IP_3 esté involucrado en la acción de las histonas. El marcado efecto inhibitorio que genera la TFP sobre la secreción estimulada por las histonas de las hormonas adenohipofisarias estudiadas podría solamente sugerir la intervención de la vía del DAG en el efecto estimulador de estas proteínas. La TFP no sólo inhibe la PKC sino también la PKA y la calmodulina, inhibiendo así las vías del DAG, AMPc y calcio. El efecto sobre la vía del AMPc se puede descartar debido a dos razones, la primera es que se requieren concentraciones mayores de TFP que las usadas en el presente trabajo para inhibir la PKA dependiente de AMPc y la segunda y más importante razón es que como ya se indicó, el AMPc no está involucrado en la actividad secretagoga de las histonas. Sin embargo, ya que el calcio está involucrado en el efecto secretorio de las histonas y el rango de concentración requerido para inhibir la calmodulina se solapa con aquel utilizado para inhibir la PKC, este factor no se puede excluir.

Al igual que en el caso de la timulina, las células de ratas senescentes mostraron respuestas cualitativamente idénticas pero cuantitativamente menores a las de su contraparte joven en los experimentos de perfusión celular, cinética de liberación hormonal y coincubación con factores hipofisotropos. Esto se debería a las razones ya expuestas en la parte A) de la discusión.

Aunque todavía no está claro si las histonas podrían tener un rol fisiológico cómo mensajeros extracelulares, existe evidencia que indica que los fragmentos de cromatina pueden unirse específicamente a la membrana plasmática de leucocitos y de otros tipos celulares (Jacob *et al* 1989, Hefeneider *et al* 1992). Además, se ha descrito que cuando se induce muerte celular programada en linfocitos T de timo y bazo, cultivándolos en presencia de glucocorticoides, los mono- y oligonucleosomas liberados por las células apoptóticas ejercen efectos mitogénicos sobre linfocitos B en reposo y producen una estimulación generalizada de la síntesis de inmunoglobulinas y de anticuerpos anti-ADN (Atkinson *et al* 1985, Bell *et al* 1990). Recientemente se ha demostrado que los nucleosomas e histonas pueden inhibir la actividad de las células NK *in vitro* y que en pacientes cancerosos con altos niveles de ADN circulante la actividad NK se halla deprimida (Le Lann *et al* 1994).

La liberación de ADN nucleosomal es una de las etapas claves del fenómeno de la apoptosis (Compton *et al* 1986). Resulta por tanto posible postular que durante procesos fisiológicos o patológicos que involucren muerte celular programada masiva, las nucleoproteínas liberadas por las células apoptóticas podrían actuar como “señales apoptóticas” frente a un importante sistema integrativo del organismo: la red inmuno-neuroendócrina. La fig. D1 esquematiza esta hipótesis.

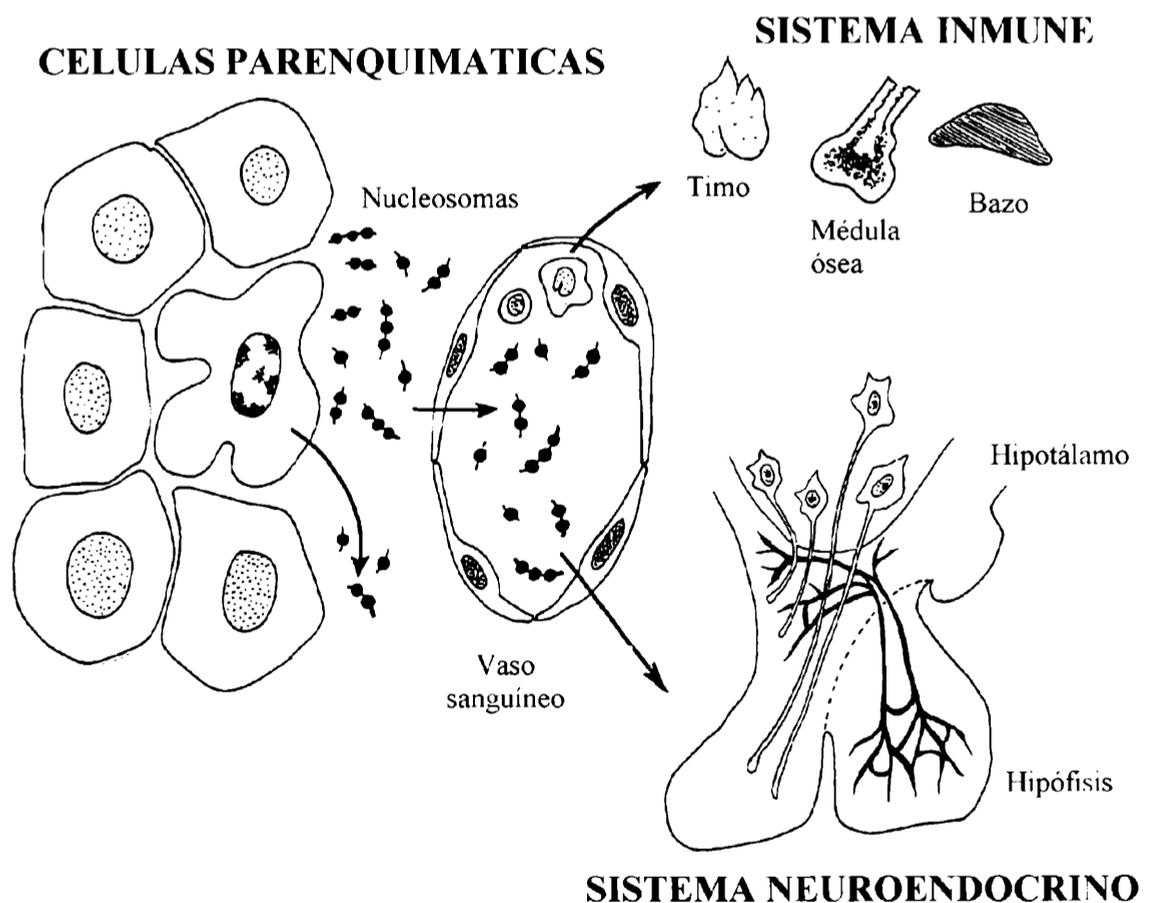


FIGURA D1: Modelo propuesto según el que los mono y oligonucleosomas liberados durante el proceso de apoptosis actuarían como mensajeros apoptóticos frente al sistema neuroendócrino e inmune.

Con el fin de hacer un primer acercamiento evaluativo a esta hipótesis se optó por determinar los niveles de DNA circulante como un indicador del nivel de nucleosomas circulantes ya que se sabe que en los fluidos biológicos el DNA no circula desnudo sino unido a histonas (DNA nucleosomal). El DNA desnudo es rápidamente degradado por DNAsas circulantes. Al comparar los niveles séricos y plasmáticos de DNA en las ratas jóvenes se encontró que éstos eran similares, hallazgo indicativo de que la coagulación sanguínea no modifica los niveles de DNA circulante. Por otra parte, el hallazgo de niveles séricos de DNA mas altos en las ratas senescentes que en las jóvenes, podría interpretarse como el reflejo de una mayor tasa de pérdida celular en los animales seniles. Esto coincide con observaciones similares efectuadas en seres humanos de diferentes edades (Fournié et al., 1993). En el presente trabajo se encontró que los niveles de DNA sérico en ratas senescentes portadoras de tumores mamarios son mayores que en aquellas de similar edad que están libres de esta patología (datos no mostrados).

Los estudios de administración de dexametasona a ratas jóvenes confirmaron que este glucocorticoide causa una marcada involución tímica. Se sabe que los glucocorticoides poseen un marcado efecto catabólico sobre los órganos linfoides, razón por la cual el progresivo aumento de DNA plasmático observado en los animales tratados con dexametasona se interpreta como un reflejo del vuelco masivo de DNA nucleosomal liberado por las células linfocitarias apoptóticas. Estos hallazgos estarían a favor del modelo propuesto. Sin embargo, al tratar de corroborar la idea de que las nucleoproteínas (nucleosomas), o sus componentes por separado podrían inducir respuestas neuroendócrinas al ser inyectadas en el torrente circulatorio de animales jóvenes, los resultados fueron negativos. En estos estudios sólo se evaluaron una única dosis de DNA, histona o nucleohistona, limitándose además a la evaluación de tres hormonas hipofisarias por lo que su valor es limitado. Considerando que estas mismas preparaciones nucleares resultaron activas sobre células adenohipofisarias *in vitro*, la cuestión de su actividad *in vivo* debe considerarse como aun no resuelta. También queda como una cuestión abierta la elucidación del rol biológico, si es que existe alguno, de las histonas y nucleohistonas presentes en fluidos extracelulares.

CONCLUSIONES

- 1) LAS CELULAS SOMATOTROPAS, PROLACTOTROPAS, GONADOTROPAS Y TIROTROPAS RESPONDEN EN FORMA ESPECIFICA Y DOSIS-DEPENDIENTE A LA TIMULINA. SE SUGIERE LA PRESENCIA DE RECEPTORES PARA ESTA HORMONA EN LA HIPOFISIS Y QUE LA ACCION DE LA MISMA SE EJERCERIA VIA AMP_c, IP₃ Y CALCIO.**

- 2) LAS CELULAS SOMATOTROPAS, PROLACTOTROPAS, GONADOTROPAS Y TIROTROPAS RESPONDEN EN FORMA ESPECIFICA Y DOSIS DEPENDIENTE A LAS HISTONAS H2A, H2B Y H3. SU ACCIÓN NO ES UN FENOMENO ASOCIADO A LA ALTA CARGA ELECTRICA DE ESTAS NUCLEOPROTEINAS, POSTULANDOSE QUE PODRIAN ACTUAR INTERACCIÓN CON ALGUN RECEPTOR ADENOHIPOFISARIO. SE SUGIERE QUE LA ACCIÓN DE LAS HISTONAS ESTARIA MEDIADA POR CALCIO, DAG Y POSIBLEMENTE IP₃. SE POSTULA QUE EL ROL BIOLOGICO DE ESTAS NUCLEOPROTEINAS CUANDO SON LIBERADAS A CIRCULACION, SERIA EL DE SEÑALES APOPTOTICAS ACTIVAS A NIVEL INMUNO-NEUROENDOCRINO.**

- 3) EXISTE MARCADO DESCENSO EN LA RESPUESTA DE LAS POBLACIONES CELULARES ADENOHIPOFISARIAS SENESCENTES A LOS ESTIMULOS SECRETAGOGOS AQUI EVALUADOS. PARA LAS CELULAS PROLACTOTROPAS EL DESCENSO OBEDECE A UNA REDUCCIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR, PARA LAS DEMAS POBLACIONES ESTUDIADAS OTRO FACTOR QUE PODRIA CONTRIBUIR A EL EFECTO OBSERVADO SERIA DESCENSO EN EL NUMERO DE CELULAS QUE OCURRE DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.**

- 4) SE CORROBORAN LAS DISCREPANCIAS OBSERVADAS**

POR OTROS AUTORES DE TIPO CUALI- Y CUANTITATIVO EN LA RESPUESTA DE LAS CELULAS ADENOHIPOFISARIA CUANDO LAS MISMAS SE ESTUDIAN MEDIANTE EL SISTEMA DE PERIFUSION CELULAR O EL DE INCUBADOS CELULARES. SI BIEN AMBOS SISTEMAS SON UTILES PARA EL ESTUDIO *IN VITRO* DE LA FUNCION HIPOFISARIA, EL SISTEMA DE PERIFUSION PROVEE UN MARCO EXPERIMENTAL EN EL CUAL ES POSIBLE ELIMINAR LAS INTERACCIONES AUTOCRINAS Y PARACRINAS. EL USO DE AMBOS SISTEMAS PERMITIRIA ARRIBAR A CONCLUSIONES MAS CONFIABLES.

REFERENCIAS

1. Abayasekara DRE, Band AM, Cooke BA: Evidence for the involvement of phospholipase A₂ in the regulation of luteinizing hormone-stimulated steroidogenesis in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 70: 147-156 1990.
2. Aguado LI, Giménez AR, Rodríguez EM: Plasma prolactin levels in female rats bearing pars distalis or total pituitary gland grafts under the kidney capsule. *J Endocrinol* 72: 399-400 1977.
3. Ahmed A, Wong DM, Thurman GB, Low TKL, Goldstein AL: T lymphocyte maturation cell surface markers and immune function induced by T lymphocyte cell free products and thymosin polipeptides. *Ann NY Acad Sci* 332: 81-94 1979.
4. Almqvist O, Thoren M, Saaf M, Eriksson O: Effects of growth hormone substitution on mental performance in adults with growth hormone deficiency: a pilot study. *Psychoneuroendocrinology* 11: 347-352 1986.
5. Amabric F, Bouche G, Bonnet H, Brethenou P, Roman AM, Truchet I, Quarto N: Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus: translocation process and targets. *Biochem Pharmacol* 47: 111-115 1994.
6. Amano O, Yoshitake Y, Nishikawa K, Iseki S: Immunocytochemical localisation of basic fibroblast growth factor in the rat pituitary rat. *Arch Histol Cytol* 56: 269-276 1993.
7. Andrews P and Folley SJ: Molecular weights of bovine, ovine and porcine pituitary growth hormones estimated by gel filtration on sephadex. *Biochem J* 87: 3-4 1963.
8. Andries M, Tilemans D, Denef C: Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat cell aggregates in culture. *Biochem J* 281: 393-400 1992.
9. Aoki H, Fujioka T, Matsuzaka J, Kubo T, Nakamura K, Yasuda N: Suppression by prolactin of the electrically induced erectile: Response through its direct effect on the corpus cavernosum penis in the dog. *J Urol* 154: 595-600 1995.
10. Aragona C and Friesen HG: Specific prolactin binding sites in the prostate and testis of rats. *Endocrinology* 97: 677-684 1975.
11. Arita J, Kojima Y, Yamamoto I, Mazawa S, Kimura F: Somatotrophs and thyrotropes in the rat anterior pituitary gland cosecrete substance P: Analysis by the sandwich cell immunoblot assay. *Neuroendocrinology* 60: 567-574 1994.
12. Asawaroengchai H, Russell SM, Nicoll CS: Electrophoretically separable forms of rat prolactin with different bioassay and radioimmunoassay activities. *Endocrinology* 102: 407-414 1978.

13. Ascoli M: Regulation of luteinizing hormone receptors and actions. In: Ascoli M (ed). *Luteinizing Hormone Actions and Receptors*. 199-214 CRC Press, Boca Raton 1985.
14. Astrom C, Pedersen SA, Lindholm J: The influence of growth hormone on sleep in adults with growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 33: 495-500 1990.
15. Aten RF and Behrman HR: A gonadotropin-releasing hormone-binding inhibitor from bovine ovaries. Purification and identification as histone H2A. *J Biol Chem* 264: 11065-11071 1989a.
16. Aten RF and Behrman HR: Antigonadotropic effects of the bovine ovarian gonadotropin-releasing hormone-binding inhibitor/histone H2A in rat luteal and granulosa cells. *J Biol Chem* 264: 11072-11075 1989b.
17. Aten RF, Ireland JJ, Weems CW, Behrman HR: Presence of gonadotropin-releasing hormone-like in bovine and ovine ovaries. *Endocrinology* 120: 1727-1733 1987b.
18. Aten RF, Polan ML, Bayless R, Behrman HR: A gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-like protein in human ovaries: similarity to the GnRH-like ovarian protein of the rat. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 1288-1293 1987a.
19. Aten RF, Williams AT, Behrman HR: Ovarian gonadotropin-releasing hormone-like protein(s): demonstration and characterisation. *Endocrinology* 118: 961-967 1986.
20. Atkinson MJ, Bell DA, Singhal SK: A naturally occurring polyclonal B cell activator of normal and autoantibody responses. *J Immunol* 135: 2524-2533 1985.
21. Atkinson MJ, Freeman MW, Kronenberg HM: Thymosin beta-4 is expressed in ROS 17/2.8 osteosarcoma cells in a regulated manner. *Mol Endocrinol* 4: 69-74 1990.
22. Auger C, Monier JC, Dardenne M, Pléau JM, Bach JF: Identification of FTS (facteur thymique sérique) on thymus ultrathin sections using monoclonal antibodies. *Immunol Lett* 5: 213-217 1982.
23. Bab I, Gazit D, Chorev M, Muhlrad A, Shteyer A, Greenberg Z, Namdar M, Kahn A: Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. *EMBO J* 11: 1867-1873 1992.
24. Bach JF and Dardenne M: Studies on thymus products. II. Demonstration and characterisation of a circulating thymic hormone. *Immunology* 25: 353-356 1973.
25. Bach JF, Bach MA, Blanot D: Thymic serum factor (FTS). *Bull Institut Pasteur* 76: 325-398 1978a.
26. Bach JF, Dardenne M, Davies AJS: Early effect of adult thymectomy. *Nature New Biology* 231: 110-111 1971.
27. Bach JF, Dardenne M, Lesavre PH, Choay J: The clinical use of thymic factors in immunodeficiency diseases. In: Selegmann M and Hitzig W eds. INSERM

- simposium No. 8. Human lymphocyte differentiation : its application to immunodeficiencies 445-464 1980b Elsevier, Amsterdam.
28. Bach JF, Dardenne M, Papiernik M: Evidence of serum factor produced by the human thymus. *Lancet* I: 1056-1058 1972.
29. Bach JF, Dardenne M, Pléau JM, Bach MA: Isolation, biochemical characteristics and biological activity of a circulating thymic hormone in the mouse and in the human. *Ann NY Acad Sci* 249: 186-210 1975.
30. Bach JF, Dardenne M, Pléau JM, Rosa J: Biochemical characterization of a serum thymic factor. *Nature* 266: 55-56 1976.
31. Bach JF, Pléau JM, Dardenne M, Bach MA: Thymus dependency and biological significance of facteur thymique serique (FTS). In: Serrou B and Rosenfeld C eds. INSERM simposium No. 8. Human lymphocyte differentiation : its application to cancer 279-286 1978b Elsevier, Amsterdam.
32. Bach JF: Thymulin (FTS-Zn). *Clin Immunol Allergy* 3: 133-156 1983.
33. Bach MA and Bach JF: Studies on thymus products. VI. The effects of cyclic nucleotides and prostaglandins on rosette forming cells. Interactions with thymic factor. *Eur J Immunol* 3: 778-793 1973.
34. Bach MA and Beaurain G: Respective influence of extrinsic and intrinsic factors on the age-related decrease of thymic secretion. *J Immunol* 122: 2505-2507 1979.
35. Bach MA, Droz D, Noël LH: Effect of long-term treatment with circulating thymic factor on murine lupus. *Arthritis Rheum* 23: 1351-1358 1980a.
36. Bach MA: Lymphocyte-mediated cytotoxicity: effects on ageing of adult thymectomy and thymic factor. *J Immunol* 119: 641-648 1977.
37. Badamchian M, Spangelo BL, Damavandy T, MacLeod RM, Goldstein AL: Complete amino acid sequence analysis of a peptide isolated from thymus that enhances release of growth hormone and prolactin. *Endocrinology* 128: 1580-1588 1991.
38. Badamchian M, Wang SS, Spangelo BL, Damavandy T, Goldstein AL: Chemical and biological characterization of MB-35 : a thymic-derived peptide that stimulates the release of growth hormone and prolactin from rat anterior pituitary cells. *Progr NeuroEndocrinImmunol* 3: 258-265 1990.
39. Baghdassarian A, Guyda H, Johanson A: Urinary excretion of radioimmunoassayable luteinizing hormone (LH) in normal male children and adults, according to age and stage of sexual development. *J Clin Endocrinol Metab* 31: 428-435 1970.
40. Bak JF, Moller N, Schmitz O: Effects of growth hormone on fuel utilization and muscle glycogen synthase activity in normal humans. *Am J Physiol* 260: E736-E742 1991.

41. Bansal VS, Caldwell KK, Majerus PW: The isolation and characterization of inositol polyphosphate 4-phosphatase. *J Biol Chem* 265: 1806-1811 1990.
42. Barcia MG, Castro JM, Jullien CD, Freire M: Prothymosin α is phosphorylated in proliferating stimulated cell. *J Biol Chem* 268: 4704-4708 1993.
43. Bartke A, Smith MS, Michael SD, Peron FG, Dalterio S: Effects of experimentally-induced chronic hyperprolactinemia on testosterone and gonadotropin levels in male rats and mice. *Endocrinology* 100: 182-186 1977.
44. Bash JA, Dardenne M, Bach JF, Waksman BH: In vitro responses of rat lymphocytes following adult thymectomy. III. Prevention by thymic factor of increased suppresser activity in the spleen. *Cell Immunol* 26: 308-312 1976.
45. Batty IH and Nahorski SR: Lithium inhibits muscarinic-receptor-stimulated inositol tetrakisphosphate accumulation in rat cerebral cortex. *Biochem J* 247: 797-800 1987.
46. Batty IH, and Nahorski SR: Analysis of [³H]inositol phosphate formation and metabolism in cerebral-cortical slices. Evidence for a dual metabolism of inositol 1,4-bisphosphate. *Biochem J* 288: 807-815 1992.
47. Bauer-Dantoin AC, Knox KL, Schwartz NB, Levine JE: Estrus cycle stage-dependent effects of neuropeptide-Y on luteinizing hormone (LH)-releasing hormone-stimulated LH and follicle-stimulating hormone secretion from anterior pituitary fragments *in vitro*. *Endocrinology* 133: 2413-2417 1993.
48. Baumann K and Müller J: Effects of hypophysectomy with or without ACTH maintenance therapy on the final steps of aldosterone biosynthesis in the rat. *Acta Endocrinol* 76: 102-116 1974.
49. Bell DA, Morrison B, VandenBygaart P: Immunogenic DNA related factors: nucleosomes spontaneously released from normal murine lymphoid cells stimulate proliferation and immunoglobulin synthesis of normal mouse lymphocytes. *J Clin Invest* 85: 1487-1496 1990.
50. Bellve AR and Zheng W: Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions. *J Reprod Fert* 85: 771-793 1989.
51. Bennett GW and Whitehead SA : Mammalian Neuroendocrinology. 1983 Eds : Oxford University Press, NY.
52. Berczi I: The role of prolactin in the pathogenesis of autoimmune disease. *Endocr Pathol* 4: 178-195 1993.
53. Berkvens JM, van Nesselrooy JHJ, Kroes R: Spontaneous tumours in the pituitary gland of old Wistar rats. A morphological and immunocytochemical study. *J Pathol* 30: 179-191 1980.
54. Bern HA and Nicoll CS: The comparative endocrinology of prolactin. *Rec prog Horm Res* 24: 681-692 1968.
55. Bernardi G, Comsa J: Purification chromatographique d' une preparation de thymus douee d' activite hormonale. *Experientia* 21: 416-417 1965.

56. Bjorksten J and Tenhu H: The crosslinking theory of ageing. Added evidence. *Exp Gerontol* 25: 91-95 1990.
57. Bjorksten J: The crosslinkage theory of ageing. *J Am Geriatr Soc* 16: 408-411 1968.
58. Blake MJ, Nowak TS, Holbrook NJ: In vivo hyperthermia induces expression of HSP70 mRNA in brain regions controlling the neuroendocrine response to stress. *Brain Res* 8: 89-103 1990.
59. Blalock JE: A molecular basis for bi-directional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 69: 1-32 1989.
60. Blalock JE: Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system. *Chem Immunol* 52: 1-24 1992.
61. Bollengier F, Geerts A, Matton A, Mahler A, Velkeniers B, Hooghe-Peters E, Vanhaelst L: Identification and localization of 23,000 and glycosylated rat prolactin in subcellular fractions of rat anterior pituitary and purified secretory granules. *J Neuroendocrinol* 5: 669-676 1993.
62. Bollengier F, Velkeniers B, Hooghe-Peters E, Mahler A, Vanhaelst L: Multiple forms of rat prolactin and growth hormone in pituitary cell subpopulations separated using a Percoll gradient system: disulphide-bridged dimers and glycosylated variants. *J Endocrinol* 120: 201-206 1989.
63. Bolton W, Benton F, Maclay G, Sturgill B: Spontaneous glomerular sclerosis in ageing Sprague-Dawley rats. *Am J Pathol* 85: 277-300 1976.
64. Bolzán AD, Brown OA, Goya RG, Bianchi MS: Hormonal modulation of antioxidant enzyme activities in young and old rats. *Exp Gerontol* 30: 169-175 1995.
65. Boorman GA and Hollander CF: Spontaneous lesions in female WAG/Rij (Wistar) rat. *J Gerontol* 28: 152-159 1973.
66. Bordigoni P, Bene MC, Bach JF: Improvement of cellular immunity and IgA production in immunodeficient children after treatment with synthetic serum thymic factor (FTS). *Lancet* ii: 293-297 1982.
67. Brandao-Neto J, Madureira G, Mendonca BB, Bloise W, Castro AV: Endocrine interaction between zinc and prolactin. An interpretative review. *Biol Trace Elem Res* 49: 139-149 1995.
68. Brostedt P, Luthman M, Wide L, Werners S, Roos P: Characterization of dimer forms of human pituitary growth hormone by bioassay, radioreceptor assay and radioimmunoassay. *Acta Endocrinol (Copenh)* 122: 241-248 1990.
69. Brunetti L, Ragazoni E, Preziosi P, Vacca M: *Life Sciences* 56: PL277-PL283 1995.
70. Brunk CF, Jones KC, James TW: Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal Biochem* 92: 497-500 1978.
71. Buckingham JC : The control of ACTH secretion. *Stress* 2: 23-31 1981.

72. Buckingham JC, Safieh B, Singh S, Arduino LA, Cover PO, Kendall MD: Interactions between the hypothalamio-pituitary adrenal axis and the thymus in the rat: A role for corticotrophin in the control of thymulin release. *J Neuroendocrinol* 4: 295-301 1992.
73. Buckingham JC, Safieh B, Singh S, Kendall MD: Interaction of corticotrophin and glucocorticoids in the control of thymulin release in the rat. *Br J Pharmacol* 102: 15-22 1991.
74. Buckley AR and Buckley DJ: Prolactin-stimulated ornithine decarboxilase induction in rat hepatocytes: coupling to diacylglycerol generation and protein kinase C. *Life Sci* 48: 237-243 1991.
75. Burke F, Naylor MS, Davies B, Balkwill F: The cytokine wall chart. *Immunol Today* 14: 165-170 1993.
76. Calvo JC, Torres H, Charreau EH: Teoría de los receptores. En: Calandra RS y de Nicola AF eds, *Endocrinología Molecular* 1-19 1985. Ed: El Ateneo.
77. Cambroneró JC, Rivas FJ, Borrel J, Gauza C: Interleukin-1-beta induces pituitary adrenocorticotropin secretion: evidence for glucocorticoid modulation. *Neuroendocrinology* 55: 648-654 1992.
78. Campos MB, Chiochio SR, Calandra RS, Ritta MN: Effect of bilateral denervation of the immature rat testis on testicular gonadotropin receptors and *in vitro* androgen production. *Neuroendocrinology* 57: 189-194 1993.
79. Carbajo-Pérez E, Watanabe YG: Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell Tissue Research* 261: 333-338 1990.
80. Cassimeris L, Safer D, Nachmias TV, Zigmond SH: Thymosin β_4 sequesters the majority of G-actin in resting human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 119: 1261-1270 1992.
81. Castro MG and Morrison E: Nuclear translocation of neuropeptides: possible nuclear roles. *J Endocrinol* En prensa 1995.
82. Castro MG, Estivariz FE, Iturriza FC: The regulation of the corticomelanotropic cell activity in aves. I. Evaluation and selection of *in vitro* systems for testing ACTH-releasing substances in the duck pituitary. *Comp Biochem Physiol* 79: A169-A173 1984.
83. Cerami A: Hypothesis. Glucose as mediator of ageing. *J Am Geriatr Soc* 33: 626-628 1968.
84. Challis RA, Mistry R, Gray DW, Nahorski SR: Modulation of muscarinic cholinergic-stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation by N-methyl-D-aspartate in neonatal rat cerebral cortex. *Neuropharmacology* 33: 15-25 1994.
85. Chase MD, Geschwind II, Bern HA: Synergistic role of prolactin in response of male rat sex accessories to androgen. *Proc Soc Exp Biol Med* 94: 680-683 1957.
86. Chen C, Wu D, Clarke IJ: Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J Endocrinol* 148: 381-386 1996.

87. Chen C, Zhang J, Israel JM, Clarke IJ, Vincent JD: Mechanism of the prolactin rebound after dopamine withdrawal in rat pituitary cells. *Am J Physiol* 265: E145-E153 1993.
88. Chew LJ, Seah V, Murphy D, Carter D: Anterior pituitary vasoactive intestinal peptide mRNA is colocalised with prolactin mRNA in hyperoestrogenized rats. *J Mol Endocrinol* 16: 211-220 1996.
89. Chien KR, Abrams J, Serroni A, Martin JT, Farber JL: Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem* 253: 4809-4817 1978.
90. Chin WW: Organisation and expression hormone genes. In: Imura H (ed). *The Pituitary Gland* 103-125 Raven Press, NY 1985.
91. Chrétien M, Seidah NG: Chemistry and biosynthesis of pro-opiomelanocortin, ACTH, MSH's, endorphins and their related peptides. *Mol Cell Biochem* 34: 101-127 1981.
92. Cinader B: Compartmentalisation (multicentricity) and interaction between subcompartments. *Ann NY Acad Sci* 663: 294-304 1993.
93. Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Dulrue F, Weiner RI: The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133: 1292-1299 1993.
94. Clark RG, Jansson JO, Isaksson O, Robinson ICAF: Intravenous growth hormone: growth responses to patterned infusions in hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 104: 53-61 1985.
95. Clarke PGH: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embriol* 181: 195-213 1990.
96. Clemmons DR and van Wyk JJ: Somatomedin: physiological control and effects on cell proliferation. In: Baserga R (Ed): *Handbook of Experimental Pharmacology* 161-207 1981 Berlin: Springer-Verlag.
97. Cocchi D, Calderini I, Ganzetti E, Galbiati E, Parenti M, Miller EE: Aspects of the control of prolactin and growth hormone secretion in ageing. In: Müller EE and MacLeod eds. *Neuroendocrine perspectives Vol 5*. 1986 Elsevier, Amsterdam.
98. Cohen S, Berrih S, Dardenne M, Bach JF: Regulation in vitro de la sécrétion de thymuline par les cellules épithéliales thymiques humaines. *C R Acad Sci Paris* 297: 63-68 1983.
99. Colarian J, Sethi A, Merchant A, Parikh N, Mutchnick M: Thymosin α_1 enhancement of human lymphocyte proliferation is not mediated by prostaglandin E₂. *Thymus* 15: 241-247 1990.
100. Compton MM and Cidlowski JA: Thymocyte apoptosis. A model of programmed cell death. *Trends Endocrinol Metab* 3: 17-23 1992.

101. Comsa J, Hook Jr RR, Luckey TD: Thymectomy. *Thymic Hormones*. 1-18 1973.
102. Comsa J, Leonhardt H, Schwarz JA: Influence of the thymus-corticotrophin-growth hormone interaction on the rejection of skin allografts in the rats. *Ann NY Acad Sci USA* 249: 387-401 1975.
103. Comsa J, Leonhardt H, Wekerle H: Hormonal coordination of the immune response. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 92: 115-191 1982.
104. Comsa J, Luckey TD: Thymus substitution and HTH, the homeostatic thymus hormone. *Thymic Hormones*. 39-58 1973.
105. Comsa J, Philipp EM, Leonhardt H: Effects of thymectomy on the endocrine glands of the rat. *Israel J Med Sci* 13: 354-362 1977.
106. Comsa J, Schwarz JA, Neu H: Interaction between thymic hormone and hypophyseal growth hormone on production of precipitating antibodies in the rat. *Immunol Commun* 3: 11-18 1974.
107. Comsa J: Influence of the thymus upon the reaction of the rat to anterior pituitary growth hormone. *Nature* 18: 27-28 1958.
108. Condon MR and Hall AK: Expression of thymosin beta-4 and related genes in developing human brain. *J Mol Neurosci* 3: 165-170 1992.
109. Conliffe PR, Bennett HPJ, Mulay S: Isolation and characterization of a cytostatic histone H2B-like protein from foetal lungs of non-diabetic and diabetic rats. *J Endocrinol* 139: 97-105 1993.
110. Conlon JM, Grimelius L, Wallin G, Thim L: Isolation and structural characterization of thymosin beta-4 from a human medullary thyroid carcinoma. *J Endocrinol* 118: 155-159 1988.
111. Cónsole GM, Gomez Dumm CLA, Brown OA, Ferese C, Goya RG: Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Age Dev* 95: 157-166 1997.
112. Cónsole GM, Gomez Dumm CLA, Goya RG: Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotroph in the pituitary of ageing rats. *Acta Anat* 152: 28-32 1995.
113. Cónsole GM, Gomez Dumm CLA, Goya RG: Immunohistochemical and radioimmunological study of pituitary gonadotrophs during ageing in male rats. *Mech Age Dev* 73: 87-95 1994.
114. Cónsole GM, Gomez Dumm CLA, Goya RG: Impact of ageing on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Age Dev* 70: 45-51 1993.
115. Cordero OJ, Sarandeses CS, López JL, Nogueira M: Prothymosin α enhances human natural killer cell cytotoxicity: role in mediating signals for NK activity. *Lymphokine Cytokine Res* 11: 277-285 1992.

116. Corpas E, Harman S, Blackman M: Human growth hormone and human ageing. *Endocrine Rev* 14: 20-39 1993.
117. Costello LC, Liu Y, Franklin RB: Prolactin specifically increases pyruvate dehydrogenase E1 alpha in rat lateral prostate epithelial cells. *Prostate* 26: 189-193 1995.
118. Coto JA, Hadden EM, Sauro M, Zorn N, Hadden JW: Interleukin 1 regulates secretion of zinc-thymulin by human thymic epithelial cells and its action on T-lymphocyte proliferation and nuclear protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7752-7756 1992.
119. Couture L, Naharisoa H, Grebert D, Remy JJ, Pajot-Augy E, Bozon V, Haertle T, Salesse R: Peptide and immunochemical mapping of the ectodomain of the porcine LH receptor. *J Mol Endocrinol* 16: 15-25 1996.
120. Covelli V, Jirillo E, Antonaci S: Neuroimmune networks and ageing of the immune system: biological and clinical significance. *Arch Gerontol Geriatr* suppl 3: 129-144 1992.
121. Cowan MJ, Fujiwara P, Wara DW, Amman AJ: Effect of thymosin on cellular immunity in old age. *Mech Age Devel* 15: 29-39 1981.
122. Croissandeau G, Schussler N, Grouselle D, Pagesy P, Rauch C, Bayet MC, Peillon F, Le Dafniet F: Evidence of thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene expression in rat anterior pituitaries and modulation by estrogens of TRH-like immunoreactivity and TRH-elongated peptide contents. *J Endocrinol* 151: 87-96 1996.
123. Crowe PD, Buckley AR, Zorn NE, Rui H: Prolactin activates protein kinase C and stimulates growth-related gene expression in rat liver. *Mol Cell Endocrinol* 79: 29-35 1991.
124. Cung MT, Marraud M, Lefrancier P, Dardenne M, Bach JF, Laussac JP: NMR study of a lymphocyte differentiating thymic factor. An investigation of the Zn(II)-nonapeptide complexes (thymulin). *J Biol Chem* 263: 5574-5580 1988.
125. Cunningham ET and De Souza EB: Interleukin 1 receptor in the brain and endocrine tissues. *Immunol Today* 14: 171-176 1993.
126. Cutler RG: Genetic and evolutionary molecular aspects of ageing. In: Dall JLC, Ermini M, Herrling PL, Lehr U, Meier-Ruge W, Stähelin HB eds. *Prospects in ageing* 23-58 1992 Ed: Academic Press, London.
127. Cuttler L, Glaum SR, Collins BA, Miller RJ: Calcium signalling in single growth hormone-releasing factor-responsive pituitary cells. *Endocrinology* 130: 945-953 1992.
128. Dada MO, Campbell GT, Blake CA: A quantitative immunocytochemical study of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone cells in the adenohypophysis of adult male rats and adult female rats throughout the oestrus cycle. *Endocrinology* 113: 970-984 1984.

- 129.Danner DB: The proliferation theory of rejuvenation. *Mech Ageing Dev* 65: 85-93 1992.
- 130.Dardenne M and Bach JF: Ontogeny of thymus secretion. *Ann Immunol* 127C: 963-966 1976.
- 131.Dardenne M and Bach JF: The sheep cell rosette assay for the evaluation of thymic hormones. In: Van Bekkum D ed. Biological activity of thymic hormones 235-243 1975 Kooyker Scientific Publications, Rotterdam.
- 132.Dardenne M and Savino W: Neuroendocrine control of the thymic epithelium: modulation of thymic endocrine function, cytokeratin expression and cell proliferation by hormones and neuropeptides. *Prog NeuroEndocrinImmunol* 3: 18-25 1990.
- 133.Dardenne M, Nabarra B, Lefrancier P: Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor (FTS). *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5370-5375 1982.
- 134.Dardenne M, Pléau JM, Bach JF: Evidence for the presence of a carrier of a serum thymic factor (FTS). *Eur J Immunol* 10: 83-86 1980a.
- 135.Dardenne M, Pléau JM, Blouquit JY, Bach JF: Characterization of facteur thymique sérique (FTS) in the thymus. II. Direct demonstration of the presence of FTS in thymosin fraction V. *Clin Exp Immunol* 42: 477-482 1980b.
- 136.Dardenne M, Pléau JM, Man NK, Bach JF: Structural study of circulating thymic factor: a peptide isolated from pig serum. I. Isolation and purification. *J Biol Chem* 252: 8040-8044 1977.
- 137.Dardenne M, Savino W, Bach JF: Modulation of thymic endocrine function by thyroid and steroid hormones. *Intern J Neuroscience* 39: 325-334 1988.
- 138.Dardenne M, Savino W, Gagnerault MC, Itoh T, Bach JF: Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. PRL stimulates in vivo and in vitro la production de thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology* 125: 1251-1260 1989.
- 139.Daughaday WH: Growth hormone and the somatomedins. In: Daughaday WH (Ed): Endocrine Control of Growth 14-37 1981 NY: Elsevier.
- 140.Davis MD, Lichtensteiger W, Shlumpf M, Bruinink A: Early postnatal development of pituitary neurointermediate lobe control in the rat by dopamine neurones. *Neuroendocrinology* 39: 1-12 1984.
- 141.Davis RK, Stevenson GT, Bush KA: Tumor incidence in normal Sprague-Dawley female rats. *Cancer Res* 16: 194-197 1956.
- 142.De Nicolao G and Liberati D: Linear and non-linear techniques for the deconvolution of hormone time-series. *IEEE Trans Biomed Eng* 40: 440-445 1993.
- 143.Degerbiad M, Almkvist O, Grunditz R, Hall K, Kaijser L, Knuttsson E, Ringertz H, Thoren M: Physical and psychological capabilities during substitution

- therapy with recombinant growth hormone in adults with growth hormone deficiency. *Acta Endocrinol* 123: 185-193 1990.
- 144.D'Ercole JA, Stiles AD, Underwood LE: Tissue concentrations of somatomedin C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 935-939 1984.
- 145.Deschaux P, Doublet A, Fontanges R: Etude comparée du mode d'action intracellulaire de la thymosine α 1 et du facteur thymique sérique. *C R Acad Sci Paris* 294: 207-210 1982.
- 146.Diaz MD, Belova N, Rettori V, Mccann SM: Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 170-174 1995.
- 147.Dodson MV, Allen RE, Hossner KL: Ovine somatomedin, multiplication-stimulating activity, and insulin promote skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro. *Endocrinology* 117: 2357-2363 1985.
- 148.Döhler KD, Mühlen A V, Gärtner K, Döhler U: Effect of various blood sampling techniques on serum levels of pituitary and thyroid hormones in the rat. *J Endocrinol* 74: 341-342 1977.
- 149.Donato R: Perspectives in S-100 protein biology. Review Article. *Cell Calcium* 12: 713-726 1991.
- 150.Dowd AJ and Bartke A: Serum levels of prolactin, LH and FSH, and testis cholesterol content in rats from one to ten weeks of age. *Biol Reprod* 7: 115-117 1972.
- 151.Dracopoli NC, Rettig WJ, Whitfield GK : Assignment of the gene for the beta subunit of thyroid-stimulating hormone to the short arm of human chromosome 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1822-1826 1986.
- 152.Durbin PW, Williams MH, Jeung N, Arnold JS: Development of spontaneous mammary tumours over the life span of the female Charles River (Sprague-Dawley) rat: The influence of ovariectomy, thyroidectomy and adrenalectomy-ovariectomy. *Cancer Res* 26: 400-411 1966.
- 153.Eberle A and Schwyzer R: Hormone-receptor interactions. The message sequence of α -melanotropin: demonstration of two active sites. *Clin Endocrinol* 5: 41s-48s 1976.
- 154.Emoto N, Isozaki O, Ohmura E, Tsushima T, Shizume Kazuo, Demura H : TSH increases cell surface heparan sulfate proteoglycans of FRTL-5 rat thyroid cells : a simple method for quantitatively estimating cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinol Metab* 1: 123-130 1994.
- 155.Enemar A, Falck B, Iturriza FC: Adrenergic nerves in the pars intermedia of the pituitary in the toad, *Bufo arenarum*. *Z. Zellforsch* 77: 325-330, 1967.

156. Erard D, Charreire J, Auffredou MT: Regulation of contact sensitivity to DNFB in the mouse: effects of ageing on adult thymectomy and thymic factor. *J Immunol* 123: 1573-1576 1979.
157. Estivariz F.: ACTH y su familia de peptidos. *Investigación y Ciencia* 107: 28-37, 1985.
158. Estivariz FE, Hope J, McLean C, Lowry PJ: Purification and characterisation of a γ -melanotropin precursor from frozen human pituitary glands. *Biochem J* 191: 125-132 1980.
159. Evan GI, Brown L, Whyte M, Harrington E: Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 7: 825-834 1995.
160. Fabian TJ, Johnson TE: Identification of genes that are differentially expressed during ageing in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol* 50: B245-B253 1995.
161. Fabris N, Mocchegiani E: Endocrine control of thymic serum factor production in young and old mice. *Cell Immunol* 91: 325-335 1985.
162. Fabris N, Pierpaoli W, Sorkin E: Lymphocytes, hormones and ageing. *Nature* 240: 557-559 1972.
163. Fabris N: A neuroendocrine-immune theory of ageing. *Intern J Neuroscience* 51: 373-375 1990.
164. Faglia G, Beck-Peccoz PB, Ballabio M, Nava C: Excess of β -subunit of thyrotropin (TSH) in patients with idiopathic central hypothyroidism due to the secretion of TSH with reduced biological activity. *J Clin Endocrinol Metab* 56: 908-914 1983.
165. Fanjul LF, Marrero I, Gonzales J, Quintana P, Santana P, Estevez F, Mato JM, Ruiz de Galarreta CM: Does oligosaccharide-phosphatidylinositol (glycosyl-phosphatidylinositol) hydrolysis mediate prolactin signal transduction in granulosa cells? *Eur J Biochem* 216: 747-755 1993.
166. Farah JM, Hall NR, Bishop JF, Goldstein AL, O'Donohue TL: Thymosin fraction five stimulates secretion of immunoreactive β -endorphin in mouse corticotropic tumor cells. *J Neurosci Res* 18: 140-146 1987.
167. Farquar MG, Reid JJ, Daniel LW: Intracellular transport and packaging of prolactin: a quantitative electron microscope autoradiographic study of mammoth dissociated from rat pituitaries. *Endocrinology* 102: 296-311 1978.
168. Feldman JD and Woda BA: Pathology and tumour incidence in aged Lewis and BN rats. *Clin Immunol Immunopathol* 15: 331-343 1980.
169. Ferrara N, Schweigerer L, Neufel G, Mitchell R, Gospodarowics D: Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5773-5777 1987.

170. Flaws JA and Suter DE: Preparation of an enriched fraction of luteinizing hormone-secreting cells from a mixed population of rat anterior pituitary cells. *Biol Reprod* 48: 1026-1035 1993.
171. Folch H, Eller G, Mena M, Esquivel P: Neuroendocrine regulation of thymus hormones: hypothalamic dependence of "facteur thymique serique" level. *Cell Immunol* 102: 211-216 1986.
172. Fomina AF, Levitan ES: Three phases of TRH-induced facilitation of excitation by single lactotrophs. *J Neurosci* 15: 4982-4991 1995.
173. Fong Y, Rosenbaum M, Tracey KJ, Raman G, Hesse DG, Matthews DE, Liebel RL, Gertner JM, Fishman DA, Lowry SF: Recombinant growth hormone enhances muscle myosin heavy-chain mRNA accumulation and amino acid accretion in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3371-3374 1989.
174. Ford JJ, Vakharia DD, Anderson LL, Klindt J: Thymosin beta-4 concentrations during the estrus cycle and after hypophyseal stalk transection of female pigs. *Exp Biol Med* 193: 185-189 1990.
175. Fournié GJ, Martres F, Pourrat JP, Alary C, Rumeau M: Plasma DNA as Cell Death Marker in Elderly Patients. *Gerontology* 39: 215-221 1993
176. Fournié GJ and Bach JF: Induction of θ -positive cells by thymic hormones. A critical evaluation. In: Van Bekkum D ed. Biological activity of thymic hormones 251-256 1975 Kooyker Scientific Publications, Rotterdam.
177. Frantz AG: Prolactin. *N Engl J Med* 298: 201-207 1978.
178. Frasca D, Adorini L, Mancini C, Doria G: Reconstitution of T cell functions in ageing mice by thymosin alpha-1. *Immunopharmacol* 11: 155-163 1986.
179. Friedman E, Krieger DT, Mezey E, Leranath CS, Brownstein MJ, Palkovits M: Serotonergic innervation of the rat pituitary intermediate lobe: Decrease after stalk section. *Endocrinology* 112: 1943-1947 1983.
180. Frillingos S and Tsolas O: Age- and sex-related differences in the content of prothymosin α in rat tissues. *Experientia* 48: 236-239 1992.
181. Frohman LA and Jason JO: Growth hormone-releasing hormone. *Endocr Rev* 7: 233-253 1986.
182. Fryberg DA and Barrett EJ: Growth hormone acutely stimulates skeletal muscle but not whole-body protein synthesis in humans. *Metabolism* 42: 1223-1227 1993.
183. Fryberg DA, Gelfand RA, Barret EJ: Growth hormone acutely stimulates forearm muscle protein synthesis in normal humans. *Am J Physiol* 260: E499-E504 1991.
184. Fryklund L, Brandt J, Eketorp G: A comparison of human biosynthetic and pituitary somatotropins: purity and potency. In: Guerigan JL, Bransome ED, Outschoorn AS (Eds.): Hormone Drugs 319-326 1982. US Pharmacopeial Convention.

185. Garaci GR, Favelli C, Gobo VD, Garaci E, Jaffe BM: Is thymosin action mediated by prostaglandin release? *Science* 220: 1163-1164 1983.
186. Gastinel LN, Pléau JM, Dardenne M: High affinity binding sites on plasma membrane obtained from lymphoblastoid cultured 1301 cell line for highly radioactive serum thymic factor. *Biochim Biophys Acta* 684: 117-126 1982.
187. Genazzani AR, Genazzani AD, Volpogni C, Pianazzi F, Li GA, Surico N, Petraglia F: Opioid control of gonadotrophin secretion in humans. *Hum Reprod* 8: 151-153 1993.
188. Gershengorn MC: Mechanism of thyrotropin releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. *Annu Rev Physiol* 48: 515-526 1986.
189. Geschwind II: Dynamics of pituitary gonadotropin secretion. *X Biennial Symposium on Animal Reproduction* 34: 19-38 1972.
190. Geschwind II: Species variation in protein and polypeptide hormones. In: Gorbman A (Ed.). *Comparative Endocrinology*. 421-443 1959. John Wiley and Sons, NY.
191. Goff BL, Roth JA, Arp LH, Incefy GS: Growth hormone treatment stimulates thymulin production in aged dogs. *Clin Exp Immunol* 68: 580-587 1987.
192. Goldstein AL, Low TKL, Latz MM, Hall NR, Naylor PH: Thymosins. *Clin Immunol Allergy* 3: 119-132 1983.
193. Goldstein AL, Low TKL, McAdoo M, McLure J, Thurman GB, Rossio JJ, Lay CY: Thymosin α_1 : isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 725-729 1977.
194. Goldstein AL, Low TKL, Thurman GB, Zatz MM, Hall N, Chen J, Hu SK, Naylor PB, McCiure E: Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Rec Prog Horm Res* 17: 369-415 1981.
195. Goldstein AL: *Thymic hormones and lymphokines: basic chemistry and clinical applications*. 1984 Plenum Press, NY.
196. Goldstein AL: Thymosin: Basic properties and clinical potential in the treatment of patients with immunodeficiency diseases and cancer. *Antibiotic Chemother* 24: 47-59 1978.
197. Goldstein G and Lau C: Thymopoietin and immunoregulation. In: Beer RF and Bassett EG eds. *Polypeptide hormones*. 459-465 1980 Ed. Raven Press, NY.
198. Goldstein G, Scheid MP, Boyse EA, Schlesinger DH, van Vauwe J: A synthetic pentapeptide with biological activity characteristics of the thymic hormone thymopoietin. *Science* 204: 1309-1310 1979.
199. Goodman DG, Ward JM, Squire RA, Paxton MB, Reichardt WD, Chu KC, Linhart MS: Neoplastic and nonneoplastic lesions in Osborne-Mendel rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 55: 433-447 1980.
200. Goodman HM: Effects of chronic growth hormone treatment on lipogenesis by rat adipose tissue. *Endocrinology* 72: 95-99 1963.

201. Goodman HM: The effects of epinephrine on glycerol production in segments of adipose tissue preincubated with dexamethasone and growth hormone. *Proc Soc Exp Biol Med* 130: 909-912 1969.
202. Goso C, Frasca D, Doria G: Effect of synthetic thymic humoral factor (THF-gamma-2) on T-cell activities in immunodeficient ageing mice. *Clin Exp Immunol* 87: 346-351 1992.
203. Gospodarowics D and Lau K: Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 292-298 1989.
204. Goya RG, Castro MG, Hannah MJ, Sosa YE, Lowry PJ: Thymosin peptides stimulate corticotrophin release by a calcium-dependent mechanism. *Neuroendocrinology* 57: 230-235 1993.
205. Goya RG, Castro MG, Saphier PW, Sosa YE, Lowry PJ: Thymus-pituitary interactions during ageing. *Age Ageing* 22: S19-S25 1993.
206. Goya RG, Castro MG, Sosa YE: Diminished diurnal secretion of corticosterone in ageing female but not male rats. *Gerontology* 35: 181-187 1989a.
207. Goya RG, Gagnerault MC, Leite de Moraes MC, Savino W, Dardenne M: In vivo effects of growth hormone on thymus function in ageing mice. *Brain Behav Immun* 6: 341-354 1992.
208. Goya RG, Gagnerault MC, Sosa YE, Bevilacqua JA, Dardenne M: Effects of growth hormone and thyroxine on thymulin secretion in ageing rats. *Neuroendocrinology* 58: 338-343 1993.
209. Goya RG, Gagnerault MC, Sosa YE, Dardenne M: Reduced ability of hypothalamic and pituitary extracts from old mice to stimulate thymulin secretion in vitro. *Mech age dev* 83: 143-154 1995.
210. Goya RG, Lu JKH, Meites J: Gonadal function in ageing rats and its relation to pituitary and mammary pathology. *Mech Age Devel* 56: 77-88 1990c.
211. Goya RG, Naylor PH, Goldstein AL, Meites J: Changes in circulating levels of neuroendocrine and thymic hormones during ageing in rats: a correlation study. *Exp Gerontol* 25: 149-157 1990.
212. Goya RG, Quigley KL, Takahashi S, Reichhart R, Meites J: Differential effect of homeostatic thymus hormone on plasma thyrotropin and growth hormone in young and old rats. *Mech Age Devel* 49: 119-128 1989b.
213. Goya RG, Quigley KL, Takahashi S, Sosa YE, Meites J: Changes in somatotropin and thyrotropin secretory patterns in ageing rats. *Neurobiol Ageing* 11: 625-630 1990.
214. Goya RG, Sosa YE, Quigley KL, Gottschall PE, Goldstein AL, Meites J: Differential activity of thymosin peptides (thymosin fraction 5) on plasma thyrotropin in female rats of different ages. *Neuroendocrinology* 47: 379-383 1988.

215. Goya RG, Sosa YE, Quigley KL, Reichhart R, Meites J: Homeostatic thymus hormone stimulates corticosterone secretion in a dose- and age-dependent manner in rats. *Neuroendocrinology* 51: 59-63 1990.
216. Goya RG, Takahashi S, Quigley KL, Sosa YE, Goldstein AL, Meites J: Immune-neuroendocrine interactions during ageing: Age-dependent thyrotropin-inhibiting activity of thymosin peptides. *Mech Ageing Dev* 41: 219-227 1987.
217. Goya RG: Neuroendocrine system, programmed cell death and ageing. *Interdiscipl Topics Geront* 24: 81-89 1988.
218. Goya RG: The immune-neuroendocrine homeostatic network and ageing. *Gerontology* 37: 208-213 1991.
219. Grandison L : Effects of cholinergic agonists on anterior pituitary hormone secretion. In : Steger RW and Johns A eds. Handbook of pharmacologic methodologies for the study of the neuroendocrine system 155-172 1985 Ed : CRC Press Florida.
220. Green JD, Harris GW: The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. *J Endocrinol* 5: 136-140, 1947.
221. Green, JD: The comparative anatomy of the portal vascular system and of innervation of the hypophysis. In: Harris GW and Donovan BT Eds.: The pituitary gland. Berkeley, Univ. of California Press Vol I: 127-148, 1966.
222. Gregerson KA, Chukniyiska R, Golesorkhi N, : Stimulation of prolactin release by dopamine withdrawal: role of calcium influx. *Am J Phy Endocrinol Metabol* 30: E789-E794 1994b.
223. Gregerson KA, Golesorkhi N, Chukniyiska R : Stimulation of prolactin release by dopamine withdrawal: role of membrane hyperpolarization. *Am J Phy Endocrinol Metabol* 30: E781-E788 1994a.
224. Grubeck-Loebenstein B, Lechner H, Trieb K: Long-term in vitro growth of human T cell clones: can postmitotic 'senescent' cell populations be defined? *Int Arch Allergy Immunol* 104: 332-339 1994.
225. Grunstein RR, Ho KY, Sullivan CE: Sleep apnea in acromegaly. *Ann Intern Med* 115: 527-532 1991.
226. Gualde N, Rigaud M, Bach JF: Stimulation of prostaglandin synthesis by the serum factor (FTS). *Cell Immunol* 70: 362-366 1982.
227. Guy HR and Kirk CJ : Inositol phospholipids and cellular signalling. In : Cooke BA, King RJB and van der Molen HJ eds. Hormones and their actions. 47-62 1988 ed : Elsevier, Amsterdam.
228. Hadley ME *Endocrinology*, 3rd edn. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall 1992.
229. Hadley ME and Goldman JM: Physiological colour changes in reptiles. *Am Zoologist* 9: 489-504 1969.

230. Halilimanabat C, Oki Y, Iino X, Iwabuchi M, Morita H, Yoshimi T: The role of sodium in mediating adrenocorticotropin secretion by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 136: 2937-2942 1995.
231. Hall AK: Retinoids and a retinoic acid receptor differentially modulate thymosin β_{10} gene expression in transfected neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 12: 45-58 1992.
232. Hall NR, McGillis JP, Spangelo BL, Goldstein AL: Evidence that thymosins and other biological response modifiers can function as neuroactive neurotransmitters. *J Immunol* 135: 806s-811s 1985.
233. Halmi NS, Moriarty GC: Hipófisis. En: Weiss L, Greep RO: *Histología* 926-950. 4^{ta} Ed, El Ateneo, 1982.
234. Hamblin AS: *Lymphokines*. 1988 IRL Press, Oxford.
235. Han VKM, D'Ercole JA, Lund PK: Cellular localisation of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human foetus. *Science* 236: 193-197 1987.
236. Hannappel E, Xu GJ, Morgan J, Hempstead J, Horecker BL: Thymosin beta-4: a ubiquitous peptide in rat and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2172-2175 1982.
237. Haq JA and Szewczuk MR: Differential effect of ageing on membrane immunoglobulin (mIg)-mediated endocytosis in the inductive and effector sites of the mucosal immune system. *Reg Immunol* 4: 138-144 1992.
238. Harley CB, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-461 1990.
239. Harman D: Free radical theory of ageing. *Mutation Res* 275: 257-262 1992.
240. Harman D: The ageing process. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7124-7128 1981.
241. Hartman ML, Iranmanesh A, Thorner MO, Veldhuis JD: Evaluation of pulsatile patterns of growth hormone release in humans-A brief review. *Am J Hum Biol* 5: 603-614 1993.
242. Hefeneider SH, Cornell KA, Brown LE, Bakke AC, McCoy SL, Bennet RM: Nucleosomes and DNA bind to specific cell-surface molecule on murine cells and induce cytokine production. *Clin Immunol Immunopathol* 63: 245-249 1992.
243. Hemmings HC, Nairn AC, McGuinness TL, Haganir RL, Greengard P: Role of protein phosphorylation in neuronal signal transduction. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 3: 1583-1592 1989.
244. Henriksen JS, Saemark T, Vilhard H, Mau SE: Tachykinins induce secretion of prolactin from perfused rat anterior pituitary cells with two different binding sites. *J Rec Sign Transd Res* 15: 529-541 1995.
245. Hesse C and Ermini M: If you survive, are you alive? Is research contributing to a longer or to a better life? In: Dall JLC, Ermini M, Herrling PL, Lehr U,

- Meier-Ruge W, Stähelin HB eds. **Prospects in ageing XV-XVI 1992 Ed.:** Academic Press, London.
246. Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C: Ageing and immunity. *Acta Pathol Jpn* 42: 537-548 1992.
247. Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M: Role of the thymus in ageing of the immune system. In: Goldstein AL: **Biomedical Advances in ageing 375-384 1990** Plenum Publishing Co.
248. Hirschberg R, Rabb H, Bergamo R, Koppie JD: The delayed effect of growth hormone on renal function in humans. *Kidney Intl* 35: 865-870 1989.
249. Hjalmarson A: Sensitivity of the rat diaphragm to growth hormones. III. Biphasic action of growth hormone in vitro on amino acid uptake and pentose uptake. *Acta Endocrinol* 126: 1-17 1968.
250. Ho TWC, Greenan JR, Walker AM: Mammoth autoregulation: The differential roles of the 24K isoforms of PRL. *Endocrinology* 124: 1507-1514 1989.
251. Ho TWC, Leong FS, Olaso CH, Walker AM: Secretion of specific nonphosphorylated and phosphorylated rat prolactin isoforms at different stages of the estrus cycle. *Neuroendocrinology* 58: 160-165 1993.
252. Hochstrasser M: Ubiquitin, proteasomas, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Op Cell Biol* 7: 215-223 1995.
253. Hofecker G, Niedemüller H, Skalicky M: Basic somatic aspects of ageing and longevity. In: Dall JLC, Ermini M, Herrling PL, Lehr U, Meier-Ruge W, Stähelin HB eds. **Prospects in aging 59-77 1992 Ed:** Academic Press, London.
254. Hollenberg MD : Membrane receptor and hormone action. I. New trends related to receptor structure and receptor regulation. *Trends Pharmacol Sci* 2: 320-323 1981.
255. Hollenberg MD : Structure-activity relationships for transmembrane signalling : the receptor's turn. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 5: 178-186 1991.
256. Homo-Delalche F, Goya RG, Bach JF, Dardenne M: Ageing and defence mechanisms: The immune system. In: Timiras PS, Quay WD, Vernadakis A eds. **Hormones and Ageing. 383-409 1995.** CRC Press, USA.
257. Homo-Delarche F, Bach JF, Dardenne M: Thymic hormones and prostaglandins. I. Lack of stimulation of prostaglandin production by thymic hormones. *Prostaglandins* 38: 183-195 1989.
258. Homo-Delarche F, Gagnerault MC, Bach JF, Dardenne M: Thymic hormones and prostaglandins. II. Synergistic effect on mouse spontaneous rosette forming cells. *Prostaglandins* 39: 299-318 1990.
259. Hope J and Lowry PJ: Pro-opiocortin: the ACTH/LPH common precursor protein. *Front Horm Res* 8: 44-61 1981.

260. Horecker BL and Morgan JI: Ubiquitous distribution of thymosin beta-4 and related peptides in vertebrate cells and tissues. *Lymphokines* 9: 15-35 1984.
261. Hu L and Lawson DM: Prolactin release from subpopulations of rat lactotrophs in the presence and absence of dopamine. *J Endocrinol* 148: 113-120 1996.
262. Hu SK, Low TLK, Goldstein AL: Modulation of terminal deoxynucleotidyl transferase activity by thymosin. *Mol Cell Biochem* 41: 49-58 1981.
263. Huang HH and Meites J: Reproductive capacity of ageing female rats. *Neuroendocrinology* 17: 189-195 1975.
264. Huang HH, Steger RW, Bruni JF, Meites J: Patterns of sex steroid and gonadotropin secretion in ageing female rats. *Endocrinology* 103: 1855-1859 1978.
265. Hutchinson JSM : Control of the endocrine hypothalamus. In : Jeffcoate SL and Hutchinson JSM eds. *The endocrine hypothalamus* 75-106 1978 Ed : Academic Press London.
266. Hutton JC and Siddle K: Peptide hormone secretion: A practical approach. Rickwood D and Hames BD eds. *The practical approach series*. 1990 Oxford University Press, UK.
267. Hwang P, Guyda H, Friesen H: A radioimmunoassay for human prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1902-1906 1971.
268. Imura H, Kato Y, Nakai Y, Nakao K, Tanaka I, Takahashi H, Tojo K, Sugawara A: Endogenous opioids and related peptides: from molecular biology to clinical medicine. *J Endocrinol* 107: 147-157 1985.
269. Ireland JJ, Aten RF, Behrman HR: GnRH-like proteins in cows: concentrations during corpora luteal development and selective localization in granulosa cells. *Biol Reprod* 38: 544-550 1988.
270. Isgaard J, Nilsson A, Vikman K, Isaksson OGP: Growth hormone regulates the level of insulin-like growth factor-I mRNA in rat skeletal muscle. *J Endocrinol* 120: 107-112 1989.
271. Ishizaka K, Tsujii T, Winters SJ: Evidence for the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate/ protein kinase A pathway in the regulation of the gonadotropin ribonucleic acids. *Endocrinology* 133: 2040-2048 1993.
272. Jacob KK and Stanley FM: Insulin and cyclic adenosine monophosphate increase prolactin gene expression through different response pathways. *Mol Cell Endocrinol* 109: 175-181 1995.
273. Jacobs LS, Mariz IK, Daughaday WH: A mixed heterologous radioimmunoassay for human prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 34: 484-490 1972.
274. Jambon B, Montagne P, Bene MC: Immunohistologic localisation of 'facteur thymique sérique' (FTS) in human thymic epithelium. *J Immunol* 127: 2055-2059 1981.

275. Jenkinson S, Challiss SA, Nahorski SR: Evidence for lithium-sensitive inositol 4,5-bisphosphate accumulation in muscarinic cholinergic-stimulated cerebral-cortex slices. *Biochem J* 287: 437-442 1992.
276. Jenkinson S, Nahorski SR, Challis RA: Disruption by lithium of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate supply and inositol-1,4,5-trisphosphate in chinese hamster ovary cells expressing human recombinant m1 muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 46: 1138-1148 1994.
277. Jenks BG, Ederveen AGH, Feyen JHM, van Overbeeke AP: The functional significance of glycosylation of proopiomelanocortin in melanotrophs of the mouse pituitary gland. *J Endocrinol* 107: 365-374 1985.
278. Jennische E and Andersson GL: Expression of GH receptor mRNA in regenerating skeletal muscle of normal and hypophysectomized rats. An in situ hybridization study. *Acta Endocrinol* 125: 595-602 1991.
279. Jeoung DI, Allen DL, Guller S, Yen V, Sonenberg M: Mitogenic and receptor activities of human growth hormone-108-129. *J Biol Chem* 268: 22520-22524 1993.
280. Jimenez A and Walker RF : The serotonergic system. In : Steger RW and Johns A eds. Handbook of pharmacological methodologies for the study of the neuroendocrine system 109-154 1985 Ed : CRC Press Florida.
281. Johannes DV and Johnson ML : Deconvolution analysis of hormone data. *Meth Enzymol* 210: 539-575 1992.
282. Jorgensen JOL, Thuesen L, Ingemann-Hansen T, Pedersen SA, Jorgensen J, Skakkebaek NE, Christiansen JS: Beneficial effects of growth hormone treatment in GH-deficient adults. *Lancet* i: 1221-1224 1989.
283. Judd AM, Macleod RM, Login IS: Zinc acutely and reversibly inhibits pituitary prolactin secretion. *Brain Res* 294: 190-192 1984.
284. Kaiserlain D and Dardenne M: Studies on the mechanisms of the inhibitory effects of serum thymic factor on murine allograft immunity. *Cell Immunol* 66: 360-371 1982.
285. Kanungo MS: Theories of ageing. In: Kanungo MS ed. Biochemistry of ageing 242-272 1980 Academic Press, London.
286. Kato K, Ikeyama S, Takaoki M: Epithelial cell components immunoreactive with anti-serum thymic factor (FTS) antibodies: possible association with intermediate-sized filaments. *Cell* 24: 885-895 1981.
287. Kelly PA, Djiane J, Edery M: Different forms of the prolactin receptor-insights into the mechanism of prolactin action. *Trends Endocrinol Metab* 3: 54-59 1992.
288. Kendall MD and Stebbings RJ : The endocrine thymus. *Endocr J* 2: 333-339 1994.
289. Kerr JB and Sharpe RM: Follicle-stimulating hormone induction of Leydig cell maturation. *Endocrinology* 116: 2592-2604 1985.

290. Kharchenko EP, Bagrov AI, Sokolova TV: Pharmacological effect of exogenous histones on muscles. *Biull Eksp Biol Med* 103: 418-420 1987.
291. Kile JP and Nett TM: Differential secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone from ovine pituitary cells following activation of protein kinase A/ protein kinase C or increased calcium. *Biol Reprod* 50: 49-54 1994.
292. Kim U, Clifton KH, Furth J: A highly inbred line of Wistar rats yielding spontaneous mammo-somatotropic pituitary and other tumours. *J Natl Cancer Inst* 24: 1031-1055 1960.
293. King MS and Baertschi AJ : The role of intracellular messengers in adrenocorticotropin secretion in vitro. *Experientia* 46: 26-40 1990.
294. Kirkwood TB and Rose MR: Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos Trans R Soc Lond [Biol]* 332: 15-24 1991.
295. Knobil E and Hotchkiss J: Growth hormone. *Annu Rev Physiol* 26: 47-74 1964.
296. Knoop M, McMahan RFT, Jones CJP, Hutchinson IV: Apoptosis in pancreatic allograft rejection-ultrastructural observations. *Exp Pathol* 41: 219-224 1991.
297. Kobayashi Y: Quantitative and electron microscopic studies on the pars intermedia of the hypophysis. III. Effect of short-term administration of sodium deficient diet on the pars intermedia of mice. *Cell Tiss Res* 154: 321-327, 1974.
298. Kook AI and Trainin N: Hormone like activity of a thymus humoral factor on the induction of immune competence in lymphoid cells. *J Exp Med* 139: 193-207 1974.
299. Kordon C and Bihoreau C: Integrated communication between the neurones, endocrine and immune systems. *Horm Res* 31: 100-104 1989.
300. Kornberg RG y Klug A: El nucleosoma. *Investigación y Ciencia* 55: 28-44 1981.
301. Kornfeld S: Structure and function of the mannose-6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Ann Rev Biochem* 61: 307-330 1992.
302. Kreiger DT: Brain peptides: what, where, and why? *Science* 222: 975-985 1993.
303. Krieger DT, Liotta AS, Brownstein MJ: ACTH, β -lipotropin and related peptides in brain, pituitary and blood. *Recent Prog Hormon Res* 36: 272-344 1980.
304. Krueger JM, Toth LA, Johannsen L, Opp MR: Infectious disease and sleep: involvement of neuroendocrine- neuroimmune mechanisms. *Int J Neurosci* 51: 359-362 1990.
305. Krulich L : Central neurotransmitters and the secretion of prolactin, GH, LH and TSH. *Ann Rev Physiol* 21: 603-615 1979.
306. Kurosumi K, Koyana T, Tosaka H: Three types of growth hormone cells of the rat anterior pituitary as revealed by immunoelectron microscopy using a colloidal gold-antibody method. *Arch Histol Jpn* 49: 227-242 1986.

307. Kurosumi K, Ozawa H, Akiyama K, Senshu T: Immunoelectron microscopic studies of gonadotrophs in the male and female rat anterior pituitaries, with special reference to their changes with aging. *Arch Histol Cytol* 54: 559-571 1991.
308. Kyprianou N and Isaacs JT: Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122: 552-562 1988.
309. Lafuente A, Marcó J, Esquifino AI: Effects of hyperprolactinemia on prolactin and LH pulsatile pattern in female rats. *Rev Espan de Fisiol* 48: 291-296 1992.
310. Larrea F, Méndez I, Parra A, Monteros AE: Serum pattern of different molecular forms of prolactin during normal human pregnancy. *Hum Reprod* 8: 1617-1622 1993.
311. Larson GH and Wise PM: Age-related alterations in prolactin secretion by individual cells as assessed by the reverse haemolytic plaque-assay. *Biol Reprod* 44: 648-655 1991.
312. Le Fevre J and McClintock MK: Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in oestrus cycles and behaviour. *Biol Reprod* 38: 780-789 1988.
313. Le Lann AD, Fournié GJ, Boissier L, Toutain PL, Benoist H: In vitro inhibition of natural-killer-mediated lysis by chromatin fragments. *Cancer Immunol Immunother* 39: 185-192 1994.
314. Lebrun JJ, Ali S, Giffin V, Ullrich A, Kelly PA: A single phosphotyrosine residue of prolactin receptor is responsible for activation of gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4031-4035 1995.
315. Lemaire S, Rogers S, Dumont M, Shukla VK, Lapierre C, Prasad J, Lemaire I: Histogranin, a modified histone H4 fragment endowed with N-methyl-D-aspartate antagonist and immunostimulatory activities. *Life Sci* 56: 1233-1241 1995.
316. Leonhardt S, Arias P, Felder C, Moguilevski J, Wuttke W, Jarry H: Pituitary adenylate cyclase activating polipeptide (PACAP) stimulates LH release by a direct action in the pituitary without affecting hypothalamic GnRH release. *Neuroendocrin Lett* 17: 13-19 1995.
317. Lesnikov VA and Pierpaoli W: Pineal cross-transplantation (old-to-young and vice versa) as evidence for an endogenous "ageing clock". *Ann NY Acad Sci* 31: 456-460 1994.
318. Lesnikov VA, Korneva EA, Dall'ara A, Pierpaoli W: The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and ageing II. Thyrotropin-releasing hormone and melatonin forestall involution and promote reconstitution of the thymus in anterior hypothalamic area (AHA)-lesioned mice. *Int J Neurosci* 62: 141-153 1992.

319. Levinovitz A, Jennische E, Oldfors A, Edwall D, Norstedt G: Activation of insulin-like growth factor II expression during skeletal muscle regeneration in the rat: Correlation with myotube formation. *Mol Endocrinol* 6: 1227-1234 1992.
320. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB: Telomere end-replication problem and cell ageing. *J Mol Biol* 225: 951-957 1992.
321. Lewis UJ, Singh RPN, Lewis LJ, Seavey BK, Sinha YN: Glycosylated ovine prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 385-390 1984.
322. Li CH, Liu WK, Dixon JS: Human pituitary growth hormone. VI. *Arch Biochem Biophys Suppl* 1: 327-332 1962.
323. Li CH: Anterior pituitary hormones. *Postgrad Med* 29: 13-23 1961.
324. Li CH: Comparative chemistry of pituitary lactogenic hormones. *Gen Comp Endocr* 2: 1-6 1969.
325. Lindström P and Sävendahl L: Effects of galanin on growth hormone release in isolated cultured rat somatotrophs. *Acta Endocrinologica* 129: 268-272 1993.
326. Lingappa VR, Devillers-Thierry A, Blobel G: Nascent pre-hormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2432-2437 1977.
327. Liu TC and Jackson GL: Long term superfusion of rat pituitary cells: effect of repeated pulses of gonadotropin-releasing hormone at different doses, duration and frequencies. *Endocrinology* 115: 605-613 1984.
328. Lockett MF and Nail B: A comparative study of the renal actions of growth and lactogenic hormones in rats. *J Physiol* 180: 147-156 1965.
329. Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Daenell J: *Molecular cell Biology*. 307-364 1995 Scientific American Books Inc, NY.
330. Logan A and Weatherhead B: Photoperiodic dependence of seasonal variations in melanocyte-stimulating hormone content of the pituitary gland in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Endocrinol* 83: 167-168 1979.
331. Lorenson MY, Patel T, Liu JW walker AM: Prolactin is a zinc-binding protein. I. Zinc interactions with monomeric PRL and divalent cation protection of intragranular PRL cysteine thiols. *Endocrinology* 137:809-816 1996.
332. Louters LL, Henriksen EJ, Tipton CM: Histone H4 stimulates glucose transport activity in rat skeletal muscle. *Biochem J* 295: 549-553 1993.
333. Low TLK and Goldstein AL: Thymosin beta-4. *Meth Enzymol* 116: 248-255 1985.
334. Lowry OH, Rosenbrough HJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275 1951.
335. Lowry PJ, Hope J, Silman RE: The evolution of corticotrophin, melanotrophin and lipotrophin. *Excerta Medica* 1: 18-24 1976.

336. Lu JKH, Damossa DH, Gilman DP, Judd HL, Sawyer CH: Differential patterns of gonadotropin responses to ovarian steroids and to LH releasing hormone between constant estrus and pseudopregnant state in ageing rats. *Biol Reprod* 23: 345-351 1980.
337. Lu JKH, Hooper BR, Vargo TM, Yen SSC: Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in ageing female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod* 21: 193-203 1979.
338. Lu JKH: Changes in ovarian secretion and gonadotropin and prolactin secretion in ageing female rats. In: Meites J ed. *Neuroendocrinology of Ageing* 103-122 1983 Plenum, NY.
339. Lu KH, Hooper BR, Vargo TM, Yen SSC: Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in ageing female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod* 21: 193-203 1979.
340. Lundeberg S, Belfrage M, Wernerman J, von der Decken A, Thunell S, Vinnars E: Growth hormone improves muscle protein metabolism and whole body nitrogen economy in man during hyponitrogenous diet. *Metabolism* 40: 315-322 1991.
341. Lynch BJ, Muqit MN, Walker TR, Chilvers ER: [³H]inositol polyphosphate in muscarinic cholinergic-stimulated airways smooth muscle: accumulation of [³H] inositol 4,5 bisphosphate via a lithium-sensitive inositol polyphosphate 1-phosphatase. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 974-982 1997.
342. Lyson K and McCann SM: Alpha-melanocyte-stimulating hormone abolishes IL-1 induced and IL-6 induced corticotrophin-releasing factor release from the hypothalamus in vitro. *Neuroendocrinology* 58: 191-195 1993.
343. Macfarland LA and Mann DR: The inhibitory effects of ACTH and adrenalectomy on reproductive maturation in female rats. *Biol Reprod* 16: 306-314 1977.
344. Magner JA, Kane J, Chou ET: Intravenous thyrotropin (TSH)-releasing hormone releases human TSH that is structurally different from basal TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 1306-1311 1992.
345. Mallampati RS and Johnson DC: Gonadotropins in female rats androgenized by various treatments: Prolactin as an index to hypothalamic damage. *Neuroendocrinology* 15: 255-266 1974.
346. Manolagas S and Jilka R: Bone marrow, cytokines and bone remodelling. *N Engl J Med* 332: 305-311 1995.
347. Marcus R, Holloway L, Butterfield G: Clinical uses of growth hormone in older people. *J Reprod Fertil* 46: 115-118 1993.
348. Margolin Y, Aten RF, Behrman HR: Hormone-binding inhibitor protein/histone H2A on ovarian cells. *Biol Reprod* 46: 1021-1026 1992.
349. Martin CR : *Endocrine Physiology*. 1985. Ed : Oxford University Press : Oxford.

350. Maruyama O, Kato T, Wakabayashi K, Kato Y: Amino acids in the amino terminal region of the rat prolactin contribute to PRL-receptor binding and NB2 cell proliferation activity. *Biochem Biophys Res Comm* 205: 312-319 1994.
351. Matsuda M, Mori T, Park MK, Kawashima S: Modification of pancreatic digestive function by pituitary grafting in mice. *Eur J Endocrinol* 133: 221-226 1995.
352. Matsumoto H, Koyama C, Sawada T, Koike K, Hirota K, Miyake A, Arimura A, Inoue K: Pituitary follicle stellate cell responds to novel hypophysiotropic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3',5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation. *Endocrinology* 133: 2150-2155 1993.
353. Matta SG, Weatherbee J, Sharp BM: A central mechanisms is involved in the secretion of ACTH in response to IL-6 in rats: comparison to an interaction with IL-1 β . *Neuroendocrinology* 56: 516-525 1992.
354. Matzuk MM and Boime I: Site-specific mutagenesis defines the intracellular role of the asparagine-linked oligosaccharides of chronic gonadotropin beta subunit. *J Biol Chem* 263: 17106-17111 1988.
355. Matzuk MM, Keene JL, Boime I: Site-specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction. *J Biol Chem* 264: 2409-2414 1989.
356. Mau SE, Saemark T, Vilhardt H: Cross-talk between cellular signalling pathways activated by substance P and vasoactive intestinal peptide in rat lactotroph-enriched pituitary cell cultures. *Endocrinology* 138: 1704-1711 1997.
357. Mc Cann SM, Karanth S, Karmat A, Lysan K, Gimeno M, Rettory V: Induction by cytokines of the pattern of pituitary hormone secretion in infection. *Neuroimmunomodulation* 1: 2-13 1994.
358. Mc Comb DJ, Kovacs K, Beri J, Zak F: Pituitary adenomas in old Sprague-Dawley rats: A histologic, ultrastructural and immunocytochemical study. *J Natl Cancer Inst* 75: 1143-1166 1984.
359. McCroskey MC, Palazuk BJ, Pierce-Ramsey PA, Colca JR, Pearson JD: Insulin-like effects of histones H3 and H4 on isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Acta* 1011: 212-219 1989.
360. McGillis JP, Hall NR, Goldstein AL: Thymosin fraction five stimulates secretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) from cultured rat pituitaries. *Life Sci* 42: 2259-2268 1988.
361. McGillis JP, Hall NR, Vahouny GV, Goldstein AL: Thymosin fraction 5 causes increased serum corticosterone in rodents in vivo. *J Immunol* 134: 3952-3955 1985.

362. McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, Kretser DM, Roberston DM: The endocrine regulation of spermatogenesis : independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol* 148 : 1-9 1996.
363. Meduri G, Vu Hai MT, Jolivet A, Takemori S, Kominami S, Driancourt MA, Milgrom E: Comparison of cellular distribution of LH receptors and steroidogenic enzymes in the porcine ovary. *J Endocrinol* 148: 435-446 1996.
364. Meites J, Goya RG, Takahashi S: Why the neuroendocrine system is important in ageing processes. *Exp Gerontol* 22: 1-5 1987.
365. Meites J: Relation of prolactin to development in spontaneous mammary and pituitary tumours. In: Meites J ed. The prostatic cell: Structure and function part B. 1-8 1981 Liss RA, NY.
366. Mellgren RL and Schlender KK: Histone H1-stimulated phosphorylase phosphatase from rabbit skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Comm* 117: 501-508 1983.
367. Mendelson WB, Slater S, Gold P, Gillin CJ: The effect of growth hormone administration on human sleep: a dose-response study. *Biol Psychiatry* 15: 613-618 1980.
368. Mikuma N, Kumamoto Y, Maruta H, Nitta T: Role of the hypothalamic opioidergic system in the control of gonadotropin secretion in elderly men. *Andrologia* 26: 39-45 1994.
369. Miller GK, Naeve GS, Gaffar SA, Epstein AL: Immunologic and biochemical analysis of TNT-1 and TNT-2 monoclonal antibody binding to histones. *Hybridoma* 12: 689-698 1993.
370. Miller T, Beausang LA, Meneghini M, Lidgard G: Death-induced changes to the nuclear matrix: the use of anti-nuclear matrix antibodies to study agents of apoptosis. *BioTechniques* 15: 1042-1047 1993.
371. Miller-Patrick K, Vincent DL, Early RJ, Weems YS, Tanaka Y, Ashimine DT, Nusser KD, Lee CN, Ledgerwood KS, Weems CW: Effects of the purine biosynthesis pathway inhibitors azaserine, hadacin, and mycophenolic acid on the developing ovine corpus luteum. *Chin J Physiol* 36: 245-252 1993.
372. Mitra I: A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary. I. Biosynthesis, characterisation and regulatory control. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 1750-1759 1980.
373. Miura Y, Perkel VS, Papenberg KA, Johnson MJ, Magner JA : Concanavalin-A, lentil, and ricin lectin affinity binding characteristics of human thyrotropin differences in the sialylation of thyrotropin in sera of euthyroid, primary, and central hypothyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 985-995 1989.
374. Mocchegiani E, Bulian D, Santarelli L, Tibaldi A, Muzzioli M, Pierpaoli W, Fabris N: The immuno-reconstituting effect of melatonin or pineal grafting and its relation to zinc pool in ageing mice. *J Neuroimmunol* 53: 189-201 1994.

375. Moller J, Jorgensen JOL, Moller N, Hansen KW, Pedersen EB, Christiansen JS: Expansion of extracellular volume and suppression of atrial natriuretic peptide after growth hormone administration in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 768-772 1991).
376. Monier JC, Dardenne M, Pléau JM: Characterisation of facteur thymique sérique (FTS) in the thymus. I. Fixation of anti-FTS antibodies on thymic reticuloepithelial cells. *Clin Exp Immunol* 42: 470-476 1980.
377. Mooradian AD: Mechanisms of age-related endocrine alterations. Part I^a. *Drugs & Aging* 3: 81-97 1993a.
378. Mooradian AD: Mechanisms of age-related endocrine alterations. Part II^a. *Drugs & Aging* 3: 131-146 1993b.
379. Moore DD, Walker MD, Diamond DJ: Structure, expression, and evolution of growth hormone genes. *Recent Prog Horm Res* 38: 197-225 1982.
380. Morimoto S, Komatsu S, Takahashi R, Matsuo M, Goto S: Age-related changes in the amount of ubiquitinated histones in the mouse brain. *Arch Gerontol geriatr* 16: 217-224 1993.
381. Mukhopadhyay AK, Temmen N, Willey KP, Leidenberger FA: Histones inhibit human chorionic gonadotrophin-stimulated but not atrial peptide-stimulated testosterone production and cyclic nucleotide formation by isolated mouse leydig cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 37: 623-629 1990.
382. Mullaart E, Lohman PH, Berends F, Vijg J: DNA damage metabolism and ageing. *Mutation Res* 237: 189-198 1990.
383. Müller EE and Nistico G : Brain messengers and the pituitary. 1989 Ed : Academic Press NY.
384. Murphy WJ, Rui H, Longo DL: Effects of growth hormone and prolactin immune development and function. *Life Sci* 57: 1-14 1995.
385. Nagata S and Goldstein P: The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456 1995.
386. Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K: S100 protein in folliculoestellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res* 191:523-531 1980.
387. Nakane PK: Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem* 18:9-29 1970.
388. Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang ACY, Cohen SN, Numa S: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotrophin- β -lipotropin precursor. *Nature* 279: 423-427 1979.
389. Nathanson JA and Greengard P : 'Second messengers' in the brain. *Scientific American* 237: 108-119 1977.
390. Nathanson JA : Cyclic nucleotides and nervous system function. *Physiol Rev* 57: 157-256 1977.
391. Navarra P, Tsagarakis S, Faria MS, Rees LH, Besser GM, Grossman AB: Interleukin-1 and -6 stimulate the release of corticotrophin-releasing hormone-41

- from hypothalamus in vitro via the eicosanoid cyclooxygenase pathway. *Endocrinology* 128: 37-44 1991.
392. Naylor PH and Goldstein AL: Thymosin: Cyclic nucleotides and T cell differentiation. *Life Sci* 25: 301-310 1979.
393. Naylor PH, Sheppard H, Thurman GB, Goldstein AL: Increased of cyclic GMP induced in murine lymphocytes by thymosin fraction five. *Biochem Biophys Res Com* 73: 843-849 1976.
394. Naylor PH, Thurman GB, Goldstein AL: Effect of calcium on the cyclic GMP elevation induced by thymosin fraction five. *Biochem Biophys Res Com* 90: 810-818 1979.
395. Negro-Vilar A, Krulich L, McCann SM: Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat. *Endocrinology* 93: 660-664 1973.
396. Nelson JF, Felicio LS, Osterburg HH, Finch CE: Altered profiles of estradiol and progesterone associated with prolonged estrus cycles and persistent vaginal cornification in ageing C57BL/6J mice. *Biol Reprod* 24: 784-794 1981.
397. Nelson JF, Felicio LS, Sinha YN, Finch CE: An ovarian role in the spontaneous pituitary tumorigenesis. *Gerontologist* 20: 171 (abstr.) 1980.
398. Nicoll CS: Physiological actions of prolactin. In: Greep RO, Astwood EB (eds). *Handbook of Physiology* 253-292 Williams and Wilkins, Baltimore 1974.
399. Nikitovitch-Winer MB, Atkin J, Maley BE: Colocalization of prolactin and growth hormone within specific adenohypophyseal cells in male, female, and lactating female rats. *Endocrinology* 121: 625-630 1987.
400. Nishikawa S, Moore RC, Nonomura N, Oka T: Progesterone and EGF inhibit mouse mammary gland prolactin receptor and β -casein gene expression. *Am J Physiol* 36: C1467-C1472 1994.
401. Nistico G and De Sarro G: Is interleukin 2 a neuromodulator in the brain ? *Trends Neurosci* 14: 146-150 1991.
402. Nogami H: Fine-structural heterogeneity and morphologic changes in rat pituitary prolactin cells after estrogen and testosterone treatment. *Cell Tissue Research* 263: 405-412 1984.
403. Nouët JC, Kujas M: Variations of mitotic activity in the adenohypophysis of male rats during a 24-hour cycle. *Cell Tissue Research* 164:193-200 1975.
404. Oetting WS and Walker AM: Differential isoform distribution between stored and secreted prolactin. *Endocrinology* 119: 1377-1381 1986.
405. Oetting WS, Tuazon PT, Traugh JA, Walker AM: Phosphorylation of prolactin. *J Biol Chem* 261: 1649-1654 1986.
406. Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fujii T, Morii S: Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrus cycle and circadian change. *Anat Rec* 235: 111-120 1993.

407. Okamoto M, Morishita M, Setoguchi C, Nakata K: Restorative effect of short term administration of thymulin on thymus-dependent antibody production in restraint-stressed mice. *Int J Immunopharmac* 15: 757-762 1993.
408. Ortmann O, Bakhit M, Bloh P, Schulz KD, Emons G: Ovarian steroids modulate gonadotropin-releasing hormone-induced biphasic luteinizing hormone responses and inositol phosphate accumulation in rat anterior pituitary cells and alpha T3-1 gonadotrophs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 54: 101-109 1995.
409. Osamura RY, Komatsu N, Izumi S, Yoshimura S, Murakoshi M, Watanabe K: Pre-embedding immunoelectron microscopy by peroxidase-labeled antibody method. Applications to endocrinology. *Acta Histochem Cytochem* 14: 383-390 1981.
410. Ouhtit A, Morel G, Kelly PA: Visualisation of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat reproductive tissues. *Biol Reprod* 49: 528-536 1993.
411. Page RB, Boyd JE, Mulrow PJ: The effect of alpha-melanocyte stimulating hormone on aldosterone production in the rat. *Endocrine Res Comm* 1: 53-62 1974.
412. Palmore WP and Mulrow PJ: Control of aldosterone secretion by the pituitary gland. *Science* 158: 1482-1484 1967.
413. Papkoff H, Li CH, Liu WK: The isolation and characterisation of growth hormone from porcine pituitaries. *Arch Biochem Biophys Suppl* 92: 216-225 1962.
414. Park SK, Strouse DA, Selmanoff M: Prolactin- and testosterone-induced inhibition of LH secretion after orchidectomy: role of catecholaminergic neurones terminating in the diagonal band of Broca, medial preoptic nucleus and median eminence. *J Endocrinol* 148: 291-301 1996.
415. Parker DC, Rossman LG, Pekary AE : Effect of 64-hour sleep deprivation on the circadian waveform of thyrotropin (TSH) : further evidence of sleep-related inhibition of TSH release. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 157-161 1987.
416. Peaker M, Jones CDR, Goode JA, Linzell JL: Changes in milk composition during lactation in the guinea-pig, and the effect of prolactin. *J endocrinol* 67: 307-308 1975.
417. Pekary AE, Hershman JM, Sugawara M, Gieschen KI, Sogol PB, Reed AW, Pardridge WM, Walfish PG: Preferential release of triiodothyronine: an intra-thyroideal adaptation to reduced serum thyroxine in ageing rats. *J Gerontol* 38: 653-659 1983.
418. Perry RA, Tangalakis K, Wintour EM: Cytological maturity of zone fasciculata cells in the foetal sheep adrenal following ACTH infusion: an electron microscope study. *Acta Endocrinol* 127: 536-541 1992.

419. Phifer RF, Midgley AR, Spicer SS: Immunohistologic and histologic evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone are present in the same cell type in the human *pars distalis*. *J Clin Endocrin Metab* 36: 125-141 1973.
420. Piantanelli L, Basso A, Fabris N: Thymus-dependent reversibility of physiological and isoproterenol evoked age-related parameters in athymic and old normal mice. *Mech Age Dev* 7: 171-182 1978.
421. Pierce JG, Parsons TF: Glycoprotein hormones: Structure and function. *Annu Rev Biochem* 50: 465-495 1981.
422. Pieri C, Giuli C, Del Moro M, Piantanelli L: Electron microscopic morphometric analysis of mouse liver. II. Effect of ageing and thymus transplantation in old animals. *Mech Age Devel* 13: 275-283 1980.
423. Pierpaoli W and Regelson W: Pineal control of ageing: effect of melatonin and pineal grafting on ageing mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 18: 787-791 1994.
424. Pierpaoli W and Sorkin E: Relationship between thymus and hypophysis. *Nature* 215: 834-837 1967.
425. Pisarev MA : Regulación Tiroidea. En : Calandra RS y de Nicola AF eds, *Endocrinología Molecular* 128-136 1985. Ed : El Ateneo.
426. Plata-Salaman CR: Immunoregulators in the nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 15: 185-215 1991.
427. Pléau JM, Dardenne M, Blouquit Y, Bach JF: Structural study of circulating thymic factor: a peptide isolated from pig serum. II. Amino acid sequence. *J Biol Chem* 252: 8045-8047 1977.
428. Pléau JM, Fuentes V, Morgat JL, Bach JF: Specific receptors for the serum thymic factor (FTS) in lymphoblastoid cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2861-2865 1980.
429. Pléau JM, Pasques D, Bach JF: Dosage immunologique du facteur thymique sérique (FTS). *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine* 2: 505-510 1978.
430. Podestá EJ, Milani A, Steffen H, Neher R: Adrenocorticotropin (ACTH) induces phosphorylation of a cytoplasmic protein in intact isolated adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5187-5193 1979.
431. Ponnappan U, Dubiski S, Cinader B: Effect of treatment with anti-CD4 on antibody response as a function of advancing age in C57BL/6 and SJL mice. *Aging: Immunology and Infectious Disease* 3: 91-100 1992.
432. Prepin J, Levigouroux P, Dadoune JP: Effects of thymulin on in-vitro incorporation of H-3 thymidine into gonocytes of newborn rat testes. *Reprod Nutr Dev* 34: 289-294 1994.
433. Quesnel H and Prunier A: Endocrine bases of lactational anoestrus in the sow. *Reprod Nutr Dev* 35: 395-414 1995.

434. Quik M, Cook RG, Revah F, Changeux JP, Patrick J: Presence of alpha-cobratoxin and phospholipase A2 activity in thymopoietin preparations. *Molec Pharmacol* 44: 678-680 1993.
435. Racagni G, Apud JA, Cocchi D, Locatelli V, Muller EE : GABAergic control of anterior pituitary hormone secretion. *Life Sci* 31: 823-838 1982.
436. Radulescu RT and Wendtner CM: Hormone and growth factor subunits: a novel perception of cell growth and regulation. *J Endocrinol* 139: 1-7 1993.
437. Ramachandran J, Farmer SW, Liles S, Li CH: Comparison of the steroidogenic and melanotropic activities of corticotrophin, α -melanotropin and analogues with their lipolytic activities in rat and rabbit adipocytes. *Biochem Biophys Acta* 428: 347-354 1976.
438. Ramachandran J: Structural and functional interrelationships of adrenocorticotropin and the melatropins. *Isr J Chem* 12: 675-580 1974.
439. Randerath K, Li D, Nath R, Randerath E: Exogenous and endogenous DNA modifications and monitored big ^{32}P -postlabelling: relationships to cancer and ageing. *Exp Gerontol* 27: 533-537 1992.
440. Rao Y, Olson MD, Buckley DJ, Buckley AR: Nuclear co-localization of prolactin and the prolactin receptor in rat Nb₂ node lymphoma cells. *Endocrinology* 133: 3062-3065 1993.
441. Rasmussen H : The cycling calcium as intracellular messenger. *Scientific American* 261: 66-73 1989.
442. Reap EA, Sobel ES, Cohen PL, Eisenberg RA: Conventional B cells, not B-1 cells, are responsible for producing autoantibodies in lpr mice. *J Exp Med* 177: 69-78 1993.
443. Rebar RW, Miyake A, Low TLK, Goldstein AL: Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 214: 669-671 1981.
444. Reber PM: Prolactin and immunomodulation. *Am J Med* 95: 637-644 1993.
445. Reichhart R, Jornvall H, Carlquist M, Zeppezauer M: The primary structure of two polypeptide chains from preparations of homeostatic thymus hormone (HTH-alpha and HTH-beta). *FEBS Lett* 188: 63-67 1985a.
446. Reichhart R, Zeppezauer M, Jornvall H: Preparations of homeostatic thymus hormone consist predominantly of histones 2A and 2B and suggest additional histone functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4871-4875 1985b.
447. Reiter E, Lardinois S, Klug M, Sente B, Hennuy B, Bruyninx M, Closset J, Hennen G: Androgen-independent effects of prolactin on the different lobes of the immature rat prostate. *Mol Cell Endocrinol* 112: 113-122 1995.
448. Roberston DM, Foulds LM, Ellis E: Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing; differences between sexes and after castration. *Endocrinology* 111: 385-391 1982.

449. Rommerts FFG and Cooke BA: The mechanisms of action of luteinizing hormone II. Transducing systems and biological effects. In: Cooke BA, King RJB, van der Molen HJ (eds.). *Hormones and their actions. Part II* 163-180 Elsevier, Amsterdam 1988.
450. Rondeel JMM and Jackson IMD: Molecular biology of the regulation of hypothalamic hormones. *J Endocrinol Invest* 16: 219-246 1993.
451. Rothwell NJ: Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci* 12: 430-436 1991.
452. Russel JA: Effects of growth hormone on protein and carbohydrate metabolism. *Am J Clin Nutr* 5: 404-409 1957.
453. Russel JA: Hormonal control of glycogen in the heart and other tissues in rats. *Endocrinology* 58: 83-87 1956.
454. Sabharwal P, Varma S, Malarkey WB: Human thymocytes secrete luteinizing hormone: an autocrine regulator of T-cell proliferation. *Biochem Biophys Res Comm* 187: 1187-1192 1992.
455. Safieh B, Kendall MD, Norman JC, Metreau E, Dardenne M, Bach JF, Pléau JM: A new radioimmunoassay for the thymic peptide thymulin, and its application for measuring thymulin in blood samples. *J Immunol Meth* 127: 255-262 1990.
456. Safieh B, Venn GE, Ritter M, Singh S, Buckingham JC, Kendall MD: Plasma thymulin concentrations in cardiac patients: involvement with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Physiol* 438: 50-61 1991.
457. Safieh B, Jalakhian RH, Saade NE, Haddad JJ, Jabbur SJ, Kanaan SA: Thymulin reduces hyperalgesia induced by peripheral endotoxin injection in rats and mice. *Brain Research* 717: 179-183 1996.
458. Sairman MR: Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J* 3: 1915-1926 1989.
459. Sakuma S, Shirasawa N, Yoshimura F: A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adeno-hypophysial cells in immature and mature castrated rats. *J Endocrinol* 100: 323-328 1984.
460. Saland LC, Samora A, Sanchez P, Chavez G: Immunocytochemical studies of tryptophan hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and serotonin innervation in the ageing rat neurointermediate pituitary. *Exp Neurol* 121: 119-126 1993.
461. Saland LC, Wallace JA, Reyes E, Samora A, Maez D, Comunas F: Effects of the serotonin-uptake inhibitor, fluoxetine, on immunoreactive serotonin innervation in the rat pituitary gland. *Brain Res Bull* 19: 261-267 1987.
462. Saland LC, Wallace JA, Samora A, Gutierrez L: Co-localization of tyrosine hydroxylase (TH)- and serotonin (5-HT)-immunoreactive innervation in the rat pituitary gland. *Neurosci Lett* 94: 39-45 1988.

463. Salomon F, Cuneo RC, Hesp R, Sonksen PH: The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *N Engl J Med* 321: 1793-1803 1989.
464. Sapolsky RM: Stres. In: Sapolski RM ed. The ageing brain, and mechanisms of neurone death 1992 Ed MIT Press, Cambridge, MA.
465. Sara VR and Hall K: Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70: 591-614 1990.
466. Sardanons ML, Solano AR, Podestá EJ: Gonadotropin-releasing hormone action upon luteinizing hormone bioactivity in pituitary gland: Role of sulfation. *J Biol Chem* 262: 11149-11155 1987.
467. Sassin JF, Parker DC, Mace JW, Gotlin RW, Johnson LC, Rossman LG: Human growth hormone release: Relation to slow-wave sleep and sleep-waking cycles. *Science* 165: 513-515 1969.
468. Sato S: Postnatal development, sexual difference and sexual cyclic variation of prolactin cells in rats: special reference to the topographic affinity to a gonadotroph. *Endocrinol Jpn* 27: 573-583 1980.
469. Saunders A, Terry LC, Audet J, Brazeau P, Martin JB: Dynamic studies of growth hormone and prolactin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology* 21: 193-203 1976.
470. Savino W and Dardenne M: Thymic hormone-containing cells. VI. Immunohistologic evidence for simultaneous presence of thymulin, thymopoietin and thymosin α_1 in normal and pathological human thymuses. *Eur J Immunol* 14: 987-991 1984.
471. Savino W, Ban E, Dardenne M: Modulation of thymic endocrine function, cytokeratin expression and cell proliferation, by hormones and neuropeptides. *Intern J Neuroscience* 51: 201-204 1990.
472. Savino W, Bartoccioni E, Homo-Delarch F, Gagnerault MC, Itoh T, Dardenne M: Thymic hormone containing cells. IX. Steroids in vitro modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells. *J Steroid Biochem* 30: 479-484 1988.
473. Savino W, Dardenne M, Bach JF: Thymic hormones containing cells. II. Evolution of cells containing the serum thymic factor (FTS or thymulin) in normal and autoimmune mice, as revealed by anti-FTS monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 52: 1-6 1983a.
474. Savino W, Dardenne M, Bach JF: Thymic hormones containing cells. III. Evidence for a feed-back regulation of the secretion of the serum thymic factor (FTS) by thymic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 52: 7-11 1983b.
475. Savino W, Dardenne M, Papiernik M, Bach JF: Thymic hormone-containing cells. Characterisation and localisation of serum thymic factor in young mouse thymus studied by monoclonal antibodies. *J Exp Med* 156: 628-634 1982.

- 476.Savino W, Gagnerault MC, Bach JF, Dardenne M: Neuroendocrine control of thymic hormonal production. II. Stimulatory effects of endogenous opioids on thymulin production by cultured human and murine thymic epithelial cells. *Life Sci* 46: 1687-1697 1990a.
- 477.Savino W, Wolf B, Aratan SS, Dardenne M: Thymic hormone containing cells. IV. Fluctuations in the thyroid hormone levels *in vivo* can modulate the secretion of thymulin by epithelial cells of young mouse thymus. *Clin Exp Immunol* 55: 629-635 1984.
- 478.Schane FAX, Kane AB, Young EE, Farber JL: Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206: 700-702 1979.
- 479.Schechter JE, Pattison A, Pattison T: Development of the vasculature of the anterior pituitary-Ontogeny of basic fibroblast growth factor. *Developmental Dynamics* 197: 81-93 1993.
- 480.Schiavi RC, White D, Mandeli J: Pituitary-gonadal function during sleep in healthy aging men. *Psychoneuroendocrinology* 17: 599-609 1992.
- 481.Schoenle E, Zads J, Humble RE: Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature* 296: 252-253 1982.
- 482.Schultz E, Jaryszak DL and Valliere CR: Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* 8: 217-222 1985.
- 483.Schumacher M, Schäfer G, Lichtenberg V, Hilz H: Maximal steroidogenic capacity of mouse Leydig cells. Kinetic analysis and dependence on protein kinase activation and cAMP accumulation. *FEBS Letts* 107: 398-402 1979.
- 484.Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobé G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R: Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after renal ischemia. *Am J Pathol* 140: 831-837 1992.
- 485.Shaver JK, Tezelman S, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH, Roher HD, Gerfo PL, Rosen IB : Thyroid-stimulating hormone activates phospholipase-C in normal and neoplastic thyroid tissue. *Surgery* 114: 1064-1069 1993.
- 486.Shirasawa N, Yoshimura F: Immunohistochemical and electron microscopical studies of mitotic adenohipophysial cells in different ages of rats. *Anat Embryol (Berl.)* 165:51-61 1982.
- 487.Shiu RPC, Elsholtz HP, Tanaka T, Friesen HG, Gout PW, Beer CT, Noble RL: Receptor-mediated mitogenic action of prolactin in rat lymphoma cell line. *Endocrinology* 113: 159-165 1983.
- 488.Siddle K and Hutton JC: Peptide hormone action: A practical approach. Rickwood D and Hames BD eds. The practical approach series. 1990 Oxford University Press, UK.

- 489.Silva CM, Day RN, Weber MJ, Thorner MO: Human growth hormone (GH) receptor is characterised as the 134-kilodalton tyrosine-kinase protein activated by GH treatment in IM-9 cells. *Endocrinology* 133: 2307-2312 1993.
- 490.Sim PJ, Wolbers WB, Mitchell R: Activation of MAP kinase by LHRH receptor through a dual mechanism involving protein kinase C and pertussis toxin-sensitive G protein. *Mol Cell Endocrinol* 112: 257-263 1995).
- 491.Simpkins JW, Millard WJ, Gabriel SM, Soltis EE : Noradrenergic methods in neuroendocrinology. In : Steger RW and Johns A eds. Handbook of pharmacological methodologies for the study of the neuroendocrine system 1-63 1985 Ed : CRC Press Florida.
- 492.Sinha YN and Gillian TA: Identification of a less immunoreactive form of prolactin in the rat pituitary. *Endocrinology* 108: 1091-1096 1981.
- 493.Sinha YN and Jacobsen BP: Three growth hormone- and two prolactin-related novel peptides of Mr 13,000-18,000 identified in the anterior pituitary. *Biochem Biophys Res Commun* 156: 171-179 1988.
- 494.Small CJ, Ilovaiskaia I, Ghatei MA, Bloom SR: The role of GLP-1 in the control of the hypothalamic pituitary thyroid axis. *J Endocrinol* 148 supp: P149 1996 (abstr).
- 495.Smith EM and Blalock JE: A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine systems operates through common signals molecules (hormones) and receptors. In: Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good AR (Eds.). Enkephalin and endorphins: stress and the immune system 119-127. NY: Plenum Press 1985.
- 496.Smith MS, Freeman ME, Neill JD: The control of progesterone secretion during the estrus cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-226 1975.
- 497.Smith RE, Farquhar MG: Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J Cell Biol* 31: 319-347, 1966.
- 498.Sohal RS and Brunk UT: Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and ageing. *Adv Exp Med Biol* 266: 17-29 1989.
- 499.Soji T, Herbert DC: Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Anat Rec* 226: 523-533 1989.
- 500.Soji T, Herbert DC: Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. II. Castration effects and changes after injection of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) or testosterone. *Anat Rec* 226: 342-346 1990.
- 501.Soji T, Yashiro T, Herbert DC: Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. I. Postnatal development and changes after injection of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) or testosterone. *Anat Rec* 226: 337-341 1990.

502. Sorenson RL and Stout LE: Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: An immunohistochemical analysis. *Endocrinology* 136: 4092-4098 1995.
503. Spangelo BL, Hall NR, Dunn AJ, Goldstein AL: Thymosin fraction 5 stimulates the release of prolactin from cultured GH3 cells. *Life Sci* 40: 283-288 1987a.
504. Spangelo BL, Judd AM, Ross PC, Login IS, Jarvis WD, Badamchian M, Goldstein AL, MacLeod RM: Thymosin fraction five stimulates prolactin and growth hormone release from anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 121: 2035-2043 1987b.
505. Spiegel AM : Receptor-effector coupling by G-proteins. Implications for endocrinology. *Trends Endocrinol Metab* 2: 72-76 1989.
506. Stachura ME, Lapp CA, Tyler JM, Lee YS : Medium flow rate modulates autocrine-paracrine feedback of GH and PRL release by perfused GH3 cells. *In vitro Cell Dev Biol* 26: 482-492 1990.
507. Stefanelli C, Bonavita F, Stanic I, Farruggi G: ATP depletion inhibits glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Biochem J* 322: 909-917 1997.
508. Steger RW and Morgan W : Dopaminergic control of pituitary hormone release. In : Steger RW and Johns A eds. Handbook of pharmacologic methodologies for the study of the neuroendocrine system 173-193 1985 Ed : CRC Press Florida.
509. Steinfelder HJ, Radovick S, Mroczynski MA, Hauser P, Mc Claskey JH, Weintraub BD, Wondisford FE: Role of a pituitary-specific transcription factor (pit-1/GHF-1) or a closely related protein in cAMP regulation of thyrotropin-beta subunit gene expression. *J Clin Invest* 89: 409-419 1992.
510. Steller H: Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449 1995.
511. Stroud CM, Deaver DR, Peters JL, Loeper DC, Toth BE, Derr JA, Hymer WC: Prolactin variants in ram adenohypophyses vary with season. *Endocrinology* 130: 811-818 1992.
512. Suguwara I and Palacios R: Interleukin-2 and serum thymic factor enable the autologous rosette forming T cells to generate helper and cytotoxic function. *Scand J Immunol* 15: 233-238 1982.
513. Suh BY, Naylor PH, Goldstein AL, Rebar RW: Modulation of thymosin beta-4 by estrogen. *Am J Obstet Gynecol* 151: 544-549 1985.
514. Swislocki NI and Szego CM: Acute reduction of plasma nonesterified fatty acid by growth hormone in hypophysectomized and Houssay rats. *Endocrinology* 76: 665-670 1965.
515. Swolin D, Brantsing C, Matejka G, Ohlsson C: Cortisol decreases IGF-I mRNA levels in human osteoblast-like cells. *J Endocrinol* 149: 397-403 1996.

516. Takahashi K, Kipnis DM, Daughaday WH: Growth hormone secretion during sleep. *J Clin Invest* 47: 2079-2083 1968.
517. Takahashi S and Kawashima S: Age-related changes in Prl cells in male and female rats of the Wistar/Tw strain. *J Sci Hiroshima Univ* 31: 185-191 1983.
518. Takahashi S, Gottschall PE, Quigley KL, Goya RG, Meites J: Growth hormone secretory patterns in young, middle-aged and old female rats. *Neuroendocrinology* 46: 137-142 1987.
519. Takahashi S, Kawashima S, Seo H, Matsui N: Age-related changes in growth hormone and prolactin messenger RNA levels in the rat. *Endocrinol Jpn* 37: 827-840 1990.
520. Takahashi S, Kawashima S, Wakabayashi K: Effects of gonadectomy and chlorpromazine treatment on prolactin, LH, and FSH secretion in young and old rats of both sexes. *Exp Gerontol* 15: 185-194 1980.
521. Takahashi S, Kawashima S, Wakabayashi K: Effects of chlorpromazine and estradiol benzoate on prolactin secretion in gonadectomized male and female rats. *Endocrinol Jpn* 26: 419-422 1979.
522. Takahashi S, Kawashima S, Wakabayashi K: Serum and pituitary levels of prolactin and the responsiveness to pimozide on prolactin release in monosodium glutamate-treated rats. *J Sci Hiroshima Univ* 30: 221-228 1982.
523. Takahashi S, Miyatake M: Immuno-electron microscopical study of prolactin cells in the rat: postnatal development and effects of oestrogen and bromocryptine. *Zool Sci* 8: 549-589 1991.
524. Takahashi S: Heterogeneity and development of somatotrophs and mammothrophs in the rat. *Zool Sci* 9: 901-924 1992.
525. Tanaka K, Nicholson WE, Orth DN: Diurnal rhythm and disappearance half-time of endogenous plasma immunoreactive β -MSH (LPH) and ACTH in man. *J Clin Endocrinol Metab* 46: 883-890 1978.
526. Tannenbaum GS and Martin JB: Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 98: 562-568 1976.
527. Tasaka K, Kasahara K, Masumoto N, Mizuki J, Fukami K, Miyake A, Nakamura T, Sugino H: Characterization of activin A-, activin AB- and activin B-responding cells by their responses to hypothalamic releasing hormones. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 1739-1744 1994.
528. Taylor CW : The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochem J* 272: 185-197 1990.
529. Tena-Sempere M, Pinilla L, Aguilar E: In vitro pituitary GH secretion after GHRH, forskolin, dibutyryl cyclic-adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol 12-myristate 13-acetate stimulation in long-term orchidectomized rats. *J Mol Endocrinol* 16: 81-88 1996.

530. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462 1995.
531. Thurman GB, Low TLK, Rossio JL, Goldstein AL: Thymic hormones: their potential utilization in cancer therapeutics. In: Goldstein AL and Chirigas MA eds. *Lymphokines* 145-157 1981 ed. Raven Press, NY.
532. Tilders FJH, Vander Woude JA, Swaab DE, Mulder AH: Identification of MSH-release-inhibiting elements in the neurointermediate lobe of the rat. *Brain Res* 71: 425-435 1979.
533. Timsit J, Safieh B, Gagnerault MC, Savino W, Lubetzki J, Bach JF, Dardenne M: Augmentation des taux circulants de thymuline au cours de l'hyperprolactinémie et de l'acromégalie. *C R Acad Sci Paris* 310: 7-13 1990.
534. Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault MC, Bach JF, Dardenne M: Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 183-189 1992.
535. Tixier-Vidal A, Tougard C, Jutisz M: Light and electron microscopic studies on immunocytochemical localisation of gonadotropic hormones in the rat pituitary gland with antisera against ovine FSH, LH, LH α , and LH β . *Ann NY Acad Sci* 254: 433-461 1975.
536. Tollefsen SE, Sadow JL, Rotwein P: Coordinate expression of insulin-like growth factor II and its receptor during muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1543-1547 1989.
537. Tomei LD and Cope FO: Apoptosis II: the molecular basis of apoptosis in disease. In: Inglis J and Witkowski JA eds. *Current Communications In Cell & Molecular Biology* 430 pp 1994 Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
538. Tonetta SA and DiZerega GS: Intra-gonadal regulation of follicular maturation. *Endocr Rev* 10: 205-229 1989.
539. Tordera V, Sendra R, Pérez-Ortín JE: The role of histones and their modifications in the informative content of chromatin. *Experientia* 49: 780-788 1993.
540. Toretsky JA and Helman LJ: Involvement of IGF-II in human cancer. *J Endocrinol* 149: 367-372 1996.
541. Tourkine N, Schindler C, Larose M, Houdebine LM: Activation of STAT factors by prolactin, interferon-gamma, growth hormones, and a tyrosine phosphatase inhibitor in rabbit primary mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 270: 20952-20961 1995.
542. Trainin N and Small M: Studies on some physicochemical properties of a thymus humoral factor conferring immunocompetence on lymphoid cells. *J Exp Med* 132: 885-889 1970.

543. Trainin N, Rotter V, Yakir Y, Leve R, Handzel Z, Shahat B, Zaizov R: Biochemical and biological properties of THF in animal and human models. *Ann NY Acad Sci* 332: 9-22 1979.
544. Trainin N: Therapeutic prospects of THF- a thymic hormone- in autoimmune processes. *Isr J Med Sci* 24: 739-740 1988.
545. Trump BF, Berezsky IK, Sato T, Laiho KU, Phelps PC, De Claris N: Cell calcium, cell injury and cell death. *Environ Health Perspect* 57: 281-287 1984.
546. Tsitsiloni OE, Yialouris PP, Echner H, Voelter W, Haritos AA: Evidence for the extranuclear localisation of thymosins in thymus. *Experientia* 48: 398-402 1992.
547. Turner CD, Bagnara JT: General Endocrinology, chap 3: 74-135. W.B. Saunders Co., USA. 5th Ed., 1971.
548. Ullman M, Alameddine H, Skottner A, Oldfors A: Effects of growth hormone on skeletal muscle. II Studies on regeneration and denervation in adult rats. *Acta Physiol Scand* 135: 537-543 1992.
549. van Putten LJA, Wendelaar Bonga SE, van Kemenade JAM: Prolactin cells and plasma prolactin levels in the ageing male Wistar rat: an immunocytochemical and biochemical study. *Mech Ageing Dev* 45: 253-276 1988.
550. Vaughan MK, Blask DE, Johnson LY, Reiter RJ: The effect of subcutaneous injections of melatonin, arginine vasotocin, and related peptides on pituitary and plasma levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin in castrated adult male rats. *Endocrinology* 104: 212-217 1979.
551. Veldhuis JD and Johnson ML: Deconvolution analysis of hormone data. *Meth Enzymol* 210: 539-575 1992.
552. Vertongen P, Delhase M, Rajas F, Trouillas J, Hooghe-Peters E, Svoboda M, Robberecht P: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polipeptide receptor subtypes are differently expressed in rat transplanted tumours (SMtTW) and in the normal gland. *J Mol Endocrinol* 16: 239-248 1996.
553. Vijg J and Gossen JA: Somatic mutations and cellular ageing. *Comp Biochem Physiol* 104B: 429-437 1993.
554. Vila-Porcile E: Le reseau des cellules folliculo-stellaires et les follicules de l'sdenohypophyse du rat (Pars distalis): *Z. Zellforsch.* 129: 328-369 1972.
555. Viticchi C, Gentile S, Piantanelli L: Ageing and thymus-induced differential regulation of β 1 and β 2-adrenoceptors of mouse brain cortex. *Arch Gerontol Geriatr* 8: 13-20 1989.
556. Wallace DC: Mitochondrial genetics: a paradigm for ageing and degenerative diseases? *Science* 256: 628-636 1992.

557. Wang ZQ, Fung MR, Barlow DP, Wagner EF: Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *Igf2/Mpr* gene. *Nature* 372: 464-467 1994.
558. Watanabe T and Hashimoto H: Immunohistochemical studies on S-100 cells in the anterior pituitary gland of Sprague-Dawley rats and Spontaneous Dwarf rats. *Anat Embriol* 188: 493-500 1993.
559. Weems CW, Weems YS, Lee CN, Vincent DL: Purine modulation of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)-induced premature luteolysis *in vivo* in nonpregnant sheep. *Sec Mess Phosphoprot* 14: 1-9 1992.
560. Weems CW, Weems YS, Lee CN, Vincent DL: The purine adenosine amplifies the response to gonadotropins and inhibits prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) suppression of gonadotropin stimulation of bovine luteal cells *in vitro*. *Chin J Physiol* 34: 355-369 1991.
561. Weil R: Pituitary growth hormone and intermediary metabolism I. The hormonal effect on metabolism of fat and carbohydrate. *Acta Endocrinol* 98: 81-92 1965.
562. Weiss J and Jameson JL : Perfused pituitary cells as a model for studies of gonadotropin biosynthesis and secretion. *Trends Endocrinol Metab* 4: 265-270 1993.
563. Weiss L: Timo. En: Weiss L y Greep RO eds. *Histología* 451-468 1982 Ed. El Ateneo, Buenos Aires.
564. Weksler ME, Innes JB, Goldstein G: Immunological studies of ageing. IV The contribution of thymic involution to the immune deficiencies of ageing mice and reversal with thymopoietin 32-36. *J Exp Med* 148: 996-1006 1978.
565. Westlund KN and Childs GV: Localisation of serotonin fibers in the rat adenohypophysis. *Endocrinology* 111: 1761-1763 1982.
566. Wide L: Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol* 123: 519-529 1989.
567. Williams GC: Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411 1957.
568. Winkler B, Steele R, Altszuler N: Effects of growth hormone administration on free fatty acid and glycerol turnover in the normal dog. *Endocrinology* 85: 25-30 1969.
569. Wise PM: Changing neuroendocrine function during ageing: impact on diurnal and pulsatile rhythms. *Exp Gerontol* 29: 13-19 1994.
570. Wondisford FE, Radovick S, Moates JM : Isolation and characterization of human thyrotropin beta-subunit gene. Differences in gene structure and promoter function from murine species. *J Biol Chem* 263: 12538-12542 1988.

571. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556 1980.
572. Yalkut SI, Gulling EV, Gots TY, Kotova SA, Belova OB, Premyslov VC: Low molecular weight thymic factor inhibits histamine release from basophils. *Mediators of Inflammation* 2: 443-446 1993.
573. Yasumoto Y, Suga T, Wada S, Kosano H, Takishima K, Mamiya G, Kugai N, Nagata N: Purification and partial sequencing of inhibitory factor on renal membrane adenylate cyclase in pancreatic cancer extract: identity with histones H1B or H1D. *Biochem Biophys Res Comm* 176: 255-261 1991.
574. Yoshimura F, Sato S, Soji T, Yokoyama M: Development and differentiation of rat pituitary follicular cells under normal and some experimental conditions with special reference to an interpretation of renewal cell system. *Endocrinol Jpn* 24: 435-449 1977.
575. Zaidi SAA, Kendall MD, Gillham B, Jones MT: The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* 12: 253-264 1989.
576. Zanini A, Giannattasio G, Meldolesi J: Studies on in vitro synthesis and secretion of growth hormone and prolactin. II. Evidence against the existence of precursor molecules. *Endocrinology* 94: 104-109 1974.