UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

CONTROL DE SECRECIÓN DE ACTH Y α -MSH
DE LA HIPOFISIS DEL PATO

870

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL
MARIA GRACIELA CASTRO
1986

<p>(043.2) TESIS 00870</p>	<p>Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias Exactas Biblioteca 50 y 115 1° subsuelo biblioteca@exactas.unlp.edu.ar Tel 0221 422-6377/79 int. 129</p> <p>DEX-56242</p>
------------------------------------	--

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

CONTROL DE SECRECIÓN DE ACTH Y α -MSH
DE LA HIPOFISIS DEL PATO

Donación.....
Fecha 6-4-99
Inv. B.....Inv.....B. 56.242

Tesis
840

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL
MARIA GRACIELA CASTRO
1986

. A Marcelo

. A mis padres y hermanos

. A mis maestros

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas, ha sido desarrollado en el Centro de Estudios Endocrinos, Cátedra "B" de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Se realizó mientras la autora fué becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, y fué apoyada por subsidios otorgados por la mencionada Comisión, por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y por la Subsecretaría de Ciencia y Técnica al Centro de Estudios Endocrinos, Cátedra "B" de Histología y Embriología.

Una parte de los resultados expuestos ha sido publicada (1, 2), o se halla en vías de publicación (3, 4).

Es Director de esta Tesis el Prof. Dr. Fermín C. Iturriza, quien sugirió la hipófisis de pato como modelo experimental.

El Codirector de la misma es el Dr. Fernando E. Estivariz.

Mi reconocimiento:

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por las becas que oportunamente me otorgara.

A la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haber brindado los medios para la realización de este trabajo.

Mi agradecimiento:

. Al Dr. Fermín C. Iturriza, por haberme brindado la posibilidad de iniciarme en la investigación científica. Por haber dirigido el desarrollo del presente trabajo de Tesis, pero por sobre todas las cosas, por todas sus enseñanzas científicas y humanas que permitieron que me acercara a la comprensión del significado que la investigación científica debe tener para el verdadero hombre de ciencia.

. Al Dr. Fernando E. Estivariz, por haber codirigido el desarrollo del presente trabajo de Tesis. Por haberme guiado durante estos años en los que trabajé bajo su dirección en la metodología del trabajo científico, en la discusión y análisis desprovisto de prejuicios y preconceptos de los resultados experimentales, por haber sabido despertar en mí ser la alegría de crear y de conocer. Por su inapreciable amistad que tanto me hizo crecer humanamente. Por todo lo que me brindó y enseñó durante el tiempo compartido.

. A las señoras Frida W. de Bustos, Celia Fereze y Beatriz Tosti, así como a los señores Julio Clar y Rubén Paredes, por su ayuda técnica y su permanente estímulo.

. A la Sra. Mónica Carino, por haber contribuido a la realización de las figuras del presente trabajo, por su inapreciable ayuda técnica, por su permanente estímulo y por su amistad.

. A Inés Morano, por todo este tiempo de haber compartido tantas vivencias científicas y docentes, pero por sobre todas las cosas, humanas. Por esa amistad que se fue arraigando en el transcurso de nuestro tiempo y que tanto contribuyó en mi superación como ser humano.

. A Alicia Dubin, por el entrañable cariño y amistad que me une a ella, por todo lo que me brinda humanamente.

. A Lilian Vallarino, por haberme guiado en mi búsqueda interna y por lo tanto haber contribuido de manera determinante en el logro de mi felicidad.

. A Oscar, mi hermano, porque a través de sus ganas de ser mejor, de encontrar su felicidad, me da fuerzas para pensar en un futuro mejor. Por todo el cariño y las vivencias compartidas.

. A Marcelo, por compartir este tiempo de amor, lucha y esperanzas. Porque su ser me impulsa a crecer día a día.

I N D I C E

	<u>Página</u>
<u>PARTE I: INTRODUCCION</u>	
<u>CAPITULO I. CONCEPTOS GENERALES</u>	
1.- El concepto de Hormona	1
2.- El concepto de Receptor	3
3.- Transmisión de la información hormonal	4
<u>CAPITULO II: LA HIPOFISIS AVIAR.</u>	
1.- Conceptos generales introductorios.	9
2.- Anatomía de la hipófisis.	9
3.- Hormonas del lóbulo anterior:	11
a.- Gonadotrofinas (FSH; LH)	11
b.- Prolactina (Prl)	13
c.- Tirotrofina (TSH)	13
d.- Hormona de crecimiento (GH)	14
e.- Adrenocorticotrofina (ACTH)	15
f.- Hormona melanocitoestimulante (MSH)	19
4.- Hormonas del lóbulo posterior	20
<u>CAPITULO III: REGULACION DE LA ADENOHIPOFISIS</u>	
1.- Concepto de la regulación neuro-humoral de la adenohi pofisis.	25
2.- Caracterización de las hormonas hipofisiotropas en el hipotálamo.	30
3.- Localización de las hormonas hipofisiotrópicas hipota lámicas.	33
4.- Identificación de sustancias hipofisiotrópicas en los vasos porta hipotálamo-hipofisiarios.	35
5.- Interrelaciones entre la hipófisis, la eminencia media y el tercer ventrículo.	35
<u>CAPITULO IV: CONTROL DE SECRECION DE ACTH</u>	
1.- Factor liberador de corticotrofina (CRF): Status actual.	39

	<u>Página</u>
2.- Ensayos "in vivo" para determinar la actividad liberadora de corticotrofina (CRA).	40
3.- Bioensayos "in-vitro" para derminar CRA.	42
4.- Purificación, asilamiento y caracterización del CRF.	44
5.- Regulación de la secreción de ACTH en adenohipófisis.	47

CAPITULO V: REGULACION DE LA PARS INTERMEDIA

1.- Vascularización de la Pars Intermedia.	51
2.- Inervación de la pars intermedia:	
a.- Inervación catecolaminérgica.	53
b.- Inervación colinérgica.	54
c.- Inervación peptidérgica.	54
3.- Naturaleza del control hipotalámico sobre las pars intermedia.	54

CAPITULO VI: CONTROL DE SECRECION DE α -MSH

1.- Efecto de Monoaminas.	58
a.- Estudios "in vivo".	58
b.- Estudios "in vitro".	61
2.- Efecto de factores hipotalámicos liberadores (MRF) e inhibidores (MIF);	
a.- Regulación por MIF y MRF.	66
b.- Regulación por ácido tocinoico y tocinamida.	72
c.- Regulación por CRF.	72

CAPITULO VII: PROCESAMIENTO DIFERENCIAL DEL PRECURSOR PRO-OPIOMELANOCORTINA EN PARS INTERMEDIA Y PARS DISTALIS.

1.- Estructura del precursor: Pro-opiomelanocortina (POMC).	74
2.- Enzimas involucradas en el procesamiento de POMC.	78
3.- Procesamiento de POMC: Pars Distalis.	79
4.- Procesamiento de POMC: Pars Intermedia.	81

	<u>Página</u>
<u>CAPITULO VIII: OBJETIVOS.</u>	84
<u>PARTE II: MATERIALES Y METODOS</u>	
<u>CAPITULO I: MATERIALES.</u>	
1.- Equipamiento mayor.	90
2.- Equipamiento menor y materiales.	90
3.- Reactivos y Drogas.	
a.- Para los ensayos de pedazos de glándula.	91
b.- Para los ensayos de células dispersas.	92
c.- Para el dosaje de corticosterona.	92
d.- Para las iodinaciones.	92
e.- Hormonas puras para Bioensayo y Radioinmunoensayo.	93
f.- Antisueros.	94
g.- Catecolaminas y Neurofármacos.	94
h.- Para las técnicas histológicas.	95
i.- Técnica de Mallory.	95
ii.- Técnica de Aldehído-Fucsina (AF).	95
iii.- Técnicas inmunohistoquímicas.	96
i.- Para la determinación de proteínas.	96
j.- Otros.	97
k.- Anestésicos.	97
l.- Animales.	97
<u>CAPITULO II: METODOS.</u>	
1.- Bioensayo para ACTH de células dispersas de adrenal de rata.	98
a.- Preparación de células dispersas.	98
b.- Conteo de células y viabilidad.	99
c.- Preparación de las soluciones de ACTH para el Bio ensayo.	99
d.- Dosaje de la corticosterona producida por las cé- lulas adrenales.	99
2.- Bioensayo de la actividad corticoliberina (CL) y mela-	

	<u>Página</u>
noliberina (ML) en pedazos y células dispersas de adenohipófisis de pato.	100
a.- Obtención de pedazos de adenohipófisis de pato.	100
b.- Obtención de células dispersas de adenohipófisis de pato.	100
i) Dispersión celular con tripsina.	101
ii) Dispersión celular con colagenasa.	103
c.- La columna de células dispersas de adenohipófisis de pato como bioensayo para estudiar la actividad "CL" y "ML" en aves.	103
d.- Preparación de los extractos tisulares:	106
i) Extracto de Eminencia Media de Pato (EMP).	106
ii) Extracto de Corteza Cerebral de Pato (CCP)	106
iii) Extracto de Neurohipófisis (NH) y de adenohipófisis (AH) de pato.	106
3.- Transplante de Adenohipófisis de pato como modelo "in vivo" para el estudio del control de su actividad secretoria.	107
4.- Tratamiento con drogas "in vivo".	108
5.- Técnicas de Radioinmunoanálisis (RIA) de ACTH, α -MSH, AVT y CRF.	109
a.- Métodos de iodinación:	114
i) Reacción de iodinación.	114
ii) Purificación de Hormonas iodinadas.	114
b.- Separación de la Hormona marcada unida al Anticuerpo de la Hormona marcada libre.	116
i) Separación con la mezcla Carbón-Dextrán.	116
ii) Separación con 2°Anticuerpo.	116
6.- Técnicas histológicas	
a.- Coloración tricrómica de Mallory.	116
b.- Técnica para Neurosecreción: Aldehído-Fucsina.	116
c.- Técnicas inmunohistoquímicas:	117
i) Determinación de ACTH y α -MSH.	117
ii) Determinación de CRF.	118
7.- Determinación de Proteínas: Técnica de Lowry.	118

	<u>Página</u>
8.- Mantenimiento de los animales.	119
9.- Estadística.	119

PARTE III: RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I: CONTEO DE CELULAS Y VIABILIDAD.

1.- Células dispersas de adrenal de rata.	121
2.- Células dispersas de adenohipófisis de pato.	121
3.- Células dispersas de adenohipófisis de rata.	121
4.- Células dispersas de lóbulo neurointermedio de rata.	122
5.- Discusión	122

CAPITULO II: DOSAJE DE ACTH Y α -MSH LIBERADAS

1.- Células dispersas de adrenal de rata como bioensayo para dosar ACTH.	123
2.- Radioinmunoanálisis (RIA) de ACTH.	123
3.- Comparación de la ACTH bioensayable y radioinmunoensayable.	125
4.- Radioinmunoanálisis (RIA) de α -MSH.	126
5.- Discusión.	127

CAPITULO III: ADECUACION, SELECCION Y VALIDACION DE UN SISTEMA "IN VITRO" PARA INVESTIGAR EL CONTROL DE SECRECION DE ACTH Y α -MSH EN LA HIPOFISIS DEL PATO.

1.- Incubados de Pedazos de glándula y de células dispersas de adenohipófisis de pato.	134
2.- Columna de células dispersas de adenohipófisis de pato:	134
a.- Estimulación con distintas diluciones de extractos de eminencia media media de pato (EMP).	134
b.- Estimulación con distintas diluciones de extractos de corteza cerebral de pato (CCP).	136

	<u>Página</u>
c.- Efecto de una elevada concentración de potasio sobre la secreción de ACTH y α -MSH.	136
d.- Estabilidad y confiabilidad de los extractos de eminencia media de pato.	136
e.- Efectos de ACTH y α -MSH sobre su propia secreción en los perfusatos de la columna.	137
3.- Discusión.	137
 <u>CAPITULO IV: INVESTIGACION DE LA ACTIVIDAD LIBERADORA DE</u> <u>ACTH Y α-MSH DE DIVEROS PEPTIDOS DE ORIGEN</u> <u>HIPOTALAMICO DE MAMIFEROS Y AVES.</u>	
1.- Curvas dosis-respuesta.	145
2.- Efecto sinérgico entre AVT y CRF.	147
3.- Comparación de la respuesta de las células corticome- lanotropas del pato con células corticotropas y mela- notropas de rata.	147
4.- Discusión.	148
 <u>CAPITULO V: INVESTIGACION DE LA ACTIVIDAD LIBERADORA DE</u> <u>ACTH y α-MSH DE VARIAS AMINAS BIOGENAS.</u>	
1.- Experimentos "in vitro": Curvas dosis-respuesta:	159
a.- Efecto de Noradrenalina (NA) y Adrenalina (A).	159
b.- Efecto de Fenilefrina (PHE) e Isoproterenol (IP).	160
c.- Efecto de los antagonistas adrenérgicos. Fentola- mina y Propranolol sobre la secreción de ACTH y α -MSH inducida por Noradrenalina.	161
d.- Efecto de serotonina (5-HT).	161
e.- Efecto de dopamina (DA).	162
f.- Actividad intrínseca ($V_{m\acute{a}x}$) de las distintas mo- noaminas probadas.	163
2.- Experimentos "in vivo": Efecto de ergocriptina y halo- peridol sobre los niveles plasmáticos de α -MSH.	163
3.- Discusión.	163

<u>CAPITULO VI: EFECTOS DE TRANSPLANTES DE ADENOHIPOFISIS DE</u>	
<u>PATO EN LA CAMARA ANTERIOR DEL OJO DE PATOS</u>	
<u>RECEPTORES SOBRE LA SECRECION DE ACTH Y α-MSH</u>	181
1.- Inmuhistoquímica de ACTH y α -MSH en cortes de adnhi- pófisis de pato: normotrópicas y transplantadas.	181
2.- Dosaje de ACTH y α -MSH en extractos de mitad rostral y mitad caudal de adenohipófisis y en extractos de trans- plantes de adenohipófisis de pato.	181
3.- Niveles plasmáticos de ACTH y α -MSH en patos controles intactos y patos transplantados.	182
4.- Incubados estáticos de pedazos de mitad rostral de a- denohipófisis de pato y de transplantes. Efecto secre- tagogo sobre α -MSH.	182
5.- Discusión.	183
<u>CAPITULO VII: NEUROSECRECION EN EL PATO Y SU RELACION CON</u>	
<u>EL CONTROL DE LA LIBERACION DE ACTH Y α-MSH</u>	191
1.- Corte sagital de la región hipotálamo-hipofisaria en el pato: Técnica de coloración tricrómica de Mallory.	191
2.- Demostración de material neurosecretorio en cortes sa- gital de hipotálamo en el pato:	193
a.- Técnica Aldehido- Fucsina. (AF).	193
b.- Técnica inmunohistoquímica para CRF y AVT.	194
3.- Investigación del contenido de AVT y CRF en: eminencia media (EMP), neurohipófisis (NHP), adenohipófisis (AHP) y corteza cerebral de pato (CCP).	194
a.- Radioinmunoanálisis (RIA) de Arginina Vasotocina (AVT).	194
b. Radioinmunoanálisis (RIA) del factor liberador de corticotrofina (CRF).	195
4.- Discusión.	196
<u>PARTE IV: CONCLUSION GENERAL Y RESUMEN</u>	209

LISTA DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1.- Transmisión de la información hormonal.	5
Figura 2.- Mecanismo de la acción hormonal: Modelo de Sutherland.	7
Figura 3.- Diagrama ilustrativo de los diferentes términos utilizados para nombrar las partes de la hipófisis de mamíferos.	10
Figura 4.- Diagrama de la hipófisis del pato: sección sagital.	12
Figura 5.- Sección sagital de adenohipófisis de pato coloreada para α -MSH.	16
Figura 6.- Adenohipófisis de pato coloreada mediante el método de la peroxidasa antiperoxidasa (PAP) para demostrar ACTH.	17
Figura 7.- Adenohipófisis de pato coloreada mediante el método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) para demostrar α -MSH.	18
Figura 8.- Hormonas neurohipofisarias.	21
Figura 9.- Elementos funcionales de control del complejo hipotálamo-hipofisario en los mamíferos.	27
Figura 10.- Sección lateral sagital esquemática a través del infundibulum y la hipófisis de <u>Zonotrichia gambelli</u> (gorrión de coronilla blanca).	29
Figura 11.- Pituitaria de <u>Gallus domesticus</u> , mostrando la irrigación.	31
Figura 12.- Diagrama esquemático de la hipófisis de rata, donde se muestra la vascularización de la pars intermedia.	52
Figura 13.- Sistema dopaminérgico túbero-hipofisario de la hipófisis de rata. Sección sagital.	55

	<u>Página</u>
Figura 14.- Representación esquemática del mecanismo que controlaría la liberación de MIF.	71
Figura 15.- a) Pre-proopiomelanocortina: distribución de pares de residuos de aminoácidos básicos. b) Presecuencia (señal) bovina: 26 a.a	77
Figura 16.- Procesamiento del precursor común para ACTH y su familia de péptidos: proopiomelanocortina (POMC).	80
Figura 17.- Secuencia aminoácida de varias endorfinas.	83
Figura 18.- Esquema del aparato utilizado para realizar la dispersión celular con tripsina.	102
Figura 19.- Esquema de la columna de células dispersas de adenohipófisis (AH) de pato.	105
Figura 20.- Bioensayo para ACTH.	130
Figura 21.- Reacciones cruzadas características del sistema de RIA de ACTH seleccionado.	131
Figura 22.- Correlación entre la ACTH radioinmunoensayable y bioensayable segregada por células adenohipofisarias de pato.	132
Figura 23.- Reacciones cruzadas características del sistema de RIA de α -MSH seleccionado.	133
Figura 24.- Bioensayo de sustancias liberadoras de ACTH. Comparación de varios métodos "in-vitro". Curvas dosis-respuesta para ACTH.	141
Figura 25.- Bioensayo de sustancias liberadoras de α -MSH. Comparación de varios métodos "in-vitro". Curvas dosis-respuesta para α -MSH.	142
Figura 26.- Perfil de secreción de ACTH y α -MSH de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato estimuladas con extractos de eminencia me-	

	<u>Página</u>
dia de pato (EMP).	143
Figura 27.- Perfil de secreción de ACTH y α -MSH de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato estimuladas con EMP y alta concentración de potasio.	144
Figura 28.- Curvas dosis-respuesta de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato frente a varios péptidos y extractos de eminencia media de pato (ACTH).	153
Figura 29.- Curvas dosis-respuesta de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato frente a varios péptidos y extractos de eminencia media de pato (α -MSH).	154
Figura 30.- Perfil de secreción de ACTH y α -MSH de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	155
Figura 31.- Sinergismo entre AVT y CRF sobre la liberación de ACTH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	156
Figura 32.- Sinergismo entre AVT y CRF sobre la liberación de α -MSH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	157
Figura 33.- Curvas dosis-respuesta de células dispersas de adenohipófisis de rata frente a extractos de eminencia media de rata y varios péptidos. Sinergismo entre AVT y CRF.	158
Figura 34.- Efecto de noradrenalina y adrenalina sobre la secreción de ACTH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	169
Figura 35.- Efecto de noradrenalina y adrenalina sobre la	

secreción de α -MSH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	170
Figura 36.- Efecto de fenilefrina e isoproterenol sobre la secreción de ACTH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	171
Figura 37.- Efecto de fenilefrina e isoproterenol sobre la secreción de α -MSH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	172
Figura 38.- Efecto de los antagonistas adrenérgicos fentolamina y propranolol sobre la secreción de ACTH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	173
Figura 39.- Efecto de los antagonistas adrenérgicos fentolamina y propranolol sobre la secreción de α -MSH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	174
Figura 40.- Efecto de la serotonina sobre la secreción de ACTH y α -MSH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	175
Figura 41.- Efecto de la dopamina sobre la secreción de ACTH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	176
Figura 42.- Efecto de la dopamina sobre la secreción de α -MSH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.	177
Figura 43.- Capacidad ($V_{m\acute{a}x}$) liberadora de ACTH de EMP y varias aminos biógenas.	178
Figura 44.- Capacidad ($V_{m\acute{a}x}$) liberadora de α -MSH de EMP y varias aminos biógenas.	179
Figura 45.- Dos secciones histológicas del mismo trans-	

	<u>Página</u>
plante:	
a) Inmunohistoquímica para ACTH.	187
b) Inmunohistoquímica para α -MSH.	187
Figura 46.- Corte sagital de la región hipotálamo-hipofisaria del pato. Técnica de Mallory.	200
Figura 47.- Corte sagital de la eminencia media de pato. Técnica de Mallory.	201
Figura 48.- Corte sagital de la eminencia media de pato.	
a) Técnica Aldehído-Fucsina (AF).	202
b) Técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) para demostrar CRF.	203
Figura 49.- Curvas de desplazamiento de péptidos neurohipofisarios con el sistema de RIA para AVT.	204
Figura 50.- Curvas de desplazamiento obtenidas para el standard de AVP, extractos de eminencia media de pato (EMP), de corteza cerebral de pato (CCP), de neurohipófisis de pato (NHP) y de adenohipófisis de pato (AHP).	205
Figura 51.- Curvas de desplazamiento de corticoliberina de mamíferos y extractos de eminencia media de pato con el sistema de RIA para CRF utilizado.	206

LISTA DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla 1. Hormona, lugar de origen, tejido u órgano blanco y respuestas fisiológicas que implican al AMPc como segundo mensajero.	8
Tabla 2. Hormonas hipotalámicas e hipofisarias: nomenclatura y abreviaturas.	32
Tabla 3. Efectos de varias sustancias sobre la liberación de péptidos derivados de POMC de pars intermedia de rata <u>in vitro</u>	62
Tabla 4. Péptidos implicados en el control de secreción de MSH.	68
Tabla 5. Buffer para radioinmunoanálisis.	110
Tabla 6. Protocolo utilizado para los radioinmunoanálisis (I).	111
Tabla 7. Protocolo utilizado para los radioinmunoanálisis (II).	112
Tabla 8. Almacenamiento de hormonas.	113
Tabla 9. Reacciones de iodinación.	115
Tabla 10. Efecto de la inyección intraperitoneal de haloperidol y ergocriptina sobre los niveles plasmáticos de α -MSH.	180
Tabla 11. Contenido de ACTH y α -MSH (ng/mg de proteínas en mitad rostral y mitad caudal de hipófisis de patos intactos normotrópicos y de transplantes.	188
Tabla 12. Efectos de transplantes de adenohipófisis sobre los niveles plasmáticos de ACTH y α -MSH.	189
Tabla 13. Cantidad de α -MSH en ng/mg de proteínas liberada a los medios de incubados por pedazos de adenohipófisis normotrópicas o por transplantes	

	<u>Página</u>
en presencia o no de extractos de EMP.	190
Tabla 14. Contenido de Vasotocina (AVT) y de CRF en ex- tractos de eminencia media, lóbulo nervioso, corteza cerebral y adenohipófisis de pato.	207

PRIMERA PARTE

INTRODUCCION

CAPITULO 1. CONCEPTOS GENERALES

1. EL CONCEPTO DE HORMONA

El papel fisiológico de la glándula endocrina y la primera hormona fueron descubiertas en 1902 por E.H. Starling. A pesar que desde muchos siglos atrás se venía observando el efecto que producía en el hombre la castración, sólo hacia fines del siglo XIX se comprendió claramente el rol fisiológico de las glándulas endocrinas.

En la segunda mitad de dicho siglo, numerosas observaciones experimentales y clínicas permitieron establecer una correlación entre la aparición de síntomas clínicos y la castración, o alteraciones morfológicas macroscópicas en diversas glándulas, como por ejemplo, la tiroides o las suprarrenales. Por entonces se creía que la actividad de estas glándulas era substraer de la sangre ciertas sustancias nocivas, responsables de determinadas manifestaciones patológicas. Asimismo se observaba que era posible atemperar, por lo menos parcialmente, los trastornos resultantes de la ablación de la tiroides, suministrando fragmentos de la misma glándula al animal de experimentación.

Se desarrolló entonces la hipótesis de que la tiroides al igual que otras glándulas endocrinas, tendría la función de liberar a la sangre sustancias necesarias para el desarrollo o el funcionamiento de otras partes del organismo. La primera demostración experimental de la intervención que una hormona tiene en la regulación de una función fisiológica fue hecha por L.E. Bayliss y E.H. Starling en 1902, mediante un estudio sobre la regulación de la secreción del páncreas. Ellos demostraron que la llegada del quimo al intestino delgado determina la liberación a la sangre de una sustancia elaborada por la pared intestinal. Cuando esta sustancia llega al páncreas por vía sanguínea induce la secreción del jugo pancreático.

La progresiva extensión del concepto de regulación hormonal y la correlación establecida entre él y el equilibrio del medio interno introducida por C. Bernard han lleva-

do a considerar al conjunto de glándulas endocrinas como un sistema, cuya función es la de regular y coordinar la actividad de las diversas partes del organismo. Se trata pues, de una función comparable, en cierto sentido, a la del sistema nervioso. Podemos por lo tanto definir a una hormona como una sustancia química vertida en la sangre por una glándula endocrina, en respuesta a un estímulo específico. Transportada por la sangre, la hormona regula la actividad de uno o más grupos diferentes de células.

Otra definición propuesta por Huxley en 1935 es la siguiente: "Las hormonas pueden considerarse primeramente como moléculas transferentes de información de un grupo de células a otro, para el bienestar de la población celular en su conjunto". En esta definición se pone más énfasis en la función biológica de las hormonas que en la forma en que son transportadas.

De acuerdo al tipo de respuesta celular que las hormonas producen, podemos clasificarlas en distintos grupos. Por un lado tenemos aquellas hormonas que producen una respuesta relativamente rápida, frecuentemente de corta duración y estrechamente relacionada con la concentración de hormona presente. En este grupo podemos incluir: la adrenalina, glucagón, insulina, varias hormonas segregadas por los lóbulos anterior y posterior de la hipófisis, los factores "liberadores" secretados por el hipotálamo, así como la hormona paratiroidea, la calcitonina, prostaglandinas y una gran variedad de neurotransmisores y péptidos con actividad vascular.

El segundo grupo incluye hormonas que producen una respuesta celular mucho más lenta, observable al cabo de horas o días luego de su administración y que persiste por un período relativamente largo independiente de la presencia continuada o no de la sustancia hormonal. En este grupo podemos incluir las hormonas esteroideas, las hormonas tiroideas y un variado número de polipéptidos que afectan el crecimiento celular. Los mecanismos de acción de las hormonas del primer y segundo grupo son diferentes, ya que mientras que las hormonas pertenecientes al segundo grupo necesitan penetrar al interior celular para actuar, interactuando con receptores localizados en estructuras citoplasmáticas o nucleares, las hormonas del primer grupo no necesitan acceder al interior celular para ejercer sus efectos, interactuando con receptores localizados en la superficie celular.

Por último, podemos distinguir entre hormonas que determinan una respuesta celular catabólica como el glucagón, las catecolaminas, etc. y aquellas hormonas que regulan el anabolismo celular, entre las que mencionaremos: insulina y factores promotores del crecimiento celular.

2. EL CONCEPTO DE RECEPTOR

El concepto de receptor data de fines del siglo pasado de los trabajos de Langley y Ehrlich quienes señalaron que sustancias como la adrenalina, nicotina, atropina actúan a nivel de "sustancias receptoras" de las células para poder así modular el metabolismo celular.

Actualmente definimos un receptor como una entidad celular de naturaleza proteica que une específicamente determinada hormona o fármaco y que, como consecuencia de tal unión, se desencadenan una serie de procesos a nivel celular que provocan una determinada respuesta fisiológica. En esta definición están involucradas dos etapas distinguibles: la primera, el reconocimiento y unión de la hormona al receptor, y la segunda, la activación de la respuesta celular.

Existen compuestos de estructura, en general, análoga a una hormona, que al unirse al receptor de la misma originan una respuesta biológica de tipo parecido a la determinada por la hormona nativa; ellos se denominan agonistas. Dentro de los agonistas existen varias posibilidades de acción:

a. Análogos con mayor afinidad y mayor actividad biológica que la hormona nativa, por ejemplo, la isopropil-diiodotironina, respecto a la L-triiodotironina.

b. Compuestos con similar actividad biológica que se unen al mismo receptor, pero presentan composición o naturaleza química diversa, por ejemplo, la morfina respecto de la endorfina. Estos compuestos tienen similitudes estructurales que les permiten interaccionar con el mismo receptor.

c. Compuestos análogos que se unen al mismo receptor, pero presentan menor actividad biológica que la hormona nativa; es el caso de los agonistas parciales. Este grupo está constituido por compuestos que poseen una menor afinidad por el receptor y cuya respuesta máxima es menor que la ejercida por la hormona nativa, aún a concentraciones saturantes del agonista.

A los compuestos también análogos a una hormona que reconocen al receptor de ésta, pero no ejercen ninguna actividad biológica se denominan antagonistas competitivos. Un antagonista puede considerarse como el caso extremo de un agonista parcial con respuesta biológica nula, aún cuando haya saturado todos los receptores. El uso de agonistas y antagonistas es de suma utilidad para estudiar los mecanismos de interacción entre la hormona y su receptor (5).

3. TRANSMISION DE LA INFORMACION HORMONAL

La transmisión de la información hormonal en el caso que se halle mediada por receptores a nivel de membrana plasmática es una complicada cascada de eventos: en un primer paso, la hormona es desplazada del medio externo y se une al receptor (discriminador). El receptor ocupado, activado por el mensaje hormonal, traduce esta señal por intermedio de un transductor a través de la membrana hacia el efector, que transforma el mensaje en una señal intracelular (segundo mensajero). El mensajero intracelular controla elementos o estructuras que producen la respuesta fisiológica celular específica. Diferentes receptores pueden transducir su señal vía diferentes transductores, hacia el mismo efector -adenilatociclase- o a diferentes efectores (Fig. 1).

Actualmente, hay evidencias considerables de que una proteína (N) que se une al GTP, localizada en la cara interna de la membrana plasmática actúa como transductor y media el efecto de ciertas hormonas (H) desde el receptor (R) hacia el efector (E: adenilato ciclase), regulando la actividad de este último. Existen receptores, como por ejemplo los que reconocen a ACTH, glucagón o compuestos β -adrenérgicos que se unen a las subunidades regulatorias estimulatorias de la proteína N (Ns) mientras que otros receptores, como por ejemplo, los que reconocen a los opiáceos o a sustancias colinérgicas, median su señal a través de subunidades inhibitorias (Ni). Por lo tanto, dos tipos de transductores regulan al mismo efector: Ns incrementan y Ni disminuyen la actividad de E (adenilato ciclase) (6).

Hay varios modelos propuestos para explicar el mecanismo de transducción de la información a través del sistema de la adenilato ciclase: 1) R, N y E están acoplados per-

TRANSMISION DE LA INFORMACION HORMONAL

Figura 1. El término transmisión incluye la totalidad de la secuencia temporal de eventos desde A hasta C: (A) transferencia del mensaje desde la hormona hacia el receptor; (B) trasducción del mensaje por intermedio de un transductor a través de la membrana plasmática hacia el efector (B') que genera un segundo mensajero (señal intracelular) (C) de la respuesta celular específica. En las investigaciones sobre el mecanismo de acción hormonal, las etapas B y B' no se pueden estudiar aisladamente y la etapa A sólo puede ser estudiada en lo que respecta a la unión hormona-receptor.

manentemente (modelo de preacoplamiento), 2) R, N y E están acoplados en ausencia de hormona, cuando la hormona (H) se une a R, éste se disocia de E, lo que provoca su activación (modelo de disociación); 3) R y NE flotan independientemente en la membrana: HR forma un complejo con NE, el que actúa como complejo activado HRNE' (modelo del receptor móvil) o también puede disociarse en HR y NE' (modelo de colisión de acoplamiento); 4) R y N están preacoplados formando complejos oligoméricos separados de E; cuando H reacciona con R se forman complejos HRN monoméricos que activan a E (E') (modelo de acoplamiento-desagregación) (7).

Estos modelos fueron estudiados para el sistema de la adenilato ciclasa activado por compuestos β -adrenérgicos, glucagón y en menor grado para ACTH y α -MSH (Tabla 1).

El efector produce una señal intracelular que actúa a través de una compleja cascada de enzimas "blanco" para producir la respuesta fisiológica (Fig. 2).

Algunos de los mecanismos que regulan la transmisión de la información hormonal están parcialmente esclarecidos (desensitización de receptores, recambio, internalización, etc.); se ha demostrado que la etapa de trasducción depende de un número adicional de factores entre los que se incluyen proteínas (fosfodiesterasas, calmodulina), nucleótidos (ATP, GTP, cGMP), cationes (Ca^{+2} , Mg^{+2}), etc. aún no del todo esclarecidos.

MECANISMO DE ACCION HORMONAL: MODELO DE SUTHERLAND

Figura 2. Modelo propuesto por Sutherland para explicar el mecanismo de acción de las hormonas. La hormona al unirse al receptor activa la conversión del ATP en AMP cíclico, la cual es catalizada por la enzima adenilato ciclasa que está en la cara interna de la membrana plasmática.

Tabla N° 1

Hormona, lugar de origen, tejido u órgano blanco y respuestas fisiológicas que implican al AMP cíclico como 2º mensajero

HORMONA	ORIGEN	TEJIDO	RESPUESTA FISIOLÓGICA
ACTH	Adenohipófisis	Adrenal Graso	Esteroidogénesis Lipólisis
TSH	Hipotálamo	Tiroideo Graso	Hidrólisis tiroglobulina iodinación Lipólisis
LH	Adenohipófisis	Ovario Testículo Graso	Esteroidogénesis Esteroidogénesis Lipólisis
MSH	Pars intermedia de la hipófisis	Piel de anfibios	Melanización
PTH	Paratiroides	Corteza renal Oseos	Transporte de Ca^{+2} Reabsorción de Ca^{+2}
Vasopresina	Núcleos hipo- talámicos	Médula renal	Reabsorción de H_2O
Prostaglandinas	Tejidos diversos	Plaquetas Fibroblastos	Inhibición de la agregación Inhibición del crecimiento
Glucagón	Páncreas	Hepático Cardíaco Graso	Glucogenolisis Glucogenolisis Lipólisis
Adrenalina	Médula adrenal	Hepático Muscular Cardíaco Salivar Graso Pancreático Músculo liso	Glucogenolisis Glucogenolisis Efecto ionotrópico Secreción amilasa Lipólisis Secreción insulina Relajación
Noradrenalina	Médula adrenal	Cerebral Nervioso Pineal	Frecuencia descarga células Purkinje Liberación de acetilcolina Síntesis de melatonina

CAPITULO 2. LA HIPOFISIS AVIAR

1. CONCEPTOS GENERALES INTRODUCTORIOS

Las glándulas endocrinas segregan "sustancias" (hormonas) que tienen importantes efectos fisiológicos sobre ciertos órganos y procesos orgánicos. Estas glándulas no tienen conductos excretores y liberan sus hormonas directamente a la corriente sanguínea, por la que son transportadas hacia los órganos blanco.

Algunas de las glándulas del organismo solamente producen hormonas (secreción interna); otras elaboran hormonas y "otras sustancias" (secreciones externas): glándulas mixtas.

Las glándulas endocrinas de las aves son: 1) hipófisis o pituitaria; 2) tiroides; 3) paratiroides; 4) adrenales; 5) timo; 6) pineal; 7) páncreas; 8) testículos y ovarios; y 9) intestino. Las primeras son glándulas endocrinas estrictas, mientras que las tres últimas exhiben tanto funciones endocrinas como exocrinas.

2. ANATOMIA DE LA HIPOFISIS

La hipófisis se halla inmediatamente por debajo de la base del encéfalo a la cual está unida por el tallo hipofisario (Fig. 3). Está situada en la depresión en forma de silla de montar del hueso esfenoides (silla turca). En un corte sagital puede comprobarse que la hipófisis de muchos animales está separada en dos lóbulos, uno anterior y otro posterior por una hendidura dirigida hacia abajo y atrás desde la inserción del tallo hipofisario (Fig. 3).

Dicha hendidura puede observarse en la hipófisis del niño joven, pero en el hombre adulto está sustituida por una hilera de folículos. Los dos lóbulos así separados están divididos en cuatro partes: 1) el cuerpo principal de la glándula, situado por delante de la hendidura (o hilera de folículos en el caso de la hipófisis humana)

Figura 3. Diagrama ilustrativo de los diferentes términos utilizados para nombrar las partes de la hipófisis de mamíferos. La neurohipófisis (NH) comprende: E.M. eminencia media; T.I.S. tallo infundibular superior; T.I.I. tallo infundibular inferior; P.I.₂ proceso infundibular (lóbulo posterior). La adenohipófisis comprende: P.T. pars tuberalis; P.D. pars distalis (lóbulo anterior); P.I.₁ pars intermedia, C.M. cuerpo mamilar; Q.O. quiasma óptico; V III tercer ventrículo. EM + TIS + TII = infundíbulo (tallo neural).

recibe el nombre de pars anterior o distalis (PD); 2) una proyección de ésta, la pars tuberalis (PT) se extiende hacia arriba siguiendo la parte anterior y lateral del tallo hipofisario; 3) una banda estrecha de tejido glandular que se halla en la parte posterior de la hendidura o hilera de vesículas constituye la pars intermedia (PI₁); 4) el resto de la glándula (toda la parte situada por detrás de la estrecha banda celular que constituye la pars intermedia) se denomina pars posterior o pars nervosa (PN).

En las aves, la hipófisis comprende un lóbulo anterior (que consta de dos áreas -caudal y cefálica- distintas citológicamente) y un lóbulo posterior; pero no un lóbulo intermedio, tal como el que se presenta en los mamíferos. Existe como en los mamíferos una pars tuberalis (8-11). El lóbulo anterior (adenohipófisis) está separado del lóbulo posterior por un tabique de tejido conectivo. El tallo infundibular comunica con la eminencia media (EM) que subyace al tercer ventrículo del encéfalo (Fig. 4).

3. HORMONAS DEL LOBULO ANTERIOR

El lóbulo anterior de la hipófisis aviar produce todas las hormonas clásicas encontradas en las hipófisis de los mamíferos. Estas son las hormonas adrenocorticotrófica (ACTH), tirotrófica (TSH), foliculoestimulante (FSH), luteinizante (LH), prolactina (Pr1), hormona de crecimiento (GH) y hormona melanotrófica (MSH).

a. Gonadotrofinas. Desde que Stockell, Hartree y Cunningham, 1969 (12) aislaron LH y FSH de glándulas hipofisarias de pollo, se han hecho varios intentos para lograr purificar las gonadotrofinas aviares. Se ha analizado la composición de amino ácidos y carbohidratos de muchas preparaciones y se han reportado coincidencias y también algunas diferencias con respecto a las gonadotrofinas de mamíferos (13,14). Recientemente se ha logrado aislar y caracterizar LH de pollo (15).

Tanto FSH como LH están presentes en la hipófisis del embrión de pollo desde el día 18 del desarrollo (16). Aunque el ovario aviar no produzca cuerpo lúteo, que en los mamíferos se desarrolla como resultado de la acción de la LH, la presencia de LH y FSH en la hipófisis aviar ha sido demostrada por los implantes o inyecciones de extractos de adenohipófisis de distintas especies aviares, en pollo jóvenes, o en ratas o ratones hipofisectomiza-

DIAGRAMA DE LA HIPOFISIS DEL PATO: SECCION SAGITAL

Figura 4. Los puntos gruesos y los puntos pequeños representan respectivamente las áreas caudal y cefálica del lóbulo anterior. El área negra la pars tuberalis; las líneas onduladas el lóbulo posterior; las líneas paralelas el área hipotalámica anterior.

dos e inmaduros. La hipofisectomía da lugar a una disminución del tamaño de las gónadas (17,19). La FSH estimula el crecimiento tubular de los testículos y la espermatogénesis en el macho y el crecimiento del folículo ovárico en la hembra. La LH produce ovulación en la hembra y estimula las células intersticiales de los testículos en el macho, al igual que en los mamíferos.

b. Prolactina (Prl). La Prl ha sido purificada de glándulas hipofisarias de pollos por Scanes y col. 1975 (20) y de pavos por Burke y Papkoff, 1980 (21) por técnicas cromatográficas. La composición de amino ácidos de la Prl de pollos y pavos también ha sido estudiada por los mencionados autores. El peso molecular de la Prl de pavo ha sido estimado en 26.000 daltons. Una propiedad característica de la Prl de mamíferos es la naturaleza heterogénea de la molécula; las distintas clases de Prl pueden diferir de sus propiedades biológicas e inmunológicas (22, 24). Esta propiedad es compartida con la Prl aviar, ya que la Prl de las aves posee un múltiple patrón de bandas electroforéticas (21) y tanto la Prl de pollo como la de pavo iodinadas presentan múltiples picos de actividad luego de ser pasadas por columnas de gel filtración; éstos picos difieren en su capacidad de unión a los antisueros específicos (21).

Prl, la hormona que causa la secreción de leche en los mamíferos, es la responsable de la secreción de los sacos del buche de las palomas y otras aves y causa la cloquez en las gallinas. Se ha demostrado que la hipófisis de las gallinas cluecas contienen más Prl que las de las gallinas que no lo están (25). Riddle, Bates y Lahr en 1935 (26) demostraron por primera vez que la Prl inyectada a gallinas causaba cloquera y que la plena expresión de la cloquez (cloqueo y anidamiento) se inducía solamente en aquellas razas que mostraban una tendencia natural a enclocar. También se ha demostrado que el contenido de Prl en la hipófisis es mayor durante la incubación que durante la puesta de los huevos (27).

c. Tirotrofina (TSH). Se sabe poco sobre las características bioquímicas de la TSH aviar, si bien se sabe que es una glicoproteína.

Una disminución en el tamaño de la tiroides consecutiva a la hipofisectomía (28,19) indica que la hipófisis aviar elabora una hormona tiroestimulante (TSH). La hormona tirotrófica se produce en células poligonales basófilas

que se localizan exclusivamente en el lóbulo cefálico (10). Los ensayos de potencia TSH de los lóbulos cefálico y caudal muestran alta potencia en el lóbulo cefálico y nula en el caudal. Martindale en 1941 (29) demostró la presencia de una hormona tirotrófica en el embrión de pollo de 11 días, trasplantando hipófisis de embrión de pollo a pollos hipofisectomizados, lo que restaura las tiroides al tamaño normal.

La administración de las hormonas tiroideas -triyodo-tironina o tiroxina- a los pollos disminuye la fijación de I^{131} por las tiroides (30), lo que indica que la hipófisis de los pollos produce normalmente pequeñas cantidades de TSH y que esta síntesis puede inhibirse por hormonas tiroideas exógenas. Así, este mecanismo de retroalimentación tiroides-hipófisis está constantemente en un estado de equilibrio. El control hipotalámico-hipofisario-tiroideo fue demostrado en experimentos preliminares que indican que extractos crudos de hipotálamos aviares poseen actividad liberadora de tirotrófina (TSH). Scanes en 1974 (31) demostró que extractos hipotalámicos de pollo estimulaban la liberación de TSH in vitro. Posteriormente se demostró que el TRH sintético también era capaz de estimular la liberación adenohipofisaria de TSH en pollos in vitro. (31-33).

d. Hormona de crecimiento (GH). La presencia de hormona de crecimiento en la adenohipófisis de las aves fue sustentada primeramente por la supresión del crecimiento de los huesos, luego de la hipofisectomía (34,19) y su existencia fue luego demostrada por bioensayo (35), inmunoensayo (36,37) y electroforesis (38) de extractos de adenohipófisis de pollo. Se sabía muy poco acerca del control de la secreción de GH en aves, hasta que se logró aislar y purificar esta hormona de pollo (39,40), pavo (39,41) y pato (39,42) y se desarrolló un sistema de radio-inmunoensayo específico para dosar GH en pollo y pavo (40,41).

Se han demostrado cambios considerables en las concentraciones plasmáticas de GH durante el crecimiento de distintas especies de aves. GH ha sido detectada en el embrión de pollo por técnicas inmunohistoquímicas luego del día 12 de incubación (43) y puede ser medida por bioensayo a partir del día 15 (44). La concentración plasmática de GH se detectó a partir del día 17 de incubación y ésta aumentaba hasta el nacimiento en pollos (45), pavos

(46,47) y patos (48). Esta concentración permanece elevada durante los primeros estadios del crecimiento, declina en la madurez avanzada y es muy baja en los adultos. El control neuroendocrino de la secreción de GH está bajo control hipotalámico, siendo éste estimulado por un factor hipotalámico liberador de la GH (GHRH) y/o inhibido por un factor "inhibitorio" (GHRH: somatostatina). Aparentemente en aves jóvenes el control de secreción de GH es un control estimulatorio preeminentemente mientras que en el adulto prima el control inhibitorio (49,50). También se ha demostrado que TRH es un potente secretagogo de GH en aves jóvenes actuando tanto a nivel hipotalámico como hipofisario (51).

Se ha demostrado la secuencia de amino ácidos de GH aviar mediante la elucidación de la secuencia de bases del gen de GH. También se ha obtenido pura por técnicas de ingeniería genética, curiosamente no se ha podido obtener aumento del crecimiento en pollos por administración de la hormona obtenida en bacterias (52).

e. Adrenocorticotrofina (ACTH). La ACTH químicamente pura ha sido aislada de las hipófisis de un gran número de especies de mamíferos y existen evidencias de su presencia en las hipófisis de numerosas especies aviares. Hay pocos trabajos acerca de la identificación y purificación química de la ACTH aviar; recientemente se ha podido determinar la secuencia de amino ácidos de ACTH de avestruz y pavo (53,54). Estivariz y col. en 1980 (55), por técnicas de cromatografía y electroforesis identificaron una sustancia ACTH-símil en la adenohipófisis del pato. Posteriormente esto fue corroborado por Iturriza y col. en 1980 (56) quien mediante técnicas inmunohistoquímicas demostró la presencia de ACTH en células del lóbulo cefálico de la adenohipófisis del pato. Dado que en estas células, ACTH coexiste con α -MSH, una de las hormonas típicas de las células melanotropas de la PI de los mamíferos, se las denominó células corticomelanotropas (CM). Dichas células se encuentran localizadas en la región rostral del lóbulo cefálico de la pars distalis en el pato.(Figs. 5, 6 y 7).

Como se dijo anteriormente, la adenohipófisis aviar contiene ACTH, pero las cantidades o potencias exactas aún no se han establecido. Al igual que en los mamíferos, esta hormona estimula el crecimiento y desarrollo de la corteza adrenal y la elaboración de las correspondientes hormonas corticales. La ACTH está presente en la hipófi-

sis del embrión de pollo hacia el día 16 del desarrollo y aumenta hasta el momento de la eclosión. La inyección de extractos de hipófisis de embrión de pollo de 16 a 18 días en conejos aumentan el tamaño de las adrenales (16). Otra evidencia de la presencia de ACTH en la adenohipófisis de las aves fue la restauración a la normalidad del peso adrenal disminuido en ratas hipofisectomizadas, cuando éstas eran inyectadas con extractos de hipófisis de pollos (57). Breitenbach en 1962 (58) demostró que existía un incremento significativo en la cantidad de glucocorticoides plasmáticos en los gallos jóvenes luego de ser administrados con ACTH. La hipofisectomía en los pollos no causa una disminución tan marcada en el peso de las adrenales como en los mamíferos y algunos investigadores han señalado pocos o ningún cambio luego de la administración de ACTH. Esto ha llevado a la conclusión de que la adrenal es relativamente autónoma en las aves. Datos más recientes muestran que la hipofisectomía hace disminuir la secreción de esteroides corticales (59) y que la administración de dosificaciones apropiadas de ACTH causa una hipertrofia adrenal y un aumento en la liberación de hormonas adrenocorticales como en los mamíferos. También se ha demostrado que la administración de ACTH a faisanes y pollos, tanto intactos como hipofisectomizados, aumenta la cantidad de corticosterona liberada por las adrenales (60).

f. Hormona melanocito-estimulante (MSH). La hipófisis de las aves carece de pars intermedia, sin embargo, se ha demostrado bioquímica e inmunohistoquímicamente la presencia de una de las hormonas típicas de la pars intermedia de los mamíferos, α -MSH, en la adenohipófisis aviar (lóbulo anterior) (55,56). Extractos de la porción cefálica del lóbulo anterior son considerablemente más potentes en su poder melanóforo dispersante (Fig. 5) que la porción caudal. Chen, Oldham y Geiling, 1940 (61) reportaron que esta hormona está presente en la hipófisis del pollo tan pronto como al quinto día del desarrollo embrionario; ellos usaron la rana hipofisectomizada como animal de ensayo.

La α -MSH causa una expansión de los melanóforos de la piel de rana, lagartija, pez, etc. Kleinholz y Rahn (62) usaron la lagartija hipofisectomizada (*Anolis carolinensis*) para ensayar las potencias melanotróficas de las hipófisis de varias especies. Ellos encontraron

Figura 5. Sección sagital de adenohipófisis de pato, coloreada para α -MSH y fotografiada a bajo aumento. Las células melanotropas se localizan en la zona anteroventral de la adenohipófisis. Coloración final: 4-C1-1-naftol. X 75.

Figura 6. Adenohipófisis de pato coloreada mediante el método de la peroxidasa antiperoxidasa (PAP) para demostrar ACTH. Aceptor de oxígeno: 4-Cl-1-naftol. X 700.

Figura 7. El mismo campo mostrado en la Fig. 6 luego de decolorarlo y despegar el anticuerpo anti-ACTH y tratarlo con el anticuerpo anti- α -MSH. Aceptor de oxígeno: diamino-benzidina. Notar que las mismas células aparecen coloreadas en ambas figuras a pesar de haber usado diferentes anticuerpos. X 700.

que la porción cefálica del lóbulo anterior de las gallinas era más potente que pesos iguales de lóbulos intermedios de hipófisis de bovinos.

En 1980, Iturriza y col. (56) demostraron por técnicas inmunohistoquímicas la presencia de α -MSH en células del lóbulo cefálico de la adenohipófisis del pato. Esta hormona coexistía conjuntamente con ACTH en el mismo tipo celular al que como se dijo anteriormente se lo denominó corticomelanotropo (CM) (Figs. 5, 6 y 7). Tanto ACTH como α -MSH derivan de una molécula precursora de peso molecular 30-34 Kd denominada pro-opiomelanocortina (POMC) (véase Capítulo VII).

4. HORMONAS DEL LOBULO POSTERIOR

Hasta el momento se han identificado y caracterizado nueve principios neurohipofisarios naturales: arginina vasopresina (AVP), lisina vasopresina (LVP), arginina vasotocina (AVT), oxitocina (OT), mesotocina (MT), isotocina (IT), glumitocina (GT), valitocina (VT) y aspartocina (AT), entre especies representativas pertenecientes a las diferentes clases de vertebrados (63-65).

La secuencia de amino ácidos de AVT es la siguiente: Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-(NH₂) (Fig. 8); es la hormona neurohipofisaria más ubicua, presente en todos los vertebrados desde ciclostomas hasta mamíferos. En los mamíferos se ha demostrado la presencia de AVT en fetos (ovejas y ballenas), pero no ha sido detectada en adultos (66). Dado que es la única hormona neurohipofisaria presente en organismos vivientes primitivos, como por ejemplo los ciclostomas, es considerada como la hormona peptídica neurohipofisaria ancestral (67,68,65).

Las aves poseen las mismas hormonas neurohipofisarias que se encuentran presentes en anfibios, reptiles y peces pulmonados: AVT y MT ([Ile⁸]-oxitocina) (Fig. 8).

Existían evidencias farmacológicas anteriores que indicaban la presencia de AVT y OT en la neurohipófisis del pollo, paloma y pavo; sin embargo, los estudios de Acher y col., 1970 (69) han establecido claramente que las hormonas neurohipofisarias del pollo, ganso y pavo son AVT y MT. Ellos aislaron y caracterizaron estas hormonas sobre la base de sus secuencias de amino ácidos, utilizando técnicas de cromatografía, electroforesis y propiedades farmacológicas, confirmando la presencia de MT, mientras

HORMONAS NEUROHIPOFISARIAS

Figura 8. Vasopresina y oxitocina, hormonas peptídicas sintetizadas por neuronas del hipotálamo de los mamíferos, que se liberan de las terminaciones axónicas de las neuronas hipotalámicas en el lóbulo posterior de la hipófisis. La vasopresina (abajo a la izquierda) produce vasoconstricción de las arterias y determina la reabsorción de agua de la orina por el riñón. La oxitocina (abajo a la derecha) solo difiere ligeramente en su estructura respecto a la vasopresina, pero su acción es completamente distinta: induce las contracciones uterinas que aceleran el parto. Tanto la vasopresina como la oxitocina son casi idénticas en estructura a la vasotocina, mesotocina o isotocina (arriba), hormonas liberadas en el lóbulo posterior de la hipófisis de los vertebrados no mamíferos.

que no evidenciaron la presencia de OT.

Por lo tanto, las aves difieren de los peces (salvo los peces pulmonados) y de los mamíferos en lo que respecta a la naturaleza de sus hormonas neurohipofisarias.

Se sabe que las hormonas neurohipofisarias de los mamíferos son transportadas desde los cuerpos neuronales en núcleos grises hipotalámicos a través de sus axones hasta las terminaciones nerviosas de estas neuronas en la neurohipófisis, por medio de proteínas acídicas ricas en cisteína de bajo peso molecular denominadas neurofisinas. Las neurofisinas se unen específicamente a hormonas neurohipofisarias: la neurofisina I se une específicamente a OT y la neurofisina II se une específicamente a AVP (70).

Tanto OT como AVP derivan de sendas moléculas precursoras, cuya secuencia de amino ácidos se ha podido dilucidar. Dichas moléculas precursoras contienen asimismo la secuencia de amino ácidos de las neurofisinas I y II respectivamente (71,72).

Con respecto a las neurofisinas aviares, aunque la información es escasa, se ha demostrado (73) la presencia de tres proteínas neurofisina-símil en la neurohipófisis aviar que poseen características similares a las neurofisinas de mamíferos. Por técnicas inmunohistoquímicas se ha demostrado que en las aves MT y AVT se sintetizan en neuronas separadas en el hipotálamo (74). Bons en 1980 (75) demostró que en el pato, al igual que en el resto de las aves, MT y AVT se producen en neuronas distintas. Los trabajos anteriores habían demostrado que en diferentes clases de aves MT y AVT eran producidas en los núcleos hipotalámicos supraóptico (SO) y paraventricular (PV) (76, 77,74). Existe un patrón de distribución de las neuronas productoras de AVT o MT dentro del sistema SO-PV: las células vasotocinérgicas son más numerosas en la zona rostral y lateral del núcleo SO, mientras que las células mesotocinérgicas son más numerosas en la zona dorsal y lateral del núcleo PV.

Las hormonas neurohipofisarias están íntimamente relacionadas con los mecanismos de osmorregulación de las aves. Diferentes autores investigaron las funciones osmorregulatorias de AVT y MT en las aves entre los que podemos mencionar a Legait, 1959 (78) y Oksche y col., 1959 (79), quienes demostraron que el stress osmótico estimula el sistema hipotalámico neurosecretor, observándose una deplección

en los gránulos neurosecretorios de la pars nerviosa.

Bläsher y Simon en 1978 (80) realizaron un estudio por técnicas inmunohistoquímicas de las neuronas vasotocinérgicas y mesotocinérgicas del hipotálamo de patos domésticos sometidos a stress osmótico causado por bebida de una solución de ClNa (600 m Osm/kg) durante 11 meses, luego del nacimiento. Ellos observaron que la zona rostral del núcleo SO consiste casi exclusivamente de neuronas vasotocinérgicas y que en el grupo sometido a stress osmótico, había un marcado aumento, de los cuerpos neuronales y de los axones, en las zonas lateral y medial del núcleo SO y en la porción rostral periventricular del núcleo PV.

Las neuronas mesotocinérgicas se localizan predominantemente en el núcleo paraventricular y no presentaban cambios visibles en los animales sometidos a stress osmótico.

Koike y col. en 1977 (81) estudiaron los efectos de la privación de H_2O sobre los niveles plasmáticos de AVT en pollos. Observaron que la concentración de AVT plasmática aumentaba seis veces sobre el basal. Actualmente se postula que un aumento en la osmolalidad y/o un aumento en la concentración de Na estimula la secreción y liberación de AVT en las aves.

Kihlstrom y Daninge en 1972 (82) estudiaron los efectos de las hormonas neurohipofisarias OT y AVT sobre el comportamiento sexual de diversas aves; esta acción estaría mediada por las hormonas gonadales y gonadotrópicas. Munsick y col. en 1960 (83) demostraron una sensibilidad elevada del útero de las gallinas frente a AVT in vitro y sugirieron que esta hormona estaría involucrada en la oviposición. Esto fue posteriormente corroborado por Sturkie y Lin, 1966 (84) quienes demostraron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de AVT durante la oviposición. Hasta ahora no se ha podido demostrar un rol concreto de MT en mecanismos reproductivos en las aves (incluyendo oviposición). Su rol fisiológico sigue siendo incierto.

Estas hormonas neurohipofisarias también están involucradas en los procesos migratorios de las aves; se ha demostrado una duplicación en el número de gránulos neurosecretorios de la pars nerviosa (PN) y de la eminencia media (EM) previo a la migración en las aves (85). La liberación de AVT y MT desde la PN hacia la circulación general podría provocar cambios metabólicos en los órganos blanco. Similarmente la liberación de AVT desde la EM hacia la adenohipófisis (AH) vía los vasos porta, podría

inducir la liberación de determinadas hormonas adenohipofisarias.

Por último, diremos que tanto AVT como MT actuarían regulando los procesos de memoria y aprendizaje en las aves, tal como ha sido demostrado para AVP y OT en la rata si bien en las aves aún no se ha demostrado de manera concluyente (86).

CAPITULO III. REGULACION DE LA ADENOHIPOFISIS

1. CONCEPTO DE LA REGULACION NEURO-HUMORAL DE LA ADENOHIPOFISIS

Durante muchos años se aceptó que el lóbulo anterior de la hipófisis estaba bajo el control del sistema nervioso (SN) (87), pero en 1933 Hinsey y Markee (88) sostenían: "La ruta eferente directa o indirecta hacia el lóbulo anterior de la hipófisis es sólo cuestión de conjeturas". Ellos observaron que la ovulación que sigue al coito en el conejo y que depende de la actividad del lóbulo anterior de la hipófisis, no era inhibida luego de seccionar ciertos nervios autónomos que se pensaba inervaban directamente el lóbulo anterior. Esta evidencia, junto con la de otros investigadores contemporáneos, hizo que Hinsey y Markee en 1933 (88) sugirieran la teoría del control neurohumoral del lóbulo anterior: "Las rutas hipotalámicas deberían activar el lóbulo posterior de la hipófisis, que posee una bien demostrada inervación hipotalámica directa y éste a su vez podría ejercer su influencia sobre el lóbulo anterior por medio de hormonas específicas". Esta posibilidad fue aceptada por Harris en 1937 (89) quien, aún así, en ese momento favorecía la teoría de la inervación directa del lóbulo anterior.

En 1933, Popa y Fielding (90) describieron un sistema de vasos porta que comunicaban la hipófisis con el hipotálamo y que la dirección del flujo de sangre era desde el hipotálamo hacia la hipófisis. Houssay fue el primero que demostró el sentido de la circulación portal en el sapo (91). La presencia de estos vasos fue confirmada por Wislocki y King en 1936 (92) quienes discutieron la dirección del flujo sanguíneo. Ellos concluyeron que el flujo era desde la eminencia media, hacia el tuber cinereum y de allí a la pars distalis. Esto fué luego confirmado inyectando tinta china en ratas, chanchitos de la India, conejos y perros (93) y a partir de observaciones de vasos porta hipofisarios en ratas vivas (94). Un esquema completo del sistema porta hipofisario en el hombre fue presentado por Xuereb y col. en 1954 (95). La arteria hipofisaria

superior que se origina a partir de la arteria carótida interna se ramifica y da origen a una compleja red de capilares en la eminencia media y la parte superior del tallo infundibular (nomenclatura de Xuereb y col., 1954, véase Fig. 3), formando el plexo capilar primario del sistema porta. Esta es drenada por los vasos sanguíneos porta hipofisarios largos que transportan la sangre hacia los sinusoides de la pars distalis. Estos últimos constituyen el plexo capilar secundario del sistema porta. Las arterias hipofisarias inferiores, que también se originan en las arterias carótidas internas, proveen sangre arterial al proceso infundibular (lóbulo neural) y forman un plexo capilar primario en la parte inferior del tallo infundibular en el hombre, la cabra y la oveja y en el lóbulo posterior en la rata (96). Esta zona es drenada por vasos hipofisarios cortos que desembocan en los sinusoides que rodean el tejido epitelial del lóbulo anterior en su sector postero-lateral (véase Fig. 9). Los vasos porta hipofisarios forman los únicos canales vasculares aferentes hacia los sinusoides de la pars distalis.

Muchos autores habían propuesto la existencia de terminales nerviosas pericelulares alrededor de las células glandulares de la adenohipófisis o un sistema secretomotor, pero Green y Harris en 1947 (93) demostraron que la inervación directa del lóbulo anterior era escasa. Sobre esta base concluyeron que la influencia neural directa del hipotálamo sobre las secreciones de la pars distalis era sumamente improbable. Ellos observaron que los ovillos capilares en la eminencia media estaban rodeados por un gran número de fibras derivadas de varios núcleos hipotalámicos que a su vez están conectados y regulados por centros superiores del SNC, como los núcleos del mesencéfalo, puente y metencéfalo. Se propuso que un gran número de estas células podrían secretar diversas sustancias que podrían influir sobre la secreción de hormonas específicas del lóbulo anterior. Estas sustancias podrían llegar al lóbulo anterior a través del sistema porta hipofisario. En esta época se presentaron evidencias considerables que corroboraron la teoría del control neurohumoral del lóbulo anterior (87). Por ejemplo, cambios en la función de glándulas endocrinas (ovario, testículos, corteza adrenal) sobre las que actuaban hormonas adenohipofisarias, luego de bloquear los vasos porta hipofisarios sugirieron el rol esencial de estos vasos en la secreción de dichas

Figura 9. Elementos funcionales de control del complejo hipotálamo-hipofisario en los mamíferos. Dos tipos generales de neuronas están involucrados en la regulación de la adenohipófisis. El primer tipo de neuronas -peptidérgicas- elaboran hormonas liberadoras (3: que terminan en la eminencia media y 4: que terminan en el tallo hipofisario) y están en íntima relación con el plexo capilar de vasos porta hipofisarios. Estas neuronas (denominadas tuberohipofisarias) son neurosecretorias. Su función es análoga a la de la clásica neurona supraóptica hipofisaria (5) responsable de la secreción de vasopresina. El segundo tipo de neuronas son fundamentalmente monoaminérgicas y se cree que terminan en el cuerpo de una neurona peptidérgica (1); en las terminaciones nerviosas en la región tuberohipofisaria o contactando directamente con los capilares del plexo primario del sistema porta.

hormonas; a su vez lesiones en la eminencia media, que no afectaban los vasos porta hipofisarios, originaron atrofia gonadal en un número considerable de especies.

Actualmente, el concepto neurohumoral es ampliamente aceptado y sustentado por la teoría de la neurosecreción (97) desarrollado para las hormonas del lóbulo posterior: oxitocina (OT) y arginina-vasopresina (AVP) en el caso de los mamíferos y mesotocina (MT) y arginina-vasotocina (AVT) en el caso de las aves. Este concepto se resume en la Fig. 9.

La primera confirmación de la teoría neurohumoral de Green y Harris, 1947, en aves fue obtenida por Farner y col. en EEUU, 1962 (98) y Benoit y col., 1951 y 1953 en Francia (99,100). Las partes constituyentes del sistema neuro-secretor en la aves son: las células neurosecretoras del hipotálamo (núcleos supraóptico, paraventricular e infundibular) y los axones de estas células que forman haces de fibras (los haces supraópticohipofisario, paraventriculohipofisario y tuberohipofisario). Estos tres haces también tienen ramas hacia la eminencia media. La mayoría de las fibras del haz supraópticohipofisario terminan en el lóbulo posterior de la hipófisis (Fig. 10).

Los núcleos supraóptico y paraventricular varían considerablemente sus características morfológicas entre las diferentes especies de aves. Los primeros gránulos neurosecretorios, localizados en el núcleo supraóptico, aparecen en los embriones de pollo entre los días 13-14 según Wingstrand, 1951 (101) y Grignon, 1956 (102), pero según Mosier, 1955 (103) ya lo hacen al día 4 y según Duncan, 1956 (104) a las 68 hs. En el embrión de pato se observa este material en los días 14-16 (105), localizado en la neurohipófisis y dos días más tarde en el núcleo paraventricular y en la eminencia media. Las células neurosecretoras producen una secreción que migra hacia abajo por los axones (fibras) hasta alcanzar el lóbulo posterior directamente; por otra parte las fibras no se extienden hasta la hipófisis anterior (106,107), sino que terminan en la pars tuberalis y en la eminencia media. Sin embargo, se presentará evidencia más adelante de que el material neurosecretor hipotalámico de las aves alcanza el lóbulo anterior y lo estimula para liberar hormonas como lo hace en los mamíferos. Está ahora muy claro que lo efectúa por vía de vasos sanguíneos porta hipotálamo-hipofisarios. En las aves algunos haces de fibras se aproximan a los

Figura 10. Sección lateral sagital esquemática través del infundibulum y la hipófisis de *Zonotrichia gambelli* (gorrión de coronilla blanca). Qui. O.: quiasma-óptico; Ri.: receso infundibular. Adenohipófisis: 1: pars distalis; 2: pars tuberalis (infundibularis). Eminencia media: 3: división anterior; 4: división posterior; A: zona interna, capa ependimaria; B: zona interna, capa de fibras; C: zona externa, capa reticular; D: zona externa, capa en empalizada; vp: vasos porta; 5: tallo infundibular; 6: lóbulo neural. Núcleos: 7: núcleo supraóptico; 8: núcleo paraventricular; b: tracto supraóptico-hipofisario; c: fibras neurosecretoras con gránulos que penetran en la eminencia media; 9: división anterior del núcleo infundibular; 10: división posterior; a: tracto tuberohipofisario. (De Farner y Oksche, Gen. Comp. Endocrinol., 2: 113, 1962) (98).

vasos sanguíneos del plexo capilar primario en la eminencia media (108). Estos vasos sanguíneos transportan el producto de la secreción al lóbulo anterior (109). Se han efectuado estudios detallados de los vasos sanguíneos de la hipófisis de las aves por Green, 1951 (109); Wingstrand, 1951 (101); Benoit y Assenmacher, 1951 (99) y otros. La explicación de Green del aporte sanguíneo a la hipófisis de las gallinas es la siguiente: la arteria hipofisaria inferior irriga la red capilar primaria en la eminencia media. Los vasos porta recogen la sangre de este plexo y continúan hacia abajo hasta el lóbulo anterior. Al alcanzar este último, siguen irradiándose en todas direcciones (red capilar secundaria) y se drenan en senos venosos que rodean a la glándula (Fig. 11). El lóbulo neural recibe una irrigación sanguínea independiente a partir de un plexo superficial de vasos que penetra en él bajo la forma de arcadas regulares. Estos vasos se proyectan hacia dentro, hacia el receso infundibular. En todas las aves estudiadas por Green las arterias carótidas se anastomosan por detrás del lóbulo anterior, enclavándose en el lóbulo caudal de la hipófisis.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS HORMONAS HIPOFISIOTROPAS EN EL HIPOTALAMO

La existencia de sustancias hipofisiotropas en la eminencia media de los mamíferos fue demostrada por primera vez para la hormona adrenocorticotrófica y se la denominó factor liberador de corticotrofina (CRF). La demostración de la existencia de otros factores liberadores en la región hipotalámica se realizó en los primeros años de la década del 60 (véase tabla 2: nombres y abreviaturas) con la subsecuente purificación, aislamiento, elucidación de su estructura y la posterior síntesis de: la hormona liberadora de tirotrófina (TRH) (110), un tripéptido; la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), un decapeptido (111,112) y la somatostatina: hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento (GHIRH) un tetra-decapeptido (113). Recientemente se han sumado a éstos: somatoliberina (114) y CRF⁴¹ (115).

La presencia de sustancias hipofisiotropas en el hipotálamo aviar fue demostrada por Peczley, 1969; Stanier y Holmes, 1969; Salem y col., 1970 (116-118), para la hormona adrenocorticotrofina y se la denominó factor libe-

PITUITARIA DE GALLUS DOMESTICUS MOSTRANDO LA IRRIGACION

Figura 11. L.N.: lóbulo neural; E.M.: eminencia media; R.C.P.: red capilar primaria de los vasos porta; A.H.S.: arteria hipofisaria superior; R.C.S.: red capilar secundaria de vasos porta; III V.: tercer ventrículo; P.D.: pars distalis; Qui.O.: quiasma óptico; A.L.N.: arteria del lóbulo neural; S.C.: seno cavernoso; C: arteria carótida; P.S.: plexo superficial (De Green, Am. J. Anat., 1951) (109).

Tabla 2

HORMONAS HIPOTALAMICAS E HIPOFISARIAS:
NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS

HORMONAS O FACTORES HIPOTALAMICOS		HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS	
Factor liberador de corticotrofina	CRF	Hormona adrenocorticotrofina	ACTH
Hormona liberadora de tirotrófina	TRH	Tirotrofina	TSH
Hormona liberadora de la hormona luteinizante	LHRH	Hormona luteinizante	LH
Hormona liberadora de la hormona folículo estimulante	FSHRF	Hormona folículo estimulante	FSH
Hormona liberadora de la hormona de crecimiento	GHRH	Hormona de crecimiento	GH
Hormona inhibidora de la liberación de hormona de crecimiento (somatostatina)	GHRH		
Factor liberador de prolactina	PRF	Prolactina	PRL
Factor inhibidor de la liberación de prolactina = Dopamina	PIF o DA		
Factor liberador de la hormona melanocito estimulante	MRF	HORMONA DE LA PARS INTERMEDIA **	
		Hormona melanocito estimulante	MSH
Factor inhibidor de la liberación de la hormona melanocito estimulante = Dopamina	MIF o DA	HORMONAS DEL LOBULO POSTERIOR	
		Vasopresina	AVP
		Oxitocina	OT

Se utilizó el término hormona para sustancias de estructura conocida y el término factor para sustancias cuya estructura aún no ha sido dilucidada. * En el caso del complejo CRF existen dos péptidos cuyo rol fisiológico se halla bien demostrado: AVP y CRF⁴¹. ** No se incluyen el resto de las hormonas derivadas del precursor proopiomelanocortina (POMC) producidas y liberadas por la pars intermedia.

rador de corticotrofina (CRF). También se demostró la presencia de otros factores liberadores en la región hipotalámica de las aves, entre los que podemos mencionar: el factor liberador de tirotrofina (TRH) (119), el factor liberador de gonadotrofinas (GnRH) (120), el factor liberador de la hormona de crecimiento (GHRH) (121). De estas sustancias hipofisiotropas aviares, hasta el presente sólo se ha podido aislar y determinar la secuencia de aminoácidos de GnRH, que al igual que en los mamíferos es un decapeptido, pero difiere de aquélla en que, mientras que en las aves, en la posición 7 se ubica el aminoácido Gln, en los mamíferos se ubica el aminoácido Leu (122).

3. LOCALIZACION DE LAS HORMONAS HIPOFISIOTROPICAS HIPOTALAMICAS

Técnicas bioquímicas y neuroanatómicas recientes han permitido la construcción de mapas de áreas del hipotálamo en los mamíferos que contienen las hormonas liberadoras y/o inhibidoras de la secreción de las correspondientes hormonas hipofisarias, a saber: LHRH, TRH, somatostatina y somatoliberina (123). Las tres se encuentran en su más alta concentración en la eminencia media, que contiene gran número de terminales axónicas que es donde principalmente se almacena la neurosecreción (o los factores hipofisiotrópicos), así como también el plexo capilar primario del sistema porta hipofisario. LHRH se encuentra principalmente en el núcleo arcuato, que contiene los cuerpos celulares neuronales, TRH y somatostatina tienen una distribución más ubícu tanto en el hipotálamo como en otras áreas del sistema nervioso central. Estudios de inmunohistoquímica al microscopio electrónico en la rata demostraron que la LHRH se encuentra en pequeños gránulos dentro de los terminales axónicos cerca de los capilares porta en la eminencia media, lo que sugiere que podría tratarse de un producto neurosecretorio (124). Somatostatina proviene de células del hipotálamo anterior y se extiende en el área preóptica rostral. Estas células ocupan una región más medial sobre el tercer ventrículo (en los núcleos preóptico y paraventricular).

En las aves, arginina-vasotocina (AVT) y mesotocina (MT) aparecen en neuronas separadas en el hipotálamo (125). Las neuronas que contienen mayor concentración de AVT predominan en la porción rostral del núcleo supra-

óptico (SO) mientras que la zona lateral del núcleo supra-óptico y el núcleo paraventricular son ricos en neuronas productoras de MT. Las hormonas aviares AVT y MT tienen reacción inmunológica cruzada con las respectivas hormonas de mamíferos arginina-vasopresina (AVP) y oxitocina (OT) (125). Los axones que contienen AVT y MT terminan en el lóbulo nervioso de la hipófisis. En varias especies de aves se encontró AVT, además de en la neurohipófisis, casi exclusivamente en la zona externa de la eminencia media anterior. Existen evidencias experimentales que indican que la AVT de la eminencia media anterior podría estar estrechamente relacionada con el factor liberador de corticotrofina (2). Muy probablemente esta sustancia se produce en neuronas especializadas de las regiones supraópticas y paraventriculares.

En la región rostral del hipotálamo aviar se han encontrado cuerpos neuronales inmunorreactivos para LH-RH (126) y también en la región tuberal del hipotálamo. La significación fisiológica de la interacción funcional de los centros gonadotrópicos localizados en la región rostral y tuberal del hipotálamo aún no ha sido determinada experimentalmente (127). Los axones que contienen LH-RH se localizan en la zona externa de la eminencia media anterior y posterior y en el organum vasculosum de la lámina terminal. Neuronas ricas en somatostatina (GHIRH) se encuentran ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central de las aves. Los cuerpos neuronales que contienen GHIRH se encuentran en la región periventricular de los núcleos supraóptico y paraventricular y se pueden extender hasta la lámina terminal (128). Los axones que contienen GHIRH se proyectan en forma difusa hacia la zona externa de la eminencia media.

Existen paquetes de fibras ascendentes y descendentes que contienen GHIRH que dan proyecciones hipotalámicas hacia neuronas extrahipotalámicas y por lo tanto podrían tener una función de neurotransmisores o neuromoduladores. También existen cuerpos neuronales que contienen GHIRH en el tallo cerebral predominantemente en la zona que bordea las regiones mesencefálicas y romboencefálicas del tegmentum (129). Actualmente existe gran interés en las neuronas que contienen β -lipotropina, β -melanotropina, endorfinas y encefalinas. En aves el problema de la existencia de una molécula precursora de propiocortina no ha sido aún dilucidado y se sabe poco o nada acerca de los mecanismos

de escisión enzimáticos. De acuerdo con Bläshar (130) los cuerpos neuronales inmunorreactivos se encuentran en tres lugares distintos del mesencéfalo y de la médula aviares. En grandes zonas del tallo cerebral los sistemas de fibras inmunorreactivas para somatostatina y encefalinas guardan una estrecha relación espacial cuya significación fisiológica no se conoce aún.

4. IDENTIFICACION DE SUSTANCIAS HIPOFISIOTROPICAS EN LOS VASOS PORTA HIPOTALAMO-HIPOFISARIOS

Se ha demostrado la presencia de muchos factores hipotalámicos en la sangre portal de los vasos porta hipotálamo hipofisarios en la rata como por ejemplo, actividad LHRH (131), actividad CRF (132-135), TRH, GHRF y PIF (131). Porter y col. en 1973 demostraron que la variación de los niveles de las hormonas liberadoras, o inhibidoras de la liberación de origen hipotalámico en los vasos porta, afectaban la liberación de las hormonas del lóbulo anterior de la hipófisis en forma dosis-dependiente (131).

La introducción de cantidades variables de un extracto hipotalámico crudo directamente en el interior de un vaso porta canulado provocó un aumento en la concentración plasmática periférica de FSH y LH y una disminución en las concentraciones de prolactina (131).

De la misma manera la inoculación de LHRH sintética y TRH sintética en un vaso porta aumenta los niveles plasmáticos de LH y TSH respectivamente (131).

5. INTERRELACIONES ENTRE LA HIPOFISIS, LA EMINENCIA MEDIA Y EL TERCER VENTRICULO

Trabajos recientes han sugerido que el sistema porta hipotálamo-hipofisario no es tan simple como se había pensado. A partir de investigaciones realizadas con microscopía de barrido del lecho vascular hipofisario (136) se demostró que la eminencia media, el tallo hipofisario y el lóbulo posterior tienen un lecho capilar común con un flujo sanguíneo variable. Esto posibilitaría en determinadas condiciones, que las hormonas del lóbulo posterior llegaran a la eminencia media y de ahí al lóbulo anterior vía los vasos porta largos.

Oliver y col. (137) aportaron nuevas evidencias del flujo retrógrado en el tallo hipofisario midiendo los nive-

les de LH, TSH, PRL y ACTH en sangre portal por radioinmunoensayo. Ellos también hipotetizaron que las hormonas hipofisarias podrían penetrar en ciertos vasos con flujo retrógrado hacia el hipotálamo a través de conexiones directas o por medio de un proceso de difusión que implicaría un mecanismo a contra-corriente o por ambos procesos. Por ende, hormonas adenohipofisarias, hormonas neurohipofisarias y hormonas hipotalámicas pueden encontrarse en el lóbulo anterior, lóbulo posterior y eminencia media. Hormonas liberadoras o inhibidoras de la liberación podrían ser transportadas desde la zona externa de la eminencia media hacia el tercer ventrículo. El interés en la relación entre la eminencia media y el tercer ventrículo y el sistema hipotálamo hipofisario ha ido incrementándose. Se ha demostrado en base a estudios realizados con el microscopio electrónico que los tanicitos (células ependimarias que revisten los ventrículos) que se encuentran en la pared del tercer ventrículo en la región de la eminencia media, poseen su superficie apical orientada hacia el tercer ventrículo y sus prolongaciones citoplasmáticas se internan en el tejido nervioso y terminan sobre las paredes de los capilares del plexo primario (138,139). Estas células podrían jugar un rol importante en la regulación de la función adenohipofisaria y se ha demostrado que algunas de ellas poseen LHRH (124). Se ha propuesto que las células que sintetizan y liberan las hormonas hipofisiotrópicas podrían localizarse en áreas del cerebro lejanas a la eminencia media. Estas podrían secretar sus hormonas al líquido cefalorraquídeo y llegarían al sistema porta hipotálamo hipofisario vía los tanicitos (140). Inversamente podría haber pasaje de sustancias desde el plexo capilar primario hacia el líquido cefalorraquídeo vía los tanicitos. Esta idea asociada con la teoría del flujo retrógrado en el tallo hipofisario sugiere que las hormonas del lóbulo anterior y posterior así como también las hormonas hipofisiotrópicas localizadas en el plexo capilar primario de la eminencia media podrían llegar al tercer ventrículo y de allí a otras áreas del cerebro. El significado de estos resultados es meramente especulativo. De Wied en 1969 (141) demostró los efectos de hormonas peptídicas sobre el comportamiento, especialmente la importancia fisiológica de AVP en el líquido cefalorraquídeo del tercer ventrículo (142).

Las interrelaciones estructurales y funcionales de

eminencia media (EM) en diferentes especies de aves fueron estudiadas por Oksche y Farner en 1974 (143). La eminencia media aviar está constituida por: 1) zona interna, que a su vez se subdivide en a) capa endimaria y b) capa fibrosa; 2) zona externa, constituida por a) capa reticular (que corresponde a la parte superficial del plexo de la eminencia media) y b) la capa en empalizada (conjuntos paralelos de terminaciones nerviosas). Brevemente diremos que existe una marcada diferencia entre las vías de entrada a la zona externa (zona en empalizada) de la eminencia media anterior y posterior. Las divisiones rostrales pre-tuberales y tuberales del hipotálamo se proyectan a la zona externa de la eminencia media anterior, mientras que la zona en empalizada de la eminencia media posterior recibe la llegada de múltiples sistemas tuberales organizados en serie. En ciertas variedades de aves los axones de neuronas secretorias establecen conexiones punto a punto con la circulación portal hipofisaria y por ende con los lóbulos cefálicos y caudal de la pars distalis de la hipófisis. Esto significa que las proyecciones de cada tipo neurosecretorio en la eminencia media de algunas aves contactarían con áreas muy discretas de las asas capilares del plexo primario, que a la vez irrigan determinadas áreas de la pars distalis.

Actualmente, sólo una pequeña porción de estos sistemas de fibras han sido identificados por métodos inmunohistoquímicos. Finalmente, el descubrimiento de péptidos biológicamente activos como lipotropina, melanotropina, endorfinas y algunos péptidos intestinales por métodos bioquímicos e inmunohistoquímicos generalizaron el concepto de la neurosecreción peptidérgica (144). Estos aspectos aún no han sido del todo dilucidados en las aves.

Las neuronas productoras de monoaminas y neurohormonas pueden interactuar en el hipotálamo a nivel de los pericariones y/o a nivel de los terminales axónicos en la zona externa de la eminencia media (145). Aparte de la eminencia media, una de las principales áreas blanco neurohemales para las diferentes rutas neuroendocrinas eferentes es el organum vasculosum de la lámina terminal, estructura ésta que puede actuar como un área neurohemal de significación biológica. Finalmente, no podemos dejar de considerar que algunas sustancias biológicamente activas pueden volcarse al líquido cefalorraquídeo (LCR) vía los tanicitos endimarios (146). Se ha demostrado que los tanicitos

son capaces de transportar diferentes moléculas en forma bidireccional. En condiciones fisiológicas, la significación funcional de este transporte es aún motivo de numerosas investigaciones (147,148).

CAPITULO IV. CONTROL DE SECRECION DE ACTH

1. FACTOR LIBERADOR DE CORTICOTROFINA (CRF): STATUS ACTUAL

Las hormonas liberadoras-inhibidoras hipotalámicas han sido estudiadas por numerosos investigadores, entre los que podemos mencionar a Harris, 1948, Schally y Bowers, 1964, Schally y col., 1968, McCann y Porter, 1968, Schally y col., 1973, Porter y col., 1973, Vale y col., 1983 (87, 149-154).

El mejoramiento de las técnicas de investigación en los primeros años de la década del 50 permitió demostrar que los niveles sistémicos de adrenalina o niveles plasmáticos de corticosteroides adrenales no eran los factores más importantes que controlaban en forma directa la secreción de ACTH (87, 149). Aún así se sabe que los corticosteroides juegan un importante papel en la regulación de la secreción de ACTH debido al feedback que ejercen a nivel hipofisario, hipotalámico y posiblemente a nivel central (155, 156) y que las catecolaminas podrían estar involucradas en el control de la secreción de CRF (156) a nivel central y también a nivel directo sobre la adenohipófisis controlando la secreción hormonal (157).

En 1954 Scharrer y Scharrer (97) propusieron que la neurosecreción de vasopresina en diferentes canales vasculares podría afectar simultáneamente la secreción de ACTH del lóbulo anterior de la hipófisis y la resorción de agua a nivel renal. En ese mismo año, McCann y Brobeck (158) notaron una correlación entre la falta de respuesta de la adenohipófisis al stress y el aumento de la diabetes insípida producida por lesiones hipotalámicas. Ellos concluyeron que el tracto supraoptico hipofisario jugaría un rol importante en la secreción de ACTH y que la hormona antidiurética se secretaría directamente en los capilares que coalescen para formar los vasos porta en la eminencia media.

La idea que vasopresina era el CRF fue cambiando basándose en datos fisiológicos (159, 160) y cromatográficos. Schally y Bowers en 1964 y Burgus y Guillemin en 1970 (149, 161) demostraron que existía un CRF diferente de vasopresi-

na.

Sorprendentemente, aunque el CRF fue uno de los primeros factores hipotalámicos evidenciados (162, 163) ha sido muy difícil de aislar y caracterizar. Recientemente se ha caracterizado un péptido de 41 amino ácidos del hipotálamo ovino capaz de liberar la hormona adrenocorticotrofina (115). En trabajos posteriores se demostró que el CRF era más potente secretagogo de ACTH que AVP (164) y que era capaz de potenciar la acción secretagoga sobre ACTH ejercida por AVP cuando se administraban conjuntamente en la rata.

Actualmente se cree que el CRF está constituido por un sistema de multicomponentes entre los que se pueden mencionar: AVP, CRF⁴¹, catecolaminas, etc. (154,165-167).

2. ENSAYOS IN VIVO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD LIBERADORA DE CORTICOTROFINA (CRA)

El simple manipuleo o inyección de un animal de experimentación constituye un stress suficiente para estimular la liberación de CRF y ACTH. Por lo tanto es necesario eliminar la liberación del CRF endógeno en los experimentos in vivo. Se necesita un gran número de controles para demostrar que un extracto posee verdaderamente actividad liberadora de corticotrofina (168, 169). Muchos investigadores consideran que el aislamiento del CRF se vio grandemente entorpecido por la falta de un sistema in vivo que fuera lo suficientemente específico y sensible (170,171). McCann en 1957 (172) estableció que: "El animal de experimentación ideal para demostrar la capacidad liberadora de ACTH, de diferentes neurohumores, sería aquél donde las respuestas ubicuas hipófiso-adrenales al stress estuvieran completamente bloqueadas mientras que la sensibilidad hipofisaria y adrenal para el neuro-humor y para ACTH respectivamente permaneciera inalterada". Desafortunadamente los métodos para bloquear la liberación inespecífica de ACTH como por ejemplo, lesiones hipotalámicas (158,173,174 175) y el bloqueo farmacológico (168, 176, 177) distan mucho del ideal. Antes del advenimiento de las técnicas de radioinmunoanálisis, la actividad hipotalámica liberadora de ACTH se medía indirectamente a través de la producción de corticosterona o la depleción de ácido ascórbico (DAA) en las glándulas adrenales, esto complicaba el diseño experimental, ya que la sustancia a ensayar debía estar libre de contaminaciones con la hormona hipofisaria en cuestión

(ACTH). Para interpretar correctamente los resultados experimentales, es importante determinar si el bloqueo para respuestas inespecíficas es completo. McCann y Brobeck en 1954 (158) notaron una correlación entre la diabetes insípida experimental causada por destrucción de la EM y el efecto inhibitorio sobre la liberación de ACTH, y usaron este parámetro como indicativo de la eficacia de la lesión.

Más adelante esta correlación fue rechazada, ya que las discrepancias en los resultados experimentales que utilizaban lesiones hipotalámicas para bloquear la liberación del CRF endógeno podrían deberse a que las lesiones fueran incompletas o que no estuvieran localizadas adecuadamente y esto determinaría que el porcentaje de inhibición de la liberación de ACTH y el desarrollo de diabetes insípida se produjeron independientemente (174, 178). Porter y col. en 1967 (174) encontraron un daño considerable en los vasos sanguíneos de la EM luego de haber producido las lesiones, pero a las 48 hs estos vasos se regeneran. Es importante por lo tanto verificar que las lesiones hipotalámicas no afecten de manera permanente el aporte sanguíneo y el flujo a la adenohipófisis y por ende provoquen una disminución en la liberación de ACTH. Estos autores utilizaron la secreción de corticosterona a la sangre de la vena adrenal como índice de secreción de ACTH. Es importante, sin embargo, asegurarse que las sustancias a ensayar no alteren la presión sanguínea y por lo tanto el flujo sanguíneo del animal.

Es también extremadamente difícil asegurar la efectividad de un bloqueo farmacológico. Arimura y col. en 1967 (177) investigaron varios tipos de bloqueos farmacológicos de manera de hacer el ensayo más confiable y fácil de realizar. La combinación de morfina y nembutal desembocaban en paros respiratorios, en un gran porcentaje de los animales tratados. La respuesta al CRF en ratas bloqueadas con dexametasona-morfina-nembutal eran menores que en ratas bloqueadas con clorpromazina-morfina-nembutal, lo que sugería que la dexametasona provocaba una disminución de la respuesta al CRF. Por lo tanto se eligió bloquear a los animales de experimentación con clorpromazina-morfina-nembutal, pero, como todos los ensayos in vivo, era insensible y requería un elevado número de animales. La sensibilidad de los ensayos in vivo fue considerablemente aumentada inyectando la sustancia problema directamente en la glándula

hipofisaria en lugar de inyectarla en la carótida o sistémicamente (174) o inyectándola en forma endovenosa (177). Estas técnicas tienen algunos inconvenientes, ya que para llegar a la glándula hipófisis es necesario pasar la cánula a través de estructuras localizadas en el tallo cerebral, que podrían participar en el control de secreción de ACTH (179). Esto no sucede con la técnica de aproximación parafaríngea de Hiroshige y col., 1968 (180). Aún así, ambas técnicas requieren la autopsia del animal para localizar la posición de la cánula y determinar la difusión de la sustancia inyectada desde la hipófisis anterior hacia la hipófisis posterior, hacia el hipotálamo y posiblemente hacia la sangre periférica donde podría ejercer efectos no específicos.

Ratas hipofisectomizadas, con tumores secretantes de ACTH trasplantadas subcutáneamente en las patas traseras (181, 182) o con hipófisis de ratas recién nacidas trasplantadas por debajo de la cápsula renal (183) también han sido usadas como bioensayos para CRF. Estos ensayos son complicados y muy insensibles.

Recientemente se han desarrollado bombas osmóticas que permiten introducir sustancias en su interior, que luego, al ser implantadas subcutáneamente en el animal de experimentación, difunden sistémicamente sin estresar al animal.

En aves, el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal ha sido poco estudiado. Los ensayos in vivo reportados utilizan la medida de la deplección de ácido ascórbico por parte de las glándulas adrenales de ratas hipofisectomizadas o bloqueadas con dexametasona, como una medida de la actividad adrenocorticotrófica y CRA en extractos hipotalámicos e hipofisarios de aves (118).

3. BIOENSAYOS IN VITRO PARA DETERMINAR CRA

La utilización de ensayos in vitro para determinar CRA obvia la necesidad de eliminar la liberación natural endógena de CRF (CRA). Los primeros experimentos donde se medía la liberación de ACTH consistían en incubados de pedazos de tejido hipofisario (163) y cultivos de tejido adenohipofisario de rata y perro (162). Estos ensayos eran relativamente insensibles y no específicos; durante la última década se han desarrollado un número considerable de nuevos sistemas de bioensayo in vitro.

Sleiden y Brodish, 1971 (184) aumentaron la sensibilidad de su ensayo incubando mitades de hipófisis a pH 4,5 en un medio 1/6 isotónico. Aún así se hace difícil evaluar la significación fisiológica de los resultados obtenidos utilizando dicho sistema. La evaluación de los resultados de los primeros bioensayos de CRA in vitro estaba limitada por la insensibilidad y dificultad para dosar ACTH: Saffran y Schally, 1955 (163) incubaron el medio que contenía la ACTH liberada por las mitades de adenohipófisis (AH) con cuartos de adrenal; Sleiden y Brodish, 1971 (184) y Guillemin y Rosenberg, 1955 (162) usaron ratas hipofisectomizadas para dosar la ACTH liberada, empleando los niveles plasmáticos de corticosterona y la deplección adrenal de ácido ascórbico respectivamente como una medida indirecta de la cantidad de ACTH liberada.

Los bioensayos para dosar CRA que utilizan incubados de pedazos de AH se han sensitizado mediante el empleo de mejores técnicas para medir ACTH, como por ejemplo, la producción de corticosterona por cuartos de adrenales perfundidos (185) y el bioensayo redox citoquímico que se basa en la detección microfotométrica de la deplección de ácido ascórbico en cortes microscópicos de adrenal de cobayo y es extremadamente sensible (186).

Con el desarrollo de las técnicas in vitro que emplean células aisladas adenohipofisarias (187, 188) acopladas al uso de células aisladas de adrenal como bioensayo para dosar ACTH (189) fue posible aumentar considerablemente la sensibilidad del bioensayo para CRA (190, 191). Los ensayos in vitro que utilizan incubados de pedazos de tejido presentan el inconveniente de la inhabilidad de las sustancias a ensayar de difundir libremente hacia y desde las células que se localizan en el interior del tejido y que no se hallan expuestas al medio externo. Este inconveniente se soslaya mediante el empleo de células aisladas, lo que daría cuenta del gran aumento en la sensibilidad observada.

La suspensión celular también presenta la ventaja de eliminar las variaciones interanimal (interglándula) y por lo tanto, disminuye considerablemente el número de animales empleados en cada ensayo. La sensibilidad de las suspensiones celulares se reduce debido a los elevados basales de producción hormonal ocasionados por lisis celular y a la degradación de la hormona liberada durante el tiempo en que permanece en el líquido de incubado. Este

inconveniente se puede minimizar mediante el empleo de células hipofisarias aisladas empaquetadas en un soporte inerte y perfundidas continuamente con el buffer de incubación (192). Mediante el empleo de esta técnica, la sensibilidad aumenta aún más. Este sistema se asemeja más a la situación in vivo que aquéllos que emplean incubados estáticos de células aisladas y constituye un sistema de bioensayo in vitro más fisiológico que los incubados estáticos ya que los secretagogos y los productos metabólicos celulares no se acumulan en el medio que baña a las células.

El desarrollo de técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) específicas y sensibles para dosar ACTH ha permitido el dosaje de la ACTH liberada por incubados de células de AH (193), por células AH en cultivo (194) y por células AH empaquetadas en la columna y sometidas a perfusión continua (195). Esto simplificó considerablemente el bioensayo para CRF, a la vez que redujo las probabilidades de que se produjeran artefactos que enmascaren los resultados experimentales.

En aves, hasta el presente hay muy pocos reportes de bioensayos in vitro para medir CRA. Se han empleado incubados de pedazos de AH en un incubador metabólico (117) en presencia de extractos hipotalámicos. Para medir la ACTH liberada a los medios de incubado por los pedazos de AH se utilizó un bioensayo in vitro (196) donde se dosó la corticosterona producida por pedazos de glándula adrenal en presencia de los distintos medios de incubado cuya actividad adrenocorticotrófica se quería valorar. Sin embargo, los resultados obtenidos empleando este método de bioensayo in vitro son muy variables y presentan una gran dispersión de los valores experimentales, por lo que se hace necesario desarrollar y emplear otros métodos in vitro tanto en lo que a la actividad CRA como a la actividad adrenocorticotrófica se refiere, que aseguren resultados más confiables y precisos.

4. PURIFICACION, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL CRF

Desde hace muchos años se sabía que el CRF era un péptido (197-202). Se había demostrado que el CRF no corría cromatográficamente como un solo péptido como ocurría con TRH o LHRH (161,152) y muchos autores reportaron una considerable pérdida de su actividad biológica, luego de los procedimientos de purificación (152, 175, 203). Esta caracte-

rística contrasta con TRH, un tripéptido, donde se recupera prácticamente el 100% de la actividad luego de haber cromatografiado miles de hipotálamos (150). El aislamiento del CRF se hizo más difícil aún debido a la complejidad de su bioensayo y a las interferencias que se producían en el mismo con vasopresina.

En los primeros trabajos realizados para purificar y caracterizar el CRF se emplearon extractos de lóbulos neurohipofisarios. Esto se debió, en primer lugar, a que Fortier y Selye en 1949 (204) propusieron que la neurohipófisis mediaba la respuesta hipotalámica al stress y Saffran y col., 1955 (163) sugirieron que la neurohipófisis actuaba como "estación de paso" entre los núcleos hipotalámicos y la pars distalis para almacenar y secretar el CRF de una manera muy similar a lo que ocurre con vasopresina y oxitocina. En segundo lugar, era bastante difícil de obtener un número considerable de hipotálamos para hacer los extractos a partir de los cuales purificar el CRF; por otro lado, los extractos de neurohipófisis eran muy accesibles en liofilizados comerciales denominados protopituitrina y pitresina (Parke Davis).

A comienzos de la década del 60, Guillemin y Schally publicaron resultados de experimentos donde utilizaron extractos de tejido neurohipofisario (149, 169). Luego de hacer cromatografía de intercambio iónico de extractos de neurohipófisis de porcinos en carboximetil celulosa (CMC) o IRC-50, toda la actividad CRF se encontró en el extremo descendiente de un gran pico de péptidos básicos. Entre los que se encontraban en mayor proporción figuraban LVP y α -MSH. Una purificación posterior utilizando técnicas de distribución a contra-corriente logró separar dos CRF: un β -CRF que precedía a vasopresina luego de realizar una cromatografía en carboximetil celulosa (CMC) y un α -CRF que podía separarse de α -MSH mediante una cromatografía en CMC. El α -CRF puede dividirse en α_1 -CRF y α_2 -CRF. En resumen, el lóbulo posterior puede contener tres CRF: 1) β -CRF con una estructura tentativa que incluye la secuencia N-terminal (acetil-Ser-Tyr) de α -MSH, la porción C-terminal (Lys-Gli-NH₂) de vasopresina y una estructura cíclica que posiblemente se asemeje a la vasopresina; 2) α_1 -CRF que podría estar íntimamente relacionado con α -MSH, pero todavía no se había caracterizado de manera concluyente y 3) α_2 -CRF que tiene una secuencia de aminoácidos (aa) y una actividad melanotrópica idénticas a α -MSH.

Sin embargo, la α -MSH sintética así como el péptido sintético con una secuencia de aa relacionada con la estructura tentativa del β -CRF no tienen actividad liberadora de corticotrofina (161). También se han aislado α y β -CRF a partir de neurohipófisis bovinas tratadas en forma similar a las neurohipófisis porcinas (205).

Nunca fue posible obtener cantidades suficientes de β -CRF para determinar su secuencia de aminoácidos, aunque sí se logró obtener, utilizando las mismas técnicas de purificación, gramos de LVP, oxitocina, α -MSH y β -MSH para ser purificadas. Esto dio lugar a que se cuestionara el uso del lóbulo posterior como material para intentar purificar el CRF (150, 169). Por lo tanto, las investigaciones posteriores utilizaron tejido hipotalámico para intentar aislar el CRF. Se procesó a gran escala tejido hipotalámico porcino; las técnicas utilizadas fueron: cromatografía en sefadex G-25 y extracción en solventes por distribución en contra-corriente. Por medio de estas técnicas se lograron detectar dos zonas con actividad CRF que coincidían con los coeficientes de partición de α -CRF y β -CRF de origen neurohipofisario (150, 161, 200). La purificación posterior se vio muy complicada por la presencia de vasopresina y grandes cantidades de ACTH, pero aún así, la fracción que contenía CRF, TRH y G_n RH fue purificada (150) y se logró separar el CRF de AVP, TRH y G_n RH. Este CRF presentaba actividad biológica tanto in vivo como in vitro.

Rumsfield y Porter, 1959 (198) y Royce y Sayers, 1960 (199) trabajaron a menor escala utilizando extractos hipotalámicos bovinos y encontraron dos y una región respectivamente con actividad CRF. Cham y col., 1969 (175) sostenían la existencia de dos CRF en el hipotálamo de la rata, mientras que Dhariwal y col., 1966 (206) habían encontrado solamente uno en la oveja, que no estaba relacionado con vasopresina.

A mediados de la década del 70 resurgió el interés de los investigadores respecto a la purificación del CRF. Pearlmutter y col., 1975 (203) encontraron dos regiones con débil actividad CRF, luego de someter a gel filtración eminencias medias de rata; cuando estas dos regiones se recombinaban, actuaban sinérgicamente para producir una elevada actividad CRF. Gilham y col. en 1975 y 1976 (207, 208) utilizaron hipotálamos estimulados in vitro con serotonina (5-HT) como material de partida para intentar purificar el CRF. Estos investigadores encontraron

dos regiones activas luego de realizar la filtración en gel, cuyos pesos moleculares eran 2500 y 1300. Vale y Rivier, 1977 (201) reportaron un CRF de PM 5000; Schally y col, 1977 (202) de PM = 4800; Sayers, 1977 (209) de PM: 5000, 700 y 500, por lo que el panorama parecía complicarse aún más.

La estructura y caracterización química del CRF permanecieron desconocidas hasta 1981, cuando Vale y col. (115) lograron purificar y asilar un péptido de 41 aa, partiendo de 49.000 hipotálamos ovinos. Los extractos hipotalámicos fueron cromatografiados en una resina de gel filtración (Sephadex G-80) y obtuvieron dos picos con actividad CRF; uno de ellos, por purificaciones posteriores, se demostró que era AVP y el otro, de mayor PM, fue purificado aún más por cromatografía de intercambio iónico y por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La secuencia de amino ácidos de las fracciones con actividad CRF fue determinada por el método de Edman seguido de HPLC para identificar los distintos residuos de aminoácidos. La secuencia aminoácidos para el CRF es: H-Ser-Gln-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂.

Estos autores también demostraron que este CRF de 41 aminoácidos era capaz de estimular la liberación de ACTH y β -endorfina de células aisladas adenohipofisarias en cultivo (154).

También lograron sintetizar el CRF de 41 aminoácidos y demostraron que era un potente secretagogo de ACTH y péptidos relacionados in vitro y su potencia secretagoga era mucho mayor que la de adrenalina y la de vasopresina. El CRF sintético se comporta como un potente estimulador de la secreción de ACTH y β -endorfina en la rata in vivo (210). La potencia del CRF in vitro en in vivo son del mismo orden de magnitud que las potencias observadas para otros péptidos regulatorios hipofisiotrópicos (TRH, G_nRH y somatostatina).

El CRF 41 aminoácidos no es químicamente semejante al α -CRF o al β -CRF, pero podría estar relacionado con las sustancias de mayor peso molecular que se comportaban como secretagogas de ACTH.

5. REGULACION DE LA SECRECION DE ACTH EN ADENOHIPOFISIS

Las células corticotropas adenohipofisarias están

reguladas por sustancias de origen central y periférico. En 1981, Vale y col. (115) lograron aislar, caracterizar y sintetizar un péptido de origen hipotalámico de 41 aminoácidos (CRF 41 aminoácidos) que ejercía un potente efecto secretagogo de ACTH in vivo e in vitro (154, 210). Posteriormente, se demostró la presencia de péptidos CRF-símil en sangre portal-hipofisaria (211), zona externa de la eminencia media y los cuerpos neuronales del núcleo paraventricular (212-215).

Numerosos estudios in vivo e in vitro demostraron que la actividad secretagoga de ACTH con CRF de 41 aminoácidos estaría regulada por glucocorticoides (216, 217), catecolaminas (157, 218) y péptidos neurohipofisarios; AVP y OT (165, 218, 219). De todos los secretagogos de ACTH conocidos, el CRF 41 aminoácidos es el que posee una mayor actividad intrínseca; los restantes secretagogos como AVP, OT, noradrenalina, adrenalina, angiotensina II, presentan potencias secretagogas sobre ACTH menores en las células corticotropas de la rata (154). Estos secretagogos menos potentes, en particular AVP, son capaces de actuar potenciando la actividad secretagoga de ACTH ejercida por el CRF (164).

Las investigaciones sobre los efectos de las aminas biógenas en el control de la liberación de adrenocorticotrofina (ACTH) son discrepantes. Estudios realizados por Ganong y col. (220) proveen evidencias que las catecolaminas actúan a nivel central inhibiendo la liberación de ACTH. Aunque la mayoría de sus trabajos fueron hechos en perros, se encontró que las catecolaminas también inhibieron la liberación de ACTH en la rata, el mono y el hombre. La administración de L-Dopa también inhibe la liberación de ACTH, pero el efecto depende de su conversión a noradrenalina (NA) más que a dopamina (DA). La inyección de un agonista dopaminérgico como apomorfina o de un antagonista como pimozide no ejerce ningún efecto sobre la liberación de ACTH. Por otro lado, la clonidina un agonista α -adrenérgico, inhibió la liberación de ACTH cuando se inyectó en el tercer ventrículo. Se cree que la NA inhibe la liberación del factor liberador de corticotrofina (CRF) actuando a nivel de las neuronas hipotalámicas donde éste se sintetiza. Jones y col. (156) demostraron en base a resultados de experimentos donde coincubaron hipotálamo e hipófisis, que el agregado de NA al medio de incubado disminuyó la liberación de ACTH, mientras que el agregado

de acetilcolina ó 5-HT aumentó la liberación de CRF y por lo tanto, la liberación de ACTH. DA no ejerció efectos significativos sobre la liberación de las hormonas antes mencionadas.

Existen evidencias que indican que 5-HT estimula la liberación de ACTH. La administración intraventricular de 5-HT en ratas fue efectiva así como la administración sistémica de 5-hidroxitriptofano (221). Los efectos del stress sobre el metabolismo de 5-HT en el hipotálamo no se han dilucidado, pero en los trabajos de Mueller y col. en rata (222) se demostró que la concentración de 5-HT y su turnover aumentaban durante el stress por inmovilización. Esta observación está de acuerdo con la hipótesis que la 5-HT aumenta la liberación de ACTH. Aunque la sensibilidad y la especificidad de la respuesta en la liberación de ACTH frente a NA no fue estudiada con detalle, en trabajos anteriores (223) la disminución provocada por fentolamina 10 μ M (un antagonista α -adrenérgico) en la respuesta estimuladora de liberación de ACTH ejercida por NA 3 μ M, ya sugería un mecanismo α -adrenérgico.

La presencia de terminales nerviosos noradrenérgicos en la zona externa de la EM (224) y la elevada concentración de NA en esta área (225) sugieren la posibilidad de que un receptor α -adrenérgico podría desempeñar un rol fisiológico en el control de secreción de ACTH. Más aún, la concentración de la enzima dopamina- β -hidroxilasa, que convierte DA en NA, se encuentra en una elevada concentración en la EM, comparada con otras estructuras hipotalámicas (226). Corroborando este concepto, se ha encontrado un sistema retículo infundibular noradrenérgico que termina en la EM y el tallo infundibular (227). Experimentos realizados por Vincent Raymond y col. en 1981 (157) con incubados de células adenohipofisarias de rata, demostraron que NA y A actúan directamente a nivel hipofisario aumentando la liberación de ACTH y otros péptidos relacionados a concentraciones que tienen significación fisiológica. En forma análoga al control que ejerce DA sobre la secreción de Prl en la adenohipófisis de rata (228,229) se piensa que NA y A de origen central y/o periférico están involucradas en la regulación de la secreción de ACTH al menos en la rata (157).

Se postula por lo tanto, que los péptidos neurohipofisarios y las catecolaminas podrían participar en la regulación fisiológica de la respuesta al stress, modulando

la respuesta al CRF de las células corticotropas adenohipofisarias en la rata.

Como conclusión, diremos que las células corticotropas del lóbulo anterior son estimuladas para secretar ACTH por: CRF 41 aa, AVP, OT, adrenalina y otras aminas biógenas. Esta estimulación puede ser inhibida por glucocorticoides (216,217). Los resultados obtenidos tanto in vivo como in vitro son consistentes con un rol fisiológico del CRF de 41 aa en la regulación neurohumoral de las células corticotropas adenohipofisarias (154, 164, 210).

CAPITULO V. REGULACION DE LA PARS INTERMEDIA

Teniendo en cuenta las diferencias en la función de la pars distalis (PD) (sector corticotropo) y de la pars intermedia (PI), incluyendo las diferencias en el procesamiento de POMC, no es sorprendente que estén controladas por diferentes señales provenientes del cerebro y a su vez, que esto se refleje en diferencias en la innervación, vascularización y hasta en su estructura anatómica.

1. VASCULARIZACION DE LA PARS INTERMEDIA

La vascularización de la pars intermedia es escasa y está confinada a la zona que queda entre la pars intermedia y la pars nervosa, dentro del tabique conectivo que establece el límite entre ambos lóbulos hipofisarios. En la rata, el lecho vascular de la pars intermedia se origina del plexo capilar de la pars nervosa, que proviene de las arterias hipofisarias posterior y peduncular (corresponde a la arteria hipofisaria inferior en el ser humano) (Fig. 12). Este plexo capilar se puede anastomiar con los vasos porta cortos, que se localizan en la superficie dorsal y caudal de la glándula que cruza la superficie de la pars intermedia y termina en los sinusoides de la adenohipófisis (pars distalis). Estos vasos porta cortos no pasan a través del tejido de la PI ni a través de la hendidura hipofisaria (230) (véase Fig. 12). Aunque se ha postulado que ramificaciones de la arteria hipofisaria posterior se conectan con el plexo primario de la eminencia media (231), es muy poco probable que los factores hipotalámicos secretados por la eminencia media intervengan en el control de la secreción hormonal de la pars intermedia del modo que ocurre en la PD. En algunas especies de reptiles (lagartija), la pars intermedia tiene un aporte sanguíneo considerable y una escasa innervación, por lo que se supone que los factores hipotalámicos podrían actuar sobre las células melanotropas de esta especie a través del sistema vascular (232).

Figura 12. Diagrama esquemático de la hipófisis de rata, donde se muestra la vascularización de la pars intermedia.

a. Sección sagital

b. Aspecto dorsal

2. INERVACION DE LA PARS INTERMEDIA

En contraste con la pars distalis, donde se han descrito escasas fibras nerviosas, la pars intermedia está profusamente inervada por axones que atraviesan la glándula, estableciendo sinápsis con las células melanotropas. Esto sugiere que la pars intermedia está bajo control nervioso directo. Desde la primera descripción hecha por Cajal en 1894 de que fibras nerviosas penetraban el lóbulo intermedio se han reportado terminales nerviosos catecolaminérgicos, peptidérgicos y colinérgicos en cantidades variables (233).

a. Inervación catecolaminérgica. En 1964, Iturriza (234) por técnicas de microscopía electrónica, y en 1965 Enemar y Falck (235) mediante observaciones histoquímicas postularon que el control hipotalámico directo de la pars intermedia de anfibios se ejercía a través de fibras adrenérgicas que establecían sinápsis con las células parenquimatosas sin intervención de la eminencia media o del sistema porta-hipofisario. Posteriormente, en 1966, Iturriza presentó evidencias que indicaban que el control inhibitorio hipotalámico de la pars intermedia de los anfibios estaba mediado por catecolaminas (236).

Por técnicas inmunohistoquímicas de fluorescencia y utilizando microscopía electrónica se ha demostrado que la pars intermedia de mamíferos, al igual que la de vertebrados inferiores, presenta una inervación catecolaminérgica de origen central (237,238). Las fibras de este sistema forman una densa red que establece sinápsis con las células de la pars intermedia.

La naturaleza monoaminérgica de la inervación fue sustentada por la identificación química de dopamina (DA), noradrenalina (NA), 5-hidroxitriptamina (5-HT), histamina y el elevado contenido de monoaminoxidasa de la pars intermedia de la rata (239,240); como DA era la catecolamina predominante, se postuló que estas fibras eran dopaminérgicas (237). Una prueba concluyente para esta hipótesis fue aportada por Bjorklund y col. en 1973 (241) quien utilizando microespectrofluorometría para establecer la identidad precisa de las monoaminas almacenadas en las fibras, confirmó que la inervación catecolaminérgica del lóbulo intermedio de rata era exclusivamente dopaminérgica. Los cuerpos celulares de los que provienen los terminales nerviosos dopaminérgicos de la pars intermedia se encuentran en la

zona rostral del núcleo arcuato del hipotálamo (Fig. 13).

Esta vía dopaminérgica hacia la pars intermedia constituye parte del sistema DA-tubero-hipofisario, cuyos restantes componentes constituyen las fibras dopaminérgicas que se originan en el núcleo arcuato y la zona periventricular, que inervan el lóbulo nervioso, la eminencia media y el tallo hipofisario (241) (Fig. 13).

b. Inervación colinérgica. Se han demostrado terminales nerviosos colinérgicos en íntimo contacto con las células melanotropas de la pars intermedia del hurón (242). Las evidencias ultra estructurales e histoquímicas de una inervación colinérgica del lóbulo intermedio son escasas. Baumgarten y col. en 1972 (238) encontró muy escasas fibras colinérgicas en el lóbulo (LNI) de la rata y la actividad de la acetilcolinesterasa no fue detectada en extractos de LNI (240) ni de terminales nerviosos que inervaban la pars intermedia de la rata, gato, conejo y buey (243). Bargmann y col., 1967 (244) y Doerr-Schott y Follenius, 1970 (245) demostraron una inervación colinérgica en la pars intermedia de anfibios.

c. Inervación peptidérgica. En anfibios, Dierickx y Vandesande, 1976 (246) demostraron que la pars intermedia está inervada por fibras nerviosas peptidérgicas que contienen mesotocina o vasotocina. Estas fibras peptidérgicas se originan en pericariones neurosecretorios localizados en el núcleo preóptico magnocelular hipotalámico.

Las fibras que contienen material neurosecretor, raramente penetran dentro del lóbulo intermedio de la rata y del ratón (238, 247). Se han demostrado contactos tipo sinápsis entre las células de la pars intermedia y terminales nerviosos peptidérgicos (neurosecretorios) en el gato (244), sapo (248), conejo (249) y hurón (242). Aunque el origen preciso de estas fibras peptidérgicas no está claro, parecería que se originan en pericariones hipotalámicos y podrían estar implicadas en el control de la pars intermedia por factores hipotalámicos liberadores e inhibidores. Iturriza en 1984 demostró la presencia de terminales peptidérgicos en la pars intermedia de la rata (250).

3. NATURALEZA DEL CONTROL HIPOTALAMICO SOBRE LA PARS INTERMEDIA

La interrupción del tallo hipotalámico, provocada

Figura 13. Sistema dopaminérgico tubero-hipofisario de la hipófisis de rata. Sección sagital.

por sección del tallo hipofisario, por lesiones hipotalámicas y por trasplantes ectópicos de pars intermedia en anfibios, induce un aumento en la liberación de α -MSH (medida por el oscurecimiento de la piel); esto indicaría que el efecto de la innervación de la pars intermedia es predominantemente inhibitorio (235, 248, 251, 252). Este estado de hipersecreción, que seguía a la desconexión hipotálamo-hipofisaria, se interpretó que era causada por una interrupción en la transmisión del impulso de las neuronas dopaminérgicas arcuato-tubero-hipofisarias. Posteriormente, Iturriza en 1969 (253) e Iturriza y Kasal-Iturriza en 1972 (254) demostraron que en el sapo las catecolaminas DA y NA actuaban inhibiendo la liberación de α -MSH.

En los mamíferos, cuando se seccionaba el tallo hipofisario o se provocaban lesiones hipotalámicas, se observaba una marcada hipertrofia de las células melanotropas en la rata (255), cabra (256) y mono (257); esto sugirió que la pars intermedia de los mamíferos estaría bajo un control hipotalámico inhibitorio. Es necesario tener en cuenta que la hipertrofia de las células melanotropas de la pars intermedia puede, en parte, deberse a la vacuolización degenerativa de las mismas, lo que provoca un aumento en el tamaño de la glándula (258). Estudios cuantitativos de numerosos investigadores demostraron que no se observaba un agrandamiento de la pars intermedia luego de la sección del tallo hipofisario (258) o provocando lesiones en el hipotálamo medio-basal (259), lo que sugirió que la hipertrofia era una falsa impresión provocada por el aparentemente mayor tamaño de la pars intermedia en relación con el tamaño de la pars nervosa atrofiada (259). Cambios en las concentraciones plasmáticas e hipofisarias de α -MSH, provocados por lesiones hipotalámicas en mamíferos, no indican claramente la remoción de un tono inhibitorio.

En anfibios, se observa un aumento prolongado en la concentración plasmática de α -MSH con una disminución concomitante de la α -MSH hipofisaria luego de la desconexión hipotálamo-hipofisaria (232); por el contrario, en la rata se restablecen rápidamente los niveles basales de α -MSH luego de la desconexión hipotalámica. Una disminución en el contenido de α -MSH bioactiva e inactivo en la pars intermedia, acompañada de un aumento en la α -MSH plasmática, provocadas como consecuencia de lesiones hipotalámicas, constituyen la única evidencia in vivo de una influencia inhibitoria hipotalámica sobre los mecanismos

de regulación de la pars intermedia de la rata (259,260). Los niveles plasmáticos retornaron a sus niveles basales de secreción dos horas luego de producida la lesión, mientras que los niveles hipofisarios de α -MSH comenzaban a restituirse el día siguiente de producida la lesión y no había diferencias significativas respecto de los controles, una semana luego de haber producido la lesión. Si estos fenómenos son consecuencia de cambios en la relación de excreción renal de α -MSH, en la velocidad de síntesis de α -MSH en la pars intermedia o la interrupción de la ruta estimuladora sumado a la ablación de un posible tracto inhibitorio, no ha podido aún determinarse en forma concluyente. Se postuló que lesiones en el hipotálamo anterior, incluyendo el núcleo paraventricular (PVN) provocaban la ablación de una posible vía estimuladora, debido a que dichas lesiones provocaban aumento en el contenido hipofisario de α -MSH (261).

En 1979, Tilders y col. (262) mediante experimentos in vivo, confirmaron la hipótesis de que las neuronas dopaminérgicas tubero-hipofisarias mediaban los efectos inhibitorios ejercidos por el sistema nervioso central sobre la secreción de MSH en la rata. Con respecto a las aves, hasta el presente no hay estudios ni in vivo ni in vitro acerca de los mecanismos que regulan la secreción de α -MSH.

CAPITULO VI. CONTROL DE SECRECION DE α -MSH

1. EFECTO DE MONOAMINAS

Existen evidencias químicas y morfológicas que sugieren que el control de la pars intermedia (PI) se ejerce por inervación neuronal directa. Para proveer un correlato experimental a estas evidencias se ha probado el efecto de numerosos neurotransmisores exógenos sobre el funcionamiento de la pars intermedia, tanto in vivo como in vitro.

a. Estudios in vivo. Considerando la rica inervación monoaminérgica de la pars intermedia, se estudiaron los efectos de monoaminas, drogas que interfieren con la transmisión monoaminérgica y agonistas y antagonistas farmacológicos sobre esta glándula. Hay evidencias reportadas por Stoppani en 1942 (263) que demuestran el rol de las monoaminas sobre el control de la pars intermedia, quien demostró un efecto inhibitorio sobre los melanóforos ejercido por drogas simpático-miméticas y un efecto de expansión de los melanóforos ejercido por drogas simpático-líticas cuando eran administradas al Bufo arenarum. En la misma serie de experimentos se demostró que la adrenalectomía inducía un oscurecimiento de la piel en sapos intactos; esto no ocurría en sapos hipofisectomizados, lo que indicaba que las catecolaminas secretadas por las glándulas adrenales actuaban inhibiendo la liberación de la hormona melanocito-estimulante del lóbulo intermedio y no por una acción periférica sobre los melanóforos. Aunque en esta serie de experimentos la administración de drogas exógenas podría ejercer su efecto indirectamente a nivel hipotalámico, se concluyó que estas sustancias actuaban directamente a nivel hipofisario, alterando la liberación de MSH. Por otro lado, la adrenalectomía (que en sapos es muy difícil de realizar debido a que el tejido adrenal está muy adherido al riñón) podría desinhibir a la pars distalis y por ende, causar el oscurecimiento a través de la hipersecreción de ACTH, ya que esta hormona también posee efectos melanotróficos (véase capítulo VII).

El posible control monoaminérgico sobre la liberación

de MSH en vertebrados inferiores fué sustentado por el descubrimiento de que la reserpina (una droga que depleta todas las monoaminas) posee una actividad de expansión de los melanóforos, mientras que los inhibidores de la monoamina oxidasa, como el ácido dietilamida-lisérgico y la nialamida, provocan una inhibición de la expansión de los melanóforos (236,264,265). Se demostró que las catecolaminas jugaban un rol importante en la inhibición monoaminérgica de la pars intermedia, ya que la deplección de las catecolaminas, causada por la adrenalectomía o la α -metil-tirosina, inducía una dispersión de los melanóforos en sapos cuyo tallo hipofisario estaba seccionado (236) y en lagartijas intactas (266) y tanto noradrenalina (NA) como adrenalina (A) y dopamina (DA) provocaban un aclaramiento de la piel en tiburones que poseían lesiones hipotalámicas. Más aún, las drogas tranquilizantes derivadas de la fenotiazinas (sustancias que bloquean los receptores dopaminérgicos) provocaban la expansión de los melanóforos en Rana pipiens (267), en sapos (Bufo arenarum) cuyos tallos hipofisarios se hallaban seccionados (253) y en tiburón (268).

El efecto directo inhibitorio de las catecolaminas sobre la liberación de MSH de la pars intermedia fue demostrado por primera vez por Iturriza en 1969 (253) quien demostró que cuando se agregaba DA y NA en los ojos de sapos que contenían autotrasplantes hipofisarios, se producía un aclaramiento del color de la piel. Más tarde, Kastin y col. en 1971 (269) demostraron que NA, A y DA provocaban una agregación de los melanocitos cuando eran aplicadas directamente a través de una incisión, sobre la glándula hipofisaria de sapos que previamente se habían oscurecido debido a la remoción del hipotálamo.

Los primeros experimentos farmacológicos empleaban drogas neurolépticas del tipo de las fenotiazinas, las que provocaban una elevación en los niveles plasmáticos de α -MSH en la cabra (270) y rata (271). La elevación en los niveles plasmáticos de α -MSH iba acompañada de una disminución en el contenido hipofisario de α -MSH (272,273), lo que indicaba un aumento en la secreción de α -MSH luego del bloqueo dopaminérgico.

La administración in vivo de antagonistas dopaminérgicos como haloperidol (260, 274,275) o pimozide (260) provocaban un incremento en los niveles plasmáticos de α -MSH. Algunos autores detectaron una disminución dosis-dependiente del contenido hipofisario de α -MSH, luego de la administración de haloperidol o pimozide (259), otros no detectaron cambios

significativos en el contenido hipofisario de α -MSH (275). Estas discrepancias se podrían explicar debido a diferencias en los métodos de dosaje o en la velocidad de biosíntesis de α -MSH por las células melanotropas luego de dichos tratamientos. El aumento en la secreción de α -MSH luego del bloqueo farmacológico de la neurotransmisión dopaminérgica fue interpretado como que se producía debido a la interrupción del impulso en las neuronas arcuato-tubero-hipofisarias y dio sustento a la hipótesis del control ejercido por esta vía sobre la función de la pars intermedia.

La disminución de los niveles plasmáticos de α -MSH provocados por el agonista dopaminérgico 2-Br- α -ergocriptina (275) complementa esta teoría y aunque el contenido hipofisario de α -MSH en animales tratados con antagonistas dopaminérgicos permanecería inalterado (259,275), tanto apomorfina como 2-Br- α -ergocriptina inhibieron la disminución del contenido hipofisario de α -MSH inducido por lesiones electrotérmicas en el hipotálamo medio basal (259). Estos resultados demuestran que los receptores dopaminérgicos involucrados en el control dopaminérgico de la pars intermedia están localizados preferentemente en la glándula y no en el hipotálamo.

Estudios más recientes demostraron que la infusión de adrenalina (A) o isoprenalina (IP) en ratas anestesiadas por Nembutal inducía un aumento en las concentraciones plasmáticas de α -MSH (276, 277, 278). Este efecto era completamente bloqueado por el propranolol, un antagonista β -adrenérgico. Esto demuestra que in vivo las catecolaminas podrían ejercer un efecto estimulatorio sobre la secreción de α -MSH que estaría mediado por un receptor β -adrenérgico (279). Aunque los experimentos in vivo proveen evidencias que sustentan el control catecolaminérgico de la pars intermedia, no se puede descartar una acción indirecta a nivel hipotalámico de estas sustancias que podrían afectar el funcionamiento de la pars intermedia. Aunque se logre la desconexión hipofisaria por medio de lesiones hipotalámicas o sección del tallo hipofisario, no se puede descartar una posible influencia hipotalámica producida por una lesión incompleta o una regeneración neuronal no detectable. Por lo tanto, las pruebas concluyentes acerca de la capacidad de la pars intermedia de responder ante distintas sustancias sólo se obtendrán si la glándula se aísla de los complejos mecanismos de control que operan in vivo. Las experiencias in vitro posibilitan una evaluación complemen-

taria de la respuesta de la glándula ante estímulos exógenos y permiten descartar posibles interferencias hipotalámicas.

b. Estudios in vitro. Las principales técnicas que permitieron estudiar la naturaleza del control de secreción de MSH y péptidos relacionados de la pars intermedia, han sido: lóbulos neurointermedios incubados o sometidos a perfusión continua y células dispersas de pars intermedia incubadas o sometidas a perfusión continua. La respuesta de las células melanotropas se ha medido a través de cambios en los niveles de secreción de α -MSH y de otros péptidos derivados del precursor prooromelanocortina (POMC); también se han estudiado cambios en la actividad de la adenilato-ciclasa o en los niveles de 3',5'-adenosin-monofosfato-cíclico (AMP_c) en las células de la pars intermedia (280, 281).

La primera evidencia in vitro de la acción inhibitoria de las catecolaminas sobre la pars intermedia la aportaron Iturriza y Kasal-Iturriza en 1972 (254), quienes demostraron una acción inhibitoria de NA sobre la secreción de MSH en incubados de lóbulos neurointermedios de sapos. Posteriormente, Bowers y col. en 1974 (282) demostraron el mismo efecto para incubados de pars intermedia de rata. A partir de allí, otros investigadores confirmaron estos hallazgos en rata y extendieron los estudios a otros agonistas y antagonistas catecolaminérgicos y a otras monoaminas y neuropéptidos. La Tabla 3 resume los efectos in vitro de numerosas sustancias sobre la pars intermedia de mamíferos.

Los resultados de los experimentos in vitro corroboran los resultados de los estudios in vivo y sustentan un control catecolaminérgico de la pars intermedia, donde la DA ejerce una influencia predominantemente inhibitoria. La presencia de receptores dopaminérgicos en las células de la pars intermedia fué corroborada por las sucesivas respuestas inhibitorias provocadas por esta catecolamina y sus agonistas y la supresión de este efecto provocado por los antagonistas dopaminérgicos. Tilders y col., 1975, 1979 (262, 283) demostraron que los terminales nerviosos dopaminérgicos mediaban la inhibición liberando DA. Ellos demostraron que la inhibición en la liberación de α -MSH por parte del lóbulo neurointermedio, provocado por una elevada concentración de K^+ , se debía a una liberación de DA, de los terminales nerviosos dopaminérgicos. Esta liberación de DA no se observaba en lóbulos neurointermedios de

Tabla 3

Efectos de varias sustancias sobre la liberación de péptidos derivados
de POMC de pars intermedia de rata in vitro

SUSTAN- CIA	ESTIMULA- CION	INHIBICION	SIN EFECTO
DA	Briaud y col., 1979 ^d (287)	Bower y col., 1974 ^a (282) Hadley y col., 1975 ^a (286) Fischer and Moriarty, 1977 ^b (289) Voigt y col. 1978 ^c (288) Tilders, 1979 ^d (319) Smelik y Tilders, 1979 ^d (276) Munemura y col., 1980 ^c (281) Vermees y col., 1980 ^d (320) Tilders y col., 1981 ^d (284) Jackson y Lowry, 1983 ^f (285)	Kraicer y Morris, 1976 (321)
NA	Briaud y col., 1979 ^d (287) Jackson y Lowry, 1983 ^f (285)	Bower y col., 1974 ^a (282) Jackson y Lowry, 1983 ^f (285)	Bower y col., 1974 ^a (282) Kraicer y Morris, 1976 ^c (321) Voigt y col., 1978 ^c (288) Briaud y col., 1979 ^d (287)
A	Bower y Col., 1974 ^a (282) Tilders y col., 1980 ^d (322) Jackson y Lowry, 1983 ^f (285)	Bower y col., 1974 ^a (282) Tilders y col., 1980 ^d (322) Jackson y Lowry, 1983 ^f (285)	Kraicer y Morris, 1976 ^c (321)

SUSTAN- CIA	ESTIMULA- CION	INHIBICION	SIN EFECTO
IP	Bower y col., 1974 ^a (282) Munemura y col., 1980 ^c (281) Vermes y col., 1980 ^d (320) Tilders y col., 1981 ^d (284) Jackson y Lowry, 1983 ^f (285)		
5-HT	Kraicer y Morris, 1976 ^c (321) Fischer y Moriarty, 1977 ^b (289) Randle y col., 1983 ^f (323)		Fischer y Moriarty, 1977 ^b (289) Voight y col., 1978 ^c (288) Tilders, 1979 ^d (319) Vermes y col., 1978 ^d (320)
GABA		Hadley y col., 1977 ^b (324)	Voight y col., 1978 ^c (288)
HISTA- MINA			Kraicer y Morris, 1976 ^c (321) Voight y col., 1978 ^c (288) Briaud y col., 1979 ^d (287) Vermes y col., 1980 ^d (320)
ACETIL- COLINA	Fischer y Moriarty, 1977 ^b (289)		Hadley y col., 1975 ^a (286) Voigt y col., 1978 ^c (288) Briaud y col., 1979 ^d (287)
Alto K ⁺	*Schmitt y col., 1979 ^d (325) *Tilders, 1979 ^d (319) Briaud y col., 1980 ^d (287) Jackson y Lowry, 1983 ^f (285) *Randle y col., 1983 ^{f,d} (323)	Schmitt y col., 1979 ^d (325) Tilders, 1979 ^d (319) Vermes y col., 1980 ^d (320)	Bower y Hadley, 1972 ^b (326)

SUSTAN- CIA	ESTIMULA- CION	INHIBICION	SIN EFECTO
AMP _c	Baker, 1974 ^b (327) Briaud y col., 1980 ^d (328)		
Extrac- tos Hipota- lamicos	Kraicer y Morris, 1976 ^c (321) Fischer y Moriarty, 1977 ^b (289) Briaud y col., 1978 ^d (329)	Bower y col., 1971 ^a (312)	Hadley y col., 1973 ^a (307) Przewlocki y col., 1979 ^b (320) Vermes y col., 1980 ^d (320)
AVP	Fischer y Moriarty, 1977 ^b (289) Howe y Kishore, 1984 ^d (331)		Hruby y col., 1972 ^a (313) Kraicer y Morris, 1976 ^c (321) Fischer y Moriarty, 1977 ^b (289) Briaud y col., 1978 ^d (329) Voigt y col., 1978 ^c (288)
LVP			Przewlocki y col., 1979 ^b (330) Hruby y col., 1972 ^a (313) Kraicer y Morris, 1976 ^c (321) Vermes y col., 1980 ^d (320)
MIF		Celis y col., 1971 ^e (294) Celis, 1977 ^e (297)	Bower y col., 1971 ^a (312) Grant y col., 1973 ^{a,c} (303) Hadley y col., 1973 ^a (307) Fischer y Moriarty, 1977 ^b (289) Thody y col., 1980 ^d (332) Jackson y Lowry, 1983 ^f (285)
Acido toci- noico y toci- namida		Bower y col., 1971 ^a (312) Hruby y col., 1972 ^a (313) Hadley y col., 1973 ^a (307)	Grant y col., 1973 ^c (303) Hadley y col., 1975 ^a (286)

SUSTAN- CIA	ESTIMULA- CION	INHIBICION	SIN EFECTO
TRH	Tonon y col. 1980 ^d (314)		Kraicer, 1977 ^{b,c} (315)
CRF	Vale y col., 1983 (154)		
m	Kraicer y col., 1985 ^f (316)		

a: Incubados de hipófisis

b: Incubados de LNI

c: Incubados de células dispersas

d: LNI perfundidos

e: Incubados de mitades de hipófisis

f: Células dispersas perfundidas

* Alto K⁺ estimuló la liberación de ACTH biológicamente activa, pero inhibió la liberación de α -MSH.

ratas reserpinizadas o en ratas que tenían lesiones en la EM. En estos casos la falta de inhibición en la liberación de α -MSH provocada por el K^+ coincidía con la desaparición de los terminales nerviosos en estos animales.

La existencia de un control estimulatorio sobre la pars intermedia fue evidenciada in vivo (276,277,278) y luego corroborado por experiencias in vitro en las que se observó que IP aumentaba la secreción de α -MSH en lóbulos NI aislados (284) y en células dispersas de PI (285). Se postuló que su acción estaba mediada por receptores β -adrenérgicos en la PI que median la estimulación de la liberación hormonal (277,284). Estudios in vitro utilizando células dispersas de PI demostraron los efectos de varios neurotransmisores sobre la secreción de α -MSH y otros péptidos derivados de POMC. Se vio que la isoprenalina provocaba una liberación de α -MSH y sus efectos eran bloqueados por el propranolol, mientras que NA y A a bajas concentraciones (10^{-8} M) ejercen un efecto estimulatorio; a concentraciones intermedias (10^{-7} , 10^{-6} M) ejercían un efecto inhibitorio y luego estimulatorio; mientras que a elevadas concentraciones, el efecto era inhibitorio (285). El efecto de la acetilcolina in vitro varía según las diferentes especies ejerciendo un efecto estimulatorio sobre la liberación de α -MSH de incubados de PI de sapo y de ratón, mientras que no ejercía ningún efecto en PI de rata (286). Tampoco estimulaba la liberación de ACTH de lóbulos NI perfundidos (287,288). Por el contrario, Fischer y Moriarty, 1977 (289) demostraron que la acetilcolina provocaba la liberación de ACTH de lóbulos NI de rata incubados.

2. EFECTO DE PÉPTIDOS HIPOTALÁMIOS LIBERADORES (MRF) E INHIBIDORES (MIF)

a. Regulación por MIF y MRF. La teoría del control catecolaminérgico directo de la pars intermedia fué rebatida por algunos investigadores, quienes sostenían que la pars intermedia estaba regulada por un control monoaminérgico indirecto, a nivel hipotalámico, que regularía la síntesis, almacenamiento y liberación de los factores hipotalámicos responsables por un lado de la inhibición (factor inhibidor de la liberación de α -MSH o MIF) y por otro de la estimulación (factor liberador de α -MSH o MRF) de la liberación de α -MSH (293,294). Se cree que estos factores son de naturaleza hormonal neurohipofisaria. Hasta ahora no se ha demostrado cómo llegarían estos factores a la pars intermedia, aunque se ha postulado que podrían

ser transportados vía las fibras nerviosas peptidérgicas que se originan en el hipotálamo e inervan la pars intermedia de algunas especies.

La inyección intravenosa de extractos hipotalámicos de una variedad de especies de mamíferos provocaba un aumento en el contenido hipofisario de α -MSH en la rata (290,291). Los niveles aumentados en el contenido de MSH en la hipófisis de la rata fueron interpretados como que se debían a la acción de un factor inhibitorio en los extractos hipotalámicos que inhibía la liberación de esta hormona. La primera purificación de este factor fue hecha por Schally y Kastin, 1966 (290).

Por técnicas cromatográficas, utilizando Sephadex G50 de extractos hipotalámicos bovinos, se determinó que la actividad inhibitoria de la liberación de MSH, se localizaba en un área del cromatograma que correspondía a sustancias de bajo peso molecular. En experimentos posteriores se logró aislar y caracterizar, a partir de hipotálamos bovinos, dos péptidos que provocaban aclaramiento en la piel de sapos previamente oscurecidos por destrucción del hipotálamo (292).

El posterior análisis de la secuencia de aminoácidos del más abundante y potente de estos dos péptidos permitió determinar que su estructura primaria era idéntica a la cadena lateral de oxitocina y fue designado como "MIF I" (el cual de ahora en adelante nos referimos como MIF) para distinguirlo del segundo factor, menos potente, pentapeptídico, denominado "MIF II" (293). (Véase Tabla 4).

Al mismo tiempo, Celis y col., 1971 (294) también postularon que el MIF era el factor inhibidor de la liberación de MSH en la rata, ya que el mencionado tripéptido provocaba una disminución dosis-dependiente de la liberación de MSH, determinada in vivo por su capacidad para inhibir la deplección de los niveles hipofisarios de MSH provocada por la inyección endovenosa de extractos de eminencia media de rata (EM) (295) e in vitro por su habilidad para inhibir la liberación de MSH en incubados de mitades de pars intermedia.

Debido a que la fracción microsomal de la EM de rata era capaz de producir el tripéptido cuando se incubaba con oxitocina, se propuso que el MIF se formaba por la acción de exopeptidasas sobre oxitocina (294). El MIF era capaz de bloquear el aumento de los niveles plasmáticos de α -MSH provocado por lesiones en la EM (296), soluciones salinas hipertónicas y succión (297), lo mismo ocurría con los tripéptidos CO₂H-terminales de lisina-vasopresina

Tabla 4

PEPTIDOS IMPLICADOS EN EL CONTROL DE SECRECION DE MSH

SECUENCIA		REFERENCIA
FACTORES INHIBIDORES		
MIF I	H-Pro-Leu-Gly-NH ₂	Nair y col., 1971 (292)
MIF II	H-Pro-His-Phe-Arg-Gly-NH ₂	Nair y col., 1972 (293)
Tripéptido CO ₂ H-terminal de LVP	H-Pro-Lys-Gly-NH ₂	Celis y col., 1972 (296)
Tripéptido CO ₂ H-terminal de AVP	H-Pro-Arg-Gly-NH ₂	Celis y col., 1972 (296)
Acido tocinoico	<div>┌─── S-S ───┐ H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-OH</div>	Bower y col., 1971 (312)
Tocinamida	<div>┌─── S-S ───┐ H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-NH₂</div>	Bower y col., 1971 (312)
FACTORES ESTIMULATORIOS		
MRF	H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-OH	Celis y col., 1971 (294)
OXITOCINA		
<div>┌─── S-S ───┐ H-Cys-Tyr-Ile-Glu-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂</div>		

(LVP) y arginina-vasopresina (AVP) (véase Tabla 4) (296) y aunque eran menos potentes que el MIF, también se propuso que eran potencialmente factores inhibidores de MSH.

La presencia de actividad liberadora de MSH en los extractos de EM fué demostrada por Taleisnik y Orias en 1965 (295) y Taleisnik y Tomatis en 1967 (298), quienes demostraron que la inyección endovenosa de extractos de EM provocaban una disminución del contenido hipofisario de MSH tanto en animales intactos como en animales a los cuales se les había lesionado la EM, lo que indicaba que el factor presente en dichos extractos actuaba directamente a nivel hipofisario provocando la liberación de MSH. Dicho factor se denominó "MRF". La comparación de la actividad liberadora de diversas áreas hipotalámicas indicaba que el núcleo paraventricular (NPV) contenía la más alta concentración de actividad liberadora (299) y la posterior designación de este núcleo como el productor de MRF fue sustentado por los datos de Celis y Taleisnik, 1973 (300) quienes fueron capaces de producir un factor capaz de liberar MSH, luego de incubar la fracción mitocondrial proveniente de extractos del núcleo paraventricular con oxitocina. Debido a que el pentapéptido relacionado con la estructura cíclica abierta de la oxitocina era capaz de provocar la liberación de MSH de la hipófisis de animales intactos o lesionados, Celis y col, en 1971 (294) propusieron que el MRF estaba constituido por este pentapéptido (Tabla 2) y sugirieron que podría formarse por degradación de la estructura cíclica de la oxitocina para dar una estructura lineal abierta.

Celis y Taleisnik, 1973 (300) propusieron un mecanismo por el cual ambos, el MIF y el MRF se formaban a partir de un precursor común, la oxitocina. Se postuló que una peptidasa (E_2) presente en el núcleo paraventricular, promovía la formación de MRF y poseía una mayor afinidad por la oxitocina que una segunda enzima (E_1) que se encontró en la EM y promovía la formación del MIF. Por lo tanto, la mayor afinidad de la enzima E_2 por el sustrato, favorecía la formación de MRF, aunque la actividad relativa de ambas enzimas y la concentración del sustrato también se pensó que controlaban la formación de MIF y MRF, siendo mayor la cantidad de MIF formado cuando la concentración de oxitocina era elevada.

Estos mismos autores postularon que las catecolaminas

controlaban la secreción de α -MSH indirectamente, ejerciendo su acción a nivel hipotalámico. Ellos observaron que en ratas que habían recibido dosis de DA y NA en el tercer ventrículo, aumentaba la concentración de MIF en extractos de EM (301). Ellos postularon que las neuronas secretantes de MIF estaban inervadas por fibras catecolaminérgicas, que en condiciones de reposo, estimulaban tónicamente la secreción de MIF y por lo tanto provocaban la inhibición de la liberación de α -MSH (Fig. 14). Se postuló que un receptor α -adrenérgico estaba involucrado en este control, ya que la dibenamina provocaba una disminución del contenido hipofisario de MSH. Se postuló un segundo mecanismo de control inhibitorio que suprimía la inervación tónica catecolaminérgica y por lo tanto, provocaría la liberación de MSH, inhibiendo la secreción de MIF. Experimentos farmacológicos similares, en los cuales se inoculaba 5-HT, metisergida, para-clorofenilalanina y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el tercer ventrículo, llevaron a Taleisnik y col., 1974 (302) a hipotetizar que la inhibición presináptica de las neuronas catecolaminérgicas era ejercida por fibras serotoninérgicas que actuaban vía una interneurona GABA-érgica. No se descartó una inhibición directa sobre la neurona secretante de MIF (Fig. 14). Se consideraba que el aumento en la secreción de α -MSH era producido por la activación del sistema inhibitorio serotoninérgico. En este esquema no se incluyó ningún mecanismo por el cual MRF estimula la secreción de MSH.

Es necesario destacar que aunque la cadena lateral (3 aminoácidos) de la oxitocina ha sido postulada como el MIF, este compuesto ha sido ineffectivo en manos de numerosos investigadores, entre los que podemos mencionar a Grant y col., 1973; Vale y col. 1973; Wilson y Dodd, 1973; Terlou y col., 1974; Hadley y col., 1973; Barnawell y col., 1974; Thornton y Geschwind, 1975 y posiblemente otros incluyendo nuestro laboratorio (303-309). Los únicos resultados positivos, obtenidos utilizando este tripéptido, siguen originándose de un solo grupo de investigadores (310). Hasta el presente, no existen reportes subsiguientes de que Pro-Leu-Gly-NH₂ tenga efectos inhibitorios sobre la secreción de MSH (MIF) desde el hallazgo inicial de Kastin y col. (293,311), aunque Vivas y Celis, 1975 (310) sugirieron que los efectos de dicho tripéptido dependían de la dosis empleada. A dosis de 10-30 ng actuaría inhibitoriamente sobre la secreción de α -MSH, mientras que a dosis de 10⁵ ng actuaría estimulatoriamente.

Figura 14. Representación esquemática del mecanismo postulado por Taleisnik y col., 1972 (301) y 1974 (302), que controlaría la liberación de MIF.

Luego de más de diez años de la postulación del MIF (MIF I) como factor inhibidor de la liberación de MSH no existe un solo grupo independiente que haya comprobado los resultados de los grupos de Kastin y de Taleisnik. En cambio, el rol de DA como MIF se ha ido afianzando y al momento no existen dudas de que esta catecolamina ejerce el rol de MIF al menos en mamíferos. Es posible que MIF I tenga un rol indirecto en la inhibición de la secreción de MSH a través de DA.

b. Regulación por ácido tocinoico y tocinamida. La estructura cíclica de la oxitocina (ácido tocinoico y su amida tocinamida) (véase Tabla 4) inhibieron la secreción de MSH de para intermedia de rata, hamster, sapo y rana y se propuso que estas sustancias constituirían el factor inhibidor (312, 313). Sin embargo, se demostró que estos compuestos eran inefectivos (286, 296, 300, 303) y por lo tanto es poco probable que estas estructuras cíclicas de la OT tengan alguna implicancia en la regulación fisiológica de la secreción de α -MSH.

La importancia fisiológica de estos péptidos en la regulación fisiológica de la secreción de MSH en la rata es dudosa, debido al escaso número de fibras neurosecretorias que inervan la pars intermedia y dado que las evidencias producidas por los grupos que proponen la teoría de que la pars intermedia está controlada por MIF/MRF no han podido ser demostradas por otros grupos, el control que ejerce el hipotálamo, por medio de factores inhibidores y liberadores, sobre la secreción de α -MSH es aún motivo de investigaciones por parte de varios grupos. El rol de MIF y derivados de la oxitocina en otras clases de vertebrados es aún más incierto.

Es importante destacar que la hormona liberadora de tirotrófina (TRH) indujo la estimulación de la liberación de α -MSH de lóbulos neurointermedios de sapo (314), pero no del lóbulo neurointermedio (LNI) de rata (315), lo que sugiere que en ciertas especies el control de la secreción de las hormonas de la pars intermedia podría estar influido por neuronas peptidérgicas, además de catecolaminas.

c. Regulación por CRF. Los mecanismos que regulan la secreción de las hormonas derivadas del precursor POMC de las células melanotropas de la PI de la rata no han sido aún dilucidados de manera concluyente. Hay numerosos trabajos donde se probaron los efectos del CRF recientemente aislado y caracterizado de 41 amino ácidos, sobre la secre-

ción de las hormonas de la PI. En los primeros estudios in vitro realizados por Rivier y col., 1982 (210), se vio que utilizando preparaciones de CRF nativas, éstas no provocaron ningún efecto sobre la secreción de α -MSH de lóbulos neurointermedios. Estos autores postularon que tal vez las dosis ensayadas fueron insuficientes. Posteriormente, Vale y col., 1983 (154) utilizando dosis elevadas de CRF 41 aa sintético (hasta 100 nM) demostraron que a dosis superiores a 10 nM este péptido era capaz de estimular la secreción de las hormonas derivadas de POMC, en cultivos de células dispersas de PI de rata. Posteriormente, Kraicer y col. 1985 (316) utilizando incubados estáticos de LNI y LNI de rata sometidos a perfusión continua, demostraron que el CRF 41 aa sintético era capaz de estimular la liberación de α -MSH, ACTH y LPH. Nuestros resultados in vitro, utilizando el sistema de células dispersas perfundidas de PI de rata, demostraron que el CRF era capaz de estimular la liberación de ACTH, pero no la de α -MSH. Por otro lado, experimentos in vivo demuestran que inyecciones de oCRF 41 aa sintético provocan un aumento significativo en los niveles plasmáticos de α -MSH (317) en la rata. La demostración inmunohistoquímica de una sustancia CRF-símil en los terminales nerviosos del LNI de la rata y la disminución de la misma luego de seccionar el tallo hipofisario (Saavedra y col., 1984) (318) sustentaría la hipótesis de una inervación directa CRF-érgica de las células de la PI en la rata.

Como conclusión, diremos que: a) en mamíferos la DA ejerce el rol de MIF; b) que en éstos hay receptores adrenérgicos que median el efecto eminentemente estimulatorio de las catecolaminas A y NA sobre la secreción de MSH y c) en vertebrados inferiores, como por ejemplo los anfibios, las catecolaminas, en general, tienen efecto inhibitorio sobre la secreción de MSH.

En el caso de las aves, hasta el presente no hay estudios acerca del control de secreción de MSH y hasta hace pocos años se dudaba acerca de su existencia en esta clase de vertebrados. Es importante recordar que las aves carecen de pars intermedia y que las células que contienen MSH se localizan en la pars distalis (56); dado que la pars distalis de las aves está muy escasamente inervada es poco probable que estas células estén reguladas por un control nervioso directo.

CAPITULO VII. PROCESAMIENTO DIFERENCIAL DEL PRECURSOR PRO-OPIOMELANOCORTINA EN PARS INTERMEDIA Y PARS DISTALIS

1. ESTRUCTURA DEL PRECURSOR PRO-OPIOMELANOCORTINA (POMC)

A partir de 1953 se realizaron investigaciones que condujeron finalmente al aislamiento y determinación de la estructura primaria de ACTH ovina (o), porcina (p) y humana (h). White en 1953 aisló la primera preparación homogénea de pACTH y un año después estableció la estructura primaria de una forma pura de pACTH (β -corticotrofina) de 4500 daltons de peso molecular, que poseía no sólo propiedades corticotróficas, sino también actividad estimulante de los melanocitos (333).

El descubrimiento de la propiedad melanotrófica de ACTH renovó el interés por la sustancia hipofisiaria responsable de la pigmentación de la piel, descrita por Smith y Allen en 1916 (334). En 1955, Lerner y Lee aislaron y posteriormente determinaron la secuencia aminoacídica de dos péptidos melanotróficos provenientes de extractos de hipófisis de cerdo, a los que llamaron α - y β -MSH respectivamente (335). Una de ellas la α -MSH, posee 13 aminoácidos. Como ya se conocía la secuencia de aminoácidos de la ACTH, se comprobó que la α -MSH era idéntica, salvo dos modificaciones en los dos aminoácidos terminales, a la secuencia de los trece primeros aminoácidos de ACTH. La similitud estructural de ambas hormonas las asemeja también en sus actividades biológicas: ACTH posee actividad melanotrófica y α -MSH muestra, aunque muy débilmente, actividad glucocorticosteroidogénica.

En 1964, Ho Chao Li aisló y posteriormente determinó la secuencia aminoacídica de un péptido de 91 aminoácidos al que llamó β -lipotrofina o β -LPH. Esta molécula contenía en un sector de la misma, entre los residuos 41-58, la secuencia completa de aminoácidos de otra melanotrofina antes aislada de la pars intermedia: β -MSH.

En 1967, Chrétien y Li (337) aislaron de hipófisis ovinas otra sustancia lipolítica: la hormona γ -Lipotrófica (γ -LPH), que posee una secuencia de aminoácidos idéntica

a los residuos 1-58 de β -LPH.

Mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas utilizando antisueros específicos en cortes seriados, se pudo demostrar que β -MSH y ACTH no sólo coexisten en las células corticotróficas de la pars distalis, sino que además, se encuentran en la misma población de gránulos (338). Lo mismo ocurre con α -MSH y β -MSH en las células melanotróficas de la pars intermedia (339).

Posteriormente, varios grupos de investigadores describieron el hallazgo de cantidades apreciables de ACTH en la pars intermedia, lo que indujo a pensar que esta hormona podría ser el precursor biosintético de α -MSH en este sector de la hipófisis. Esta hipótesis fue reforzada por Lowry y col., 1974 (340) quienes hallaron un péptido de 23 aminoácidos aislado de partes intermedias de rata y cerdo, cuya secuencia era idéntica a los últimos 23 aminoácidos de ACTH. Ello sugería que en este sector de la hipófisis la ACTH se escindía en dos: α -MSH por un lado y el péptido mencionado por el otro, al que se llamaría CLIP. Entre medio de estos dos sectores, queda un resto de tres aminoácidos que es digerido inmediatamente después del corte enzimático.

Entre 1971 y 1975, Yallow y Berson (341) detectaron en extractos hipofisarios humanos y en tumores extrahipofisarios de la misma especie que producen ACTH, una proteína de alrededor de 30.000 daltons de peso molecular. Esa proteína poseía algo de actividad corticosteroidogénica y tenía similitudes antigénicas con ACTH, lo que hizo suponer que la secuencia de aminoácidos de ACTH, o al menos una parte importante de ella, estaba contenida dentro de la de esta proteína.

En 1975, Eipper y Mains (342) trabajando con la línea de células tumorales AtT20-D16v derivadas de un tumor hipofisario de ratón, demostraron que la "ACTH grande" no era un artefacto provocado por agregación proteica. En este material se encontraron cuatro formas de ACTH de pesos moleculares: 4.500, 13.000, 23.000 y 31.000 daltons, designadas como 4,5 Kd, 13 Kd, 23 Kd y 31 Kd-ACTH, respectivamente.

En 1975, Cox (343) comunicó el hallazgo de un péptido opioide en extractos de pACTH comerciales. Li y Chung, 1976 (344) aislaron de hipófisis de camellos un péptido cuya secuencia coincidía con 31 aminoácidos de β -LPH; se lo llamó β -endorfina. Bradburg y col. en 1976 (345) hallaron dos péptidos opioides adicionales: α -endorfina y δ -endorfina.

Hasta aquí no habían aparecido pruebas concluyentes de la relación entre lipotrofina y ACTH, salvo en las similitudes de sus secuencias. Cuando se pudieron dosar los niveles plasmáticos de ACTH y β -LPH, se observó que ambos fluctuaban en concordancia, cualesquiera fueran las variables experimentales utilizadas en animales de laboratorio o en situaciones clínicas en el humano; más aún, mediante técnicas inmunohistoquímicas se demostró que ambas ACTH y β -LPH coexistían en el mismo tipo celular de la pars distalis: en las células corticotróficas. Estos hallazgos sugirieron que los péptidos relacionados con ACTH y β -LPH tenían un origen común.

El concepto de precursor común fue confirmado por dos grupos de investigadores. Roberts y Herbert en 1977 (346) realizaron la traducción de un sistema libre de células del ARN_m extraído de células del tumor AtT20, obteniendo una forma de ACTH de 28.500 daltons de peso molecular.

Casi simultáneamente, en 1978, Mains y Eipper (347) utilizando una línea tumoral hipofisaria, establecieron la existencia de un precursor común glicosilado para ACTH y LPH, con un peso molecular de 31 Kd. Utilizando experimentos de incorporación de aminoácidos radiactivos (pulse chase), demostraron que esta molécula de 31 Kd era convertida en dos fragmentos: uno de 23 Kd que precipitaba solamente con un antisuero anti- β -ACTH y otro fragmento de 11 Kd que solamente precipitaba con un antisuero que reconocía β -lipotrofina y aparentemente correspondía con la β -lipotrofina en el ratón. El fragmento 23 Kd ACTH era procesado para originar un fragmento 4,5 Kd ACTH que era indistinguible de 1-39 ACTH (347).

El precursor fue denominado pro-opiomelanocortina (POMC) (348) por los productos biológicamente activos que se obtienen a partir de él. La región aminoterminal (no ACTH, no β -LPH) de POMC se conoce como N-POMC.

El uso de un m-RNA aislado de pars intermedia bovina, seguido de la síntesis del c-DNA y el posterior análisis de su secuencia nucleotídica, permitieron la identificación de la secuencia completa de aminoácidos del pre-precursor de ACTH y LPH (349) (Fig. 15) que solo se conocía parcialmente hasta ese momento.

Estos datos demuestran que la maduración de los péptidos requiere, como en otros precursores proteicos, la presencia de pares de aminoácidos dibásicos como se había descrito hace más de diez años, cuando se había propuesto

Figura 15a. Pre-proopiomelanocortina: distribución de pares de residuos de aminoácidos básicos.

Figura 15b. Pre-secuencia (señal) bovina: 26 aminoácidos

que β -LPH era una prohormona. En la Fig. 15 aparecen los pares de aminoácidos dibásicos donde se realizan los cortes que generan ACTH, β -LPH, β -MSH y β -endorfina. El origen de α -MSH representa una excepción a esta regla. En el extremo C-terminal, el corte se produce en Arg 17-Arg 18 quedando tres residuos básicos en el extremo C-terminal que son cortados secuencialmente por una enzima del tipo carboxipeptidasa "B" para producir 1-14 ACTH (350). Smyth en 1977 propuso que α -MSH podría originarse a partir de 1-14 ACTH, por acción de una enzima proteolítica que hidrolizaría la gly¹⁴ en la unión $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ dejando, por lo tanto, un grupo amida en el extremo C-terminal (351).

Aunque Nakanishi y col. en 1979 (349) tuvieron éxito en determinar la secuencia aminoacídica completa del precursor (265 aminoácidos) no fueron capaces de establecer la longitud del péptido señal (presencia en el extremo N-terminal). Esto solamente fue posible comparando las secuencias parciales deducidas para el precursor de líneas tumorales de ratón y de pars intermedia de rata. A partir de estos datos se demostró que el péptido señal tiene 26 residuos de aminoácidos (352,353). La secuencia de aminoácidos de muchos de los péptidos señal conocidos revela la presencia de un gran número de aminoácidos hidrofóbicos en todas ellas. Experimentos de incorporación de aminoácidos marcados (pulse chase) revelaron que el péptido señal se libera a los pocos minutos, mientras que el procesamiento del precursor para dar los productos finales ocurre al cabo de 2 hs (354-356).

Una tercera MSH, a la que se denominó γ -melanotrofina (γ -MSH) se encontró incluida en el glicopéptido N-terminal (N-POMC) que posteriormente fue aislado de hipófisis humanas por Estivariz y col., 1980 (357). Esta γ -MSH posee una secuencia heptapeptídica idéntica a la que contienen ACTH, β -LPH, α -MSH, γ -LPH y β -MSH y es la que les confiere a todos estos péptidos sus propiedades biológicas.

2. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESAMIENTO DE POMC

La estructura primaria del precursor pro-opiomelanocortina sugiere que su procesamiento probablemente requiera de la acción de una enzima tripsina-símil que hidrolice los pares de aminoácidos básicos, seguida de una carboxipeptidasa B que hidrolice los residuos básicos de los péptidos originados. El procesamiento del precursor comienza

en el retículo endoplásmico rugoso (RER), continua en el Golgi y se completa en los gránulos de secreción. La actividad de las enzimas involucradas en el procesamiento se estudió en estos últimos. En los trabajos de Loh y col. 1982 (358) se demostró que esta enzima era inactiva a pH 7,4 y también se inactivaba en presencia de un inhibidor de las tiol-proteasas, por lo que se concluyó que la enzima procesadora del precursor era una tiol-proteasa ácida. Esta enzima muestra una elevada especificidad para la molécula de pro-opiomelanocortina, ya que no hidroliza péptidos con un solo residuo básico, péptidos sintéticos con 2 residuos básicos, proinsulina, proglucagón, ni prosomatostatina (358). La conformación del sustrato podría contribuir significativamente a la especificidad enzimática en escisión.

Los péptidos derivados del precursor, ACTH, α -MSH, endorfinas y otros, sufren una serie de modificaciones como glicosilación, fosforilación, amidación y acetilación. Parece ser que la glicosilación y la fosforilación serían eventos cotraduccionales. Estas modificaciones ocurrirían durante la traducción de pro-opiomelanocortina previo al procesamiento proteolítico (359). Moléculas de ACTH glicosiladas o fosforiladas pueden, por lo tanto, originarse por proteólisis limitada de las respectivas formas modificadas del precursor POMC. β -endorfina puede ser acetilada en la Tyr N-terminal para dar una forma acetilada, encontrada fundamentalmente en el lóbulo intermedio. La amidación y la acetilación ocurren luego de haberse producido la escisión de los péptidos derivados de POMC (360,361) y se produce fundamentalmente en la PI.

3. PROCESAMIENTO DE POMC: PARS DISTALIS

Los principales productos de secreción de la adenohipofisis de los mamíferos son ACTH, β -LPH y péptidos de la porción N-terminal de POMC (1-103 N-POMC y 1-76 N-POMC o pro- γ -MSH) (véase Fig. 16), que se segregan en cantidades equimoleculares. Además, algunas moléculas correspondientes a β -LPH se escinden nuevamente, generándose dos péptidos: γ -LPH y β -endorfina, secretados por las células corticotropas en cantidades variables según la especie. Se demostró que estas cantidades secretadas eran idénticas a las encontradas en extractos frescos fuertemente ácidos de tejido adenohipofisario. Esta observación es de particu-

lar interés, ya que implicaría que el procesamiento del precursor se realiza rápidamente luego de su síntesis; de lo contrario, las moléculas del precursor serían más abundantes en los extractos y los péptidos más pequeños más abundantes en los productos de secreción (362).

Utilizando un antisuero anti- α -MSH, se ha podido detectar la presencia de células que contienen ese péptido en la adenohipófisis de la rata (363). Por lo tanto, podría ocurrir que existieran dos tipos de células corticotropas diferentes, uno que secretaría fundamentalmente ACTH, β -LPH y péptidos N-POMC, y otro que se encontraría en mucho menor proporción y que secretaría los péptidos más pequeños: α -MSH, CLIP, β -endorfina y péptidos N-POMC. Ambos tipos celulares estarían bajo control hipotalámico estimulatorio (362).

Alternativamente podría ocurrir que un solo tipo celular pudiera producir también pequeñas cantidades de los péptidos más pequeños.

4. PROCESAMIENTO DE POMC: PARS INTERMEDIA

Una característica llamativa de este lóbulo es la gran variabilidad que presenta en cuanto al espectro de péptidos que produce a partir del precursor POMC. En un extremo encontramos al humano donde se ha demostrado que la pars intermedia fetal (el adulto carece de pars intermedia) procesa el precursor, pero en forma limitada (364) y en el otro extremo está la rata, donde se han identificado más de diez péptidos derivados del precursor (365). Se han detectado cantidades significativas de β -lipotrofina en extractos de pars intermedia de oveja, mientras que en la rata sólo ha podido ser detectada por medio de técnicas de incorporación de amino ácidos radioactivos (365). (véase Fig. 16). β -LPH en la pars intermedia se escinde para dar γ -LPH y β -endorfina. Tanto γ -LPH como β -endorfina se han detectado en todas las especies hasta ahora estudiadas.

Se ha demostrado que la β -endorfina puede estar acetilada en el residuo de tirosina N-terminal y esta forma acetilada es la más abundante en la pars intermedia (351-361). β -MSH y el fragmento N-terminal de LPH (β -LPH 1-38) se forman a partir de γ -LPH (Fig. 16). Se han aislado otros fragmentos C-terminales de β -LPH a partir de extractos de pars intermedia: γ -endorfina (β -LPH 61-

Procesamiento del precursor común para ACTH y su familia
de péptidos: pro-opiomelanocortina (POMC)

Figura 16. En la parte superior se esquematiza la POMC; hacia abajo y en la secuencia en que se suceden, se exponen los pasos del procesamiento enzimático que va fragmentando a los péptidos mayores. En azul se denotan aquellos péptidos que constituyen los productos principales de secreción de las células corticotróficas de la pars distalis; en verde, los péptidos originados a partir de los anteriores que las células corticotróficas también segregan; en amarillo, los formados en el último paso del procesamiento que ocurre en la pars intermedia y, por tanto, son los productos principales de secreción de ese sector de la hipófisis. Las líneas verticales punteadas indican los sucesos de ataque enzimático que conducen al paso siguiente del procesamiento. Estos ocurren donde hay pares de barras (color rosado) que señalan la ubicación de los aminoácidos dibásicos consecutivos. Los sectores en blanco señalan la posición de la secuencia heptapeptídica repetitiva. CHO recuadrado corresponde a la cadena glicosídica adosada a la porción N-terminal del precursor. En las moléculas precursoras se indica el peso molecular en kilodalton (KD). Los péptidos que se originan a partir de la región N-terminal del precursor se designan por las siglas N-POMC seguidas de una cifra que corresponde al número de aminoácidos que lo conforman.

77), α -endorfina (β -LPH 61-76) y el C-fragmento (β -LPH 61-87) (366) (Fig. 17).

Los péptidos derivados de ACTH 1-39: α -MSH y CLIP han sido demostrados en todas las especies estudiadas.

La ACTH 1-13 originada por el clivaje de la ACTH 1-39 en la pars intermedia sufre una amidación en el extremo C-terminal del residuo de valina y una acetilación en el extremo N-terminal en el residuo de serina para originar α -MSH.

El otro fragmento derivado del precursor que ha sido detectado en la pars intermedia es el extremo N-terminal del precursor, denominado 1-76 N-POMC o pro- γ -MSH. Este fragmento contiene el "core" heptapeptídico críptico de MSH denominado γ -MSH por Nakanishi y col., 1979 (349). Otros péptidos más pequeños derivados de este fragmento han sido identificados en la pars intermedia. El fragmento 1-48 N-POMC ha sido identificado y aislado a partir de hipófisis humanas (357, 367) y de rata (368).

Las células de la pars intermedia están bajo la inhibición tónica ejercida por dopamina y son estimuladas por agentes β -adrenérgicos (285). Ninguno de los secretagogos probados hasta ahora provocan una liberación diferencial de los péptidos derivados de POMC en células de pars intermedia de la rata.

En conclusión, tanto las células corticotropas de la PD como las melanotropas de la PI sintetizan una molécula precursora que es idéntica en ambos casos. La diferencia en cuanto a los productos finales de secreción reside en la forma diferente en que es procesado el precursor en uno y otro tipo celular debido a la diferencia en las enzimas procesadoras. En términos generales, en la PI el procesamiento es más exhaustivo, ya que se generan péptidos más pequeños a expensas de los mayores. Esta diferencia en tamaño, asociada con otras modificaciones post-transcripcionales (acetilación, amidación, etc.), les confieren actividades biológicas diferentes a los péptidos de uno y otro sector de la hipófisis (v.g. sector corticotropo de la PD y PI).

Nada se sabe con respecto al procesamiento del precursor en aves y menos aún si es del tipo del que se produce en las células corticotropas de la PD o en la PI de los mamíferos. Sólo se sabe, como se lo mencionó anteriormente, que en la PD se procesa tanto ACTH como α -MSH (55) y que ambos péptidos coexisten en la misma célula (56). Se han reportado indicios de la existencia de una molécula precursora en extractos de hipófisis de pato (55).

Figura 17. Secuencia aminoacídica de varias endorfinas.

CAPITULO VIII. OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación tiende a completar mi Tesis Doctoral en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. El tema del mismo versa sobre "El control de secreción de α -MSH y ACTH de la hipófisis del pato". Nuestro interés en estudiar el control de secreción de las hormonas antes mencionadas en el pato, se basó en el hallazgo de que pese a que las aves constituyen la única clase entera de vertebrados cuya hipófisis carece de pars intermedia, hemos demostrado bioquímicamente la existencia de α -MSH (una de las hormonas típicas de la pars intermedia de los mamíferos) en la adenohipófisis de esta ave (55). Posteriormente, también demostramos por técnicas de inmunohistoquímica, que α -MSH coexiste conjuntamente con ACTH en el mismo tipo celular de la adenohipófisis del pato, al que denominamos corticomelanotropo (CM). Dichas células se encuentran localizadas en la zona ventral del lóbulo cefálico de la pars distalis (PD) (56). De ahí en más, nos interesó saber qué tipo de control ejerce el hipotálamo sobre estas células, o sea, cómo está regulada la secreción de estas hormonas. Como es bien sabido, la secreción de α -MSH está regulada en animales que tienen pars intermedia por factores inhibidores de origen hipotalámico (236, 253, 284, 285, 288), mientras que la secreción de ACTH de todas las especies estudiadas hasta ahora (excluyendo las aviares) está regulada por factores liberadores hipotalámicos (154, 164, 165, 195) por lo tanto, intentamos determinar:

a. Si las células corticomelanotropas que se localizan en la pars distalis de la hipófisis del pato no solo contienen, sino secretan, tanto ACTH como α -MSH, o si solamente una de ellas es la hormona secretada predominantemente. En el caso de que ambas hormonas sean secretadas, si la secreción de las mismas se hace en forma concomitante o coordinada.

b. De ser la secreción de estas hormonas concomitante, qué tipo de control ejerce el hipotálamo sobre estas

células, es decir, cómo está regulada la secreción de estas hormonas:

i. ¿Es del tipo pars intermedia, donde se ejerce un control inhibitorio mediado fundamentalmente por catecolaminas (Dopamina)?

ii. ¿Es del tipo pars distalis, donde se ejerce un control mediado por factores liberadores: la corticoliberina (CRF)?

Para lograr nuestros objetivos, se ensayarán tres sistemas de bioensayo in vitro: incubados estáticos de pedazos de adenohipófisis, incubados estáticos de células dispersas de adenohipófisis y por último, células dispersas de adenohipófisis de pato empaquetadas en una columna junto con Bio-Gel P2 y sometidas a perfusión continua. Los tres sistemas mencionados se pondrán a punto procediendo a continuación a elegir el que se adapte mejor a nuestros requerimientos experimentales, teniendo en cuenta sus características de precisión, practicidad y sensibilidad. Para valorar la ACTH y α -MSH liberadas por las células adenohipofisarias de pato, se pondrán a punto sistemas de radioinmunoensayo de ACTH y α -MSH de mamíferos que serán adaptados por nosotros al material de pato.

La preparación de células dispersas de adenohipófisis de pato será sometida a los siguientes estímulos:

1. Extractos hipotalámicos de pato.
2. Vasopresina (AVP) y su análogo presor en las aves, vasotocina (AVT).
3. Oxitocina (OT) y su análogo oxitócico en las aves, mesotocina (MT).
4. El factor liberador de corticotrofina ovino sintético de 41 aminoácidos (CRF 41), aislado recientemente.
5. Vasopresina combinada con cantidades iguales en peso de CRF, para determinar un eventual efecto sinérgico entre estos péptidos, tal como el que ha sido descrito en la rata.
6. Diferentes aminas biógenas como dopamina (DA), adrenalina (A), noradrenalina (NA), fenilefrina (Phe) e isoproterenol (IP).

Creemos que al igual que en el resto de los mamíferos hasta ahora estudiados, la actividad secretagoga de ACTH y eventualmente de α -MSH de los extractos hipotalámicos de pato utilizados para provocar la liberación de estas hormonas en las células adenohipofisarias de esta ave, estaría conformada por un sistema de multicomponentes,

entre los que podemos mencionar: CRF o un péptido similar, AVT, MT y catecolaminas (NA, A). De ser esto cierto, se tratará de comprobar la presencia de las sustancias antes mencionadas en dichos extractos. Para ello se dosará bioquímicamente A, NA y DA. La determinación de las catecolaminas (NA, A y DA) en los extractos de hipotálamo de pato se realizará con la colaboración del Dr. Zieher del Instituto de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Buenos Aires. Se intentará poner a punto un sistema de radioinmunoanálisis de AVT para dosar el contenido de AVT en los extractos hipotalámicos de pato; con el mismo fin se adaptará un sistema de radioinmunoanálisis de CRF de rata al material de pato. A su vez se intentará determinar la presencia de AVT y CRF utilizando en el primer caso una técnica de coloración para neurosecreción denominada aldehidofucsina y en el segundo caso inmunohistoquímica para CRF utilizando la técnica de peroxidasa antiperoxidasa (PAP) adaptada al material de pato.

Como se especificó anteriormente, se investigarán los efectos secretagogos sobre ACTH y α -MSH de las aminas biógenas, tanto de las catecolaminas DA, NA y A como de los neurofármacos fenilefrina e isoproterenol en células adenohipofisarias de pato. En el caso de encontrar algún efecto, se intentará investigar a través de qué receptor se halla mediada la respuesta a aquellas sustancias. Para ello se bloquearán los receptores con antagonistas específicos dopaminérgicos, α - y β -adrenérgicos. También se estudiarán los efectos in vivo de algunas de estas aminas biógenas; para ello se inocularán animales en forma intraperitoneal con las diferentes aminas a ensayar y luego se dosarán los niveles plasmáticos de ACTH y α -MSH, utilizando sistemas de radioinmunoanálisis adaptados para dosar estos péptidos en el plasma del pato.

Uno de los procedimientos empleados para estudiar la naturaleza del control hipotalámico sobre las funciones hipofisarias es el transplante de la adenohipófisis a lugares ectópicos. Es nuestra intención estudiar los efectos de la desconexión hipotalámica de la hipófisis sobre la secreción de ACTH y α -MSH en el pato. Para ello, se efectuarán trasplantes de adenohipófisis de pato en cámara anterior del ojo de patos receptores y una vez que se hayan adaptado a la situación ectópica, se dosarán los niveles plasmáticos de las hormonas antes mencionadas. También

es nuestro interés estudiar la capacidad de respuesta de los trasplantes de adenohipófisis in vitro. Para ello, se utilizarán incubados de pedazos de adenohipófisis extraídos in situ y se comparará su capacidad de respuesta tanto en condiciones basales (incubados con buffer solamente) como en condiciones de estimulación (incubados con buffer al que se les agregará una dilución de extractos hipotalámicos), con la capacidad de respuesta ante los mismos estímulos de los trasplantes incubados en las mismas condiciones que los pedazos de adenohipófisis. Las hormonas liberadas al medio de incubación se dosarán por radioinmunoanálisis.

Con respecto a la importancia del proyecto y la posible trascendencia que los resultados a obtenerse puedan significar, es digno destacarse que el modelo elegido presenta particularidades semejantes a la situación que ocurre en el humano adulto, en el que no existe una pars intermedia (PI) como sector segregado de la adenohipófisis, ya que la PI en los humanos involuciona a partir del nacimiento, pudiendo estar la secreción de los péptidos típicos de la pars intermedia a cargo de las células corticotropas adenohipofisarias, como es el caso de las aves (369); por lo tanto, el pato se constituye en un modelo experimental adecuado con el que se podría contribuir a esclarecer los mecanismos de regulación de la secreción de sustancias melanotropas en el hombre.

A este respecto, recientemente se ha demostrado por técnicas inmunohistoquímicas, que en la hipófisis humana de adultos, las células que son inmunorreactivas para α -MSH se localizan en la PD. En cortes seriados se demostró que las células que eran inmunorreactivas para α -MSH también lo eran para ACTH (370) este hallazgo presenta una gran analogía con lo encontrado por nosotros en el pato, lo que acrecienta el interés por dilucidar los mecanismos que regulan la secreción de ambas hormonas en esta ave. Más aún el interés en un sector melanotropo o corticomelanotropo en el hombre se ha acrecentado debido a investigaciones recientes realizadas por Lamberts y col. (371) en las que se ha demostrado que la enfermedad de Cushing en el hombre puede originarse en mayor porcentaje por adenomas hipofisarios secretantes de ACTH, localizados en la adenohipófisis, pero existen también adenomas secretantes de ACTH que son tumores de lóbulo intermedio que contienen tejido nervioso. Ambos tipos de adenomas tienen diferente control de secreción ya que unos responden como las células corticotropas de la pars distalis de los mamíferos y los otros como las

melanotropas de la PI de los mamíferos. Estos últimos tienen características histoquímicas y farmacológicas que corresponden al tipo de células originario de la PI, con lo que podría ser de suma importancia el estudio del sector corticomelanotropo de la hipófisis del pato como modelo experimental para la comprensión de los mecanismos que controlan la función de células semejantes en el hombre.

Por otro lado, se sabe que en lo que respecta a la fisiología aviar, estas hormonas están involucradas en diferentes procesos como: nidación, cloquez, cambio del color del plumaje, adaptación a medios de diferente tonicidad (agua dulce-agua salada), corrientes migratorias, domesticación y adaptación a habitats artificiales, comportamiento de imprinting, adaptación al stress, aprendizaje y memoria; con lo cual se percibe la importancia que tiene el poder conocer los mecanismos que controlan la secreción de estas hormonas en la especie aviar.

Por último, deseo destacar un párrafo de A. Einstein, donde veo reflejado mi modo de pensar y sentir respecto a la investigación científica:

"Quien conoce la investigación científica sólo por sus efectos prácticos, llega fácilmente a un concepto completamente erróneo sobre el estado mental y espiritual de los hombres que, rodeados de coetáneos llenos de escepticismo, señalaron los caminos esparcidos por los países de la Tierra a través de siglos. Sólo aquél que dedica su vida a fines y objetivos como éstos puede tener una idea acerca de lo que animaba e inspiraba a aquellos hombres, dándoles fuerza y vigor para proseguir el camino y permanecer fieles a sus objetivos, no obstante los innumerables fracasos".

SEGUNDA PARTE

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO I. MATERIALES

1. EQUIPAMIENTO MAYOR

Bomba peristáltica de velocidad variable	Gilson Medical Electronics, Inc 72 Rue Gambetta, B.P. Villiers-le-Bel, Francia
Colector de fracciones Ultro Rac 7000	Gilson Medical Electronics, Inc. 72 Rue Gambetta, B.P. Villiers-le-Bel, Francia
Termostato TE-7 Tempette	Cole Palmer Instrument Company Chicago, Illinois 60648, EEUU
Centrífugas:	
a) Temperatura ambiente Rolco CM 36 R	Rolco, S.A. Buenos Aires, Argentina
b) Refrigerada IEC B-20A Damon/ IEC Division	International Equipment Company 300 Second Avenue, Needham Heights MA 02194, EEUU
Contador gamma Kontron MR 252 automático Eficiencia: 55%	W & W Electronic Inc: Scientific Instruments CH-4002, Basel, Suiza
Espectro-fluorómetro	American Instrument Company Silver Spring, Maryland 20910, EEUU
Espectrofotómetro digital UV Hitachi Modelo 100-40	Hitachi, Ltd. Tokyo, Japón
Incubador metabólico Dubnoff	Precisión Scientific Co., Subsidiary of GCA Corporation Chicago 60647, EEUU
Bomba de vacío	Precision Scientific Co. Chicago. EEUU
Microscopio Zeiss	Carl Zeiss, Germany Corrientes 316 Buenos Aires, Argentina
Dilutor Automático	LKB Instruments Limited Selsdon, Croydon, Inglaterra

2. EQUIPAMIENTO MENOR Y MATERIALES

Micropipetas	a) Gilson Medical Electronics, Inc. 72 Rue Gambetta, B.P. Villiers-le-Bel, Francia
--------------	--

	b) SMT Scientific Manufacturing Industries Inc., 800 University Avenue Berkeley, California 94701, EEUU
Jeringas Hamilton (50 ul)	Hamilton Company Reno, Nevada, P.B. 600, EEUU
Tubos de radioinmunoensayo de polipropileno	Kartell s.p.a. Viale delle Industrie 20082 Noviglio, Milano, Italia
Tubos de radioinmunoensayo de poliestireno	Kartell s.p.a., Viale delle Industrie 20082 Noviglio, Milano, Italia
Malla de nylon	Henry Simon Limited, Special Products P.O. Box 3, Stockport, Cheshire, Inglaterra
Jeringas y agujas descartables	Becton-Dickinson and Company Rutherford, New Jersey, EEUU
Tubuladuras plásticas SMA, tubos de flujo calibrado para bombas peristálticas	Technicon Instruments Corporation Tarrytown, New York 10591 EEUU
Columnas de vidrio para cromatografía	Whatman Limited, Springfield Mill Maidstone, Kent, Inglaterra
Dispositivo de teflón para dispersar células	Tornería Cruce e Hijo 26 y 37, La Plata, Argentina
Cámara cuentaglobulos (Neubauer)	Richiniello Rauto Cirugía La Plata, Argentina
Agitador Magnético Mag-Mix	P.S. Precision Scientific, Subsidiaria de GCA Corporation EEUU
Vortex	Precytec-Ind. Argentina Richiniello Rauto Cirugía, La Plata, Argentina
Material de cirugía	Richiniello Rauto Cirugía La Plata, Argentina

3. REACTIVOS Y DROGAS

Todas las drogas y reactivos utilizados fueron de grado analítico.

a. Para los ensayos de pedazos de glándulas

Solución buffer Krebs Ringer
bicarbonato glucosa (KRBG)

Albúmina sérica bovina (BSA),
Grado RIA-Fracción V

Sigma Chemical Company
P.O. Box 14508
St. Louis MO 63178, EEUU

b. Para los ensayos de células dispersas

Solución buffer Krebs Ringer
bicarbonato glucosa (KRBG)

Albúmina sérica bovina (BSA)
Grado RIA-Fracción V

Azul Tripán 0,4%

Trypsina-tipo III

Inhibidor de tripsina de
porotos de Lima tipo II-L

Colagenasa tipo IV (de
Clostridium histolyticum)

Desoxirribonucleasa (DNA-asa)
tipo I DN-100

Penicilina G 3000000 U cris-
talina sódica

Estreptomycin

Bio-Gel P2 (límite de exclu-
sión: 1,800 daltons)

Acido ascórbico

Rojo fenol

Sigma Chemical Company, P.O. Box
14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

Gibco Biocult, Paisley, Escocia

Sigma Chemical Company, P.O. Box
14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

Sigma Chemical Company, P.O. Box
14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

Sigma Chemical Company, P.O. Box
14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

Sigma Chemical Company, P.O. Box
14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

Lepetit S.A., Av. L.N. Alem 896,
Buenos Aires, Argentina

Lepetit S.A., Av. L. N. Alem 896,
Buenos Aires, Argentina

Bio-Rad Laboratories
Richmond, California, EEUU

Sigma Chemical Company, P.O. Box
14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

Gibco Biocult, Paisley, Escocia

c. Para el dosaje de corticosterona

Corticosterona

SO₄H₂ (Pro Análisis) 96%

Diclorometano (Pro Análisis)

Etanol (Pro Análisis)

Sigma Chemical Company, P.O. Box
14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

Farmitalia Carlo Erba, División
Analítica, Milano Italia

Mallinckrodt Chemical Works
New York, Los Angeles, St. Louis,
EEUU

Merck Química Argentina, Roseti 1084
Buenos Aires, Argentina

d. Para las iodinaciones

Ioduro de sodio (¹²⁵I Na)

Cloramina T
(CH₃ · C₆H₄SO₂N(Na)Cl · 3H₂O)

Metabisulfito de sodio
(Pro Análisis)

Vycor, Código 7930, Tamaño
del poro 140

New England Nuclear, Boston, EEUU

BDH Chemicals Ltd.
Poole, Inglaterra

Mallinckrodt Chemical Works, New York,
Los Angeles, St. Louis, EEUU

Corning Glass Works, New York, EEUU

QUSO	Corning Glass Works, New York, EEUU
HCl (Pro Análisis) densidad 1,18 g/ml	Mallinkrodt Chemical Works, New York, Los Angeles, St. Louis, EEUU
Acetona (Pro Análisis)	Farmitalia Carlo Erba s.p.a., División Analítica, Milano, Italia
Suero precipitante anticonejo (cabra) para radioinmunoensayo	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU
Suero de caballo inactivado	Cedido gentilmente por el Sr. C. Grisolia, Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina
Carbón activado Norit A	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU
Dextran	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

e. Hormonas puras para bioensayo y radioinmunoensayo

ACTH	
i. ACTH humana (1-39) sintética	Donada gentilmente por Dres. Rittel y Dessaulles, Ciba-Geigy, Basilea, Suiza
ii. ACTH (1-24) sintética	Donada gentilmente por Dr. W. Rittel, Ciba-Geigy, Basilea, Suiza
(Phe ² , Nle ⁴) ACTH (1-24)	Península Laboratories, Inc. Belmont, California EEUU
iii. ACTH (4-10)	Cedida gentilmente por el Dr. Alex Eberle, Basilea, Suiza
iv. ACTH (1-10)	Cedida gentilmente por el Dr. Alex Eberle, Basilea, Suiza
α-MSH	
i. desacetil-α-MSH (1-13)	Cedida gentilmente por el Dr. Alex Eberle, Basilea, Suiza
ii. α-MSH (1-13)	Peninsula Laboratories, Inc. Belmont, California, EEUU
AVP [arginina] ⁸ -vasopresina	Peninsula Laboratories, Inc. Belmont, California, EEUU
AVT [arginina] ⁸ -vasotocina	Peninsula Laboratories, Inc. Belmont, California, EEUU
CRF Factor liberador de corticotrofina	
i. 41 aa sintético secuencia ovina	Cedido gentilmente por el Dr. P. Lowry. Pituitary Hormone Laboratory St. Bartholomew's Hospital, Medical College, London, Inglaterra

ii. 41 aa sintético secuencia rata

Cedido gentilmente por el Dr. E. Spinedi, Centro de Referencia de Radioinmunoensayo, La Plata, Argentina

OT Oxitocina (Syntocinon)
10 U.I.

Laboratorios Sandoz, SAIC.
Buenos Aires, Argentina

MT Arginina-mesotocina

Cedida gentilmente por el Dr. Maurice Manning, Medical College of Ohio, Toledo, EEUU

f. Antisueros

Anticuerpos anti-ACTH

i. V.D.

Donado gentilmente por el Dr. Van Dijk, Instituto de Biología Molecular, Utrecht.

ii. Ac I

Obtenido por el Dr. F.E. Estivariz, Centro de Estudios Endocrinos, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

Anticuerpos anti -MSH

i. Eberle

Donado gentilmente por el Dr. Alex Eberle, Basilea, Suiza

Anticuerpos anti-AVT

i. AVP_G

Donado gentilmente por el Dr. Sabine Blähser, Justus Liebig Universität, Gießen, Alemania

Anticuerpos anti CRF

i. CRF₃

Donado gentilmente por el Dr. G. Gillies, Pituitary Hormone Laboratory, St. Bartholomew's Hospital, London, Inglaterra

ii. E.D.

Donado gentilmente por el Dr. E. Spinedi, Centro de Referencia de Radioinmunoensayo, La Plata, Argentina

g. Catecolaminas, Neurofármacos

Adrenalina bitartrato
(4-[1-hidroxi-2-(metilamino)-etil]-1,2-bencenodiol)

Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508
St. Louis, MO 63178, EEUU

Noradrenalina (Clorhidrato)
(4-[1-hidroxi-2-(amino)-etil]-1,2-bencenodiol)

Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis MO 63178, EEUU

Dopamina (3-hidroxitiramina-clorhidrato)

Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

Serotonina (5-hidroxi-triptamina)

Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

Fenilefrina (1-m-hidroxi- α -[(metil-amino)metil]bencil-alcohol)	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St Louis, MO 63178, EEUU
Isoproterenol (3,4-dihidroxi- α -[(isopropilamino)-metil]-bencil-alcohol)	Calbiochem Lab., Los Angeles, EEUU
Fentolamina (2-[N-(m-hidroxi-fenil)-p-toluidinometil]-imidazolina)	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU
Propranolol (1-(isopropilamino)-3-(1-naftiloxi)-2-propanol)	Sigma Chemical Company, P.O.Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU
2-Br- α -ergocriptina	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU
Haloperidol (4-[4-(p-clorofenil)-4-hidroxipiperidino]-4'-fluorobutirofenona)	Sigma Chemical company, P.O. Box, 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

h. Para las técnicas histológicas

i. Técnica de Mallory

Líquido de Elftman

Hematoxilina

Mallinckrodt Chemical Works, Los Angeles, EEUU

Alcohol absoluto (pro análisis)

Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia

Acido clorhídrico (pro análisis)

Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia

Azul de anilina

Mallinckrodt Chemical Works, Los Angeles, EEUU

Orange G

Mallinckrodt Chemical Work
Los Angeles, EEUU

Acido Acético (pro análisis)

Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia

ii. Técnica de aldehído fucsina

Líquido de Bouin

Permanganato de potasio (pro análisis)

Merck Química Argentina, Buenos Aires, Argentina

Acido sulfúrico (pro análisis) 96%

Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia

Bisulfito de sodio (pro análisis)

Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia

Alcohol absoluto (pro análisis)

Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia

Fucsina básica

Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

Acido clorhídrico (pro análisis)	Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano Italia
Paraaldehído (pro análisis)	Merck Química Argentina, Buenos Aires, Argentina
<u>iii. Técnicas inmunohistoquímicas</u>	
Líquido de Elftman	
Parafina	Pablo Zubizarreta Ward Buenos Aires, Argentina
4-Cl-1-naftol	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU
3,3'-diaminobencidina	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA
Suero normal de conejo	Centro de Estudios Endocrinos, Cátedra B de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
Anticuerpo anti-ACTH (Ac I)	Obtenido por Dr. F.E. Estivariz, Centro de Estudios Endocrinos, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
Anticuerpo anti- α -MSH (Eberle)	Cedido gentilmente por Dr. Alex Eberle, Basilea, Suiza
Anticuerpo anti-CRF ₃	Cedido gentilmente por Dr. G. Gillies, Pituitary Hormone Laboratory, St. Bartholomew's Hospital, London, Inglaterra
Tiocianato de amonio (pro análisis)	Mallinkrodt Chemical Works, New York, Los Angeles, St. Louis, EEUU
Agua oxigenada (H ₂ O ₂) 30 Vol.	Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia
Suero de cabra anticonejo	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis MO 63178, EEUU
Complejo enzimático peroxidasa-antiperoxidasa	Miles Laboratories, Los Angeles, EEUU
<u>i. Para la determinación de proteínas</u>	
Carbonato de sodio (pro análisis)	Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia
Sulfato de cobre pentahidratado (pro análisis)	Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia
Hidróxido de sodio (pro análisis)	Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia
Tartrato de sodio y potasio (pro análisis)	Farmitalia Carlo Erba, División Analítica, Milano, Italia

Reactivo de Folin-Ciocalteu's	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU
Albúmina sérica bovina (BSA) grado RIA-fracción V	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

j. Otros

Pargilina	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU
Trasylol	Bayer Laboratorios, Buenos Aires, Argentina
Acido tartárico (pro análisis)	Merck Química Argentina, Buenos Aires, Argentina

k. Anestésicos

Embutal	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU
Ketalar	Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, EEUU

l. Animales

Ratas Sprague-Dowley	Centro de Estudios Endocrinos, Cátedra B de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata Argentina
Patos barcino chico (Anas platyrhynchos)	Centro de Estudios Endocrinos, Cátedra B de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata Argentina

CAPITULO II. METODOS

1. Bioensayo para ACTH de células dispersas de adrenal de rata

Se siguió el método de Lowry y col., (372) modificado, que se describe brevemente a continuación.

a. Preparación de las células dispersas. A las 9 a.m. se extraen las glándulas suprarrenales de aproximadamente quince ratas adultas de la cepa Sprague Dowley, anestesiadas con Embutal (30 mg/kg de peso) 90 minutos antes del sacrificio. Se extraen rápidamente las glándulas suprarrenales, se despojan cuidadosamente de la grasa, se las secciona en cuatro partes y se las coloca en el vaso de teflón del aparato utilizado para realizar la dispersión (Fig. 1) que contiene 5 ml del buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato-Glucosa (KRBG) pH 7,4, al que se le agrega tripsina cristalizada (50 mg %) y antibióticos: Penicilina 20 µg/ml y estreptomycin 30 µg/ml. El aparato donde se realiza dispersión se coloca en un baño de agua a 37°C. El contenido del vaso se airea suavemente con una mezcla que contiene 95% aire - 5% CO₂ y se agita por medio de una paleta de teflón rotada por un motor a 300 r.p.m. Luego de 20 minutos de agitación, el sobrenadante se vuelca cuidadosamente en tubos plásticos de 10 ml, que se mantuvieron constantemente sobre hielo. Se le agregan 5 ml. de buffer con tripsina a los cuartos de adrenales y este procedimiento se repite cinco veces más.

Al finalizar la dispersión, se reúnen las 6 fracciones de 5 ml c/u obtenidas, y se centrifugan acelerando muy lentamente para evitar rotura celular hasta llegar a 100 g. durante 30 minutos. El sobrenadante se descarta y el pellet celular se resuspende en el buffer KRBG conteniendo antibióticos a las concentraciones antes mencionadas, al que se le agrega albúmina sérica bovina (BSA) al 0,25 % e inhibidor de tripsina de porotos de Lima (LBI) al 0,1%. Este es el buffer utilizado durante el transcurso del bioensayo. La suspensión celular se resuspende en 10 ml de buffer y se filtra a través de una malla de nylon (tamaño de malla: 100 µm) para eliminar restos de tejido o acúmulos celulares demasiado grandes. La suspensión final se realiza en un volumen de buffer adecuado de manera de obtener una concentración de células de 10^5 - 2×10^5 células/ml.

La suspensión celular se mantiene sobre hielo hasta

el momento de su uso.

b. Conteo de las células y su viabilidad. Las células se cuentan utilizando una cámara cuenta glóbulos de Neubauer, con microscopio de contraste de fase. La viabilidad celular se estima utilizando el colorante Azul Tripán al 0,4%.

c. Preparación de las soluciones de ACTH para el bioensayo. Como standard de ACTH tanto en el bioensayo como en el inmunoensayo se utilizó ACTH (1-39) humana sintética. El standard se alicuotó en fracciones de 1 µg/100 µl de ClH 10 mM y se guardaron a -80°C.

Todas las soluciones para el bioensayo de ACTH se prepararon en tubos plásticos de 5 ml utilizando el buffer del ensayo como diluyente y ajustando el pH a 7,4 con NaOH 0,01 N si fuera necesario. Se utilizaron pipetas Gilson con puntas nuevas para cada dilución. La curva standard se confeccionó utilizando un rango de concentraciones de ACTH de entre 40 ng/ml y 40 pg/ml con un intervalo de dosis de 2 X. Cada dosis se ensayó por duplicado en un volumen de 0,2ml. El rango de dosis utilizado permitió en todos los casos cubrir todo el rango de respuesta de las células en las condiciones del ensayo.

Los desconocidos se diluyeron de la misma forma. A los 200 µl del standard de ACTH o de los desconocidos (por duplicado), se agregan 800 µl de la suspensión celular. La suspensión celular se agrega con una pipeta Gilson, usando una punta de plástico recortada, a fin de agrandar el agujero y evitar así posibles roturas celulares. Los viales se incubaron, agitándolos suavemente en incubador metabólico Dubnoff durante 2 hs. a 30 oscilaciones por minuto. La temperatura de incubación fue de 37°C y los viales se mantuvieron aireados durante todo el tiempo de incubación con una mezcla de 5% CO₂ - 95% aire.

d. Dosaje de la corticosterona producida por las células adrenales. Al finalizar el tiempo de incubación, se investiga la cantidad de corticosterona producida por las células en el medio de incubado por el método de Silber y col. (373) que se describe brevemente a continuación. Se colocan 0,5 ml de distintas diluciones del standard de corticosterona o de las muestras en tubos de vidrio de 10 ml, y se les agrega 2 ml. de diclorometano. Luego de extraerlos durante 10 seg. agitándolos en un vortex, los tubos se centrifugan durante 10 min. a 100g. Se aspira la fase acuosa tapando cada vez para evitar la

evaporación de la fase orgánica. Se transfieren 1,5 ml de la fase orgánica a tubos limpios y se le agrega a c/tubo 1,5 ml de una solución de SO_4H_2 70% - Etanol 30%. Los tubos se agitan bien en un vortex y se dejan en reposo 1 h 30 min; se aspira la fase orgánica y se lee la fluorescencia en la fase sulfúrica en fluorómetro a 470 nm λ excitación y 535 nm λ emisión.

La actividad biológica de los standards y de las muestras se expresa como corticosterona neta producida en los viales con respecto a los blancos que contienen buffer solamente, realizándose la conversión de la actividad de las muestras a equivalentes de 1-39 ACTH utilizando la curva construida con los standards.

2. Bioensayo de actividad cortiliberina (CL) y melanoliberina (ML) en pedazos y células dispersas de adenohipófisis (AH) de pato

a. Obtención de pedazos de AH de pato. A las 9 a.m. se sacrificaron 8 patos de la especie Barcino chico (*Annas flavirostris*) por decapitación. Se extrajeron las adenohipófisis, separándolas de las neurohipófisis. Las adenohipófisis se colocaron en una cápsula de Petri que contenía el buffer KRBG al que se le había agregado BSA 2,5% y antibióticos: penicilina 20 $\mu\text{g/ml}$ y estreptomina 30 $\mu\text{g/ml}$. Las adenohipófisis se enjuagaron en el buffer y luego se procedió a seccionarlas en ocho porciones de aproximadamente el mismo tamaño, con un bisturí. Los pedazos de glándula se colocaron en un vaso plástico que contenía el buffer antes mencionado y se mantuvieron sobre hielo. Una vez concluido el procedimiento de seccionamiento de las glándulas, cuatro pedazos se colocaron en cada vial plástico que contenía 0,8 ml de buffer. Los viales se reservaron sobre hielo hasta el momento de su uso. Para dosar la actividad liberadora de ACTH y α -MSH por parte de los pedazos de glándula, se los estimuló con 0,2 ml de distintas diluciones de extractos de eminencia media de pato o con las posibles sustancias secretagogas para ambas hormonas, convenientemente diluidas en el medio de incubado. La ACTH y α -MSH liberadas en los medios de incubado se valoraron por radioinmunoensayo, y en el caso de ACTH también se valoró esta por el bioensayo de células dispersas de adrenal de rata descrito previamente.

b. Obtención de células dispersas de adenohipófisis

de pato.

i) Dispersión celular con tripsina

Cuatro o cinco patos se decapitaron entre las 8 h 30 min. - 9 h a.m. El cráneo se serruchó para exponer el cerebro, que fue cuidadosamente removido. Se seccionó el tallo hipofisario, y con una pinza, se removieron las meninges que recubren la cavidad ósea donde se aloja la hipófisis. Una vez hecho esto, se extrajo la hipófisis con sumo cuidado y se colocó en una cápsula de Petri que contenía el buffer KRBG al que se le había agregado antibióticos: penicilina y estreptomina a las concentraciones antes mencionadas. El lóbulo posterior se separó de la adenohipófisis y se conservó para su posterior dosaje hormonal. Una vez obtenidas todas las adenohipófisis, éstas se seccionaron en ocho porciones y se colocaron en el vaso de teflón del aparato dispersador que contenía 5 ml del buffer KRBG que contenía 50 mg % de tripsina y 10 mg % de DNA-asa. Los fragmentos de AH se airearon con una mezcla que contenía 5% CO₂ - 95% aire y se agitó mecánicamente durante veinte minutos a 37°C por medio de una paleta de teflón que giraba a 200 r.p.m. (Figura No.18). El sobrenadante se recogió en tubos plásticos de 10 ml y se guardaron a temperatura ambiente ya que bajas temperaturas estimulan la liberación espontánea de ACTH (188). Este procedimiento se repitió cinco veces más con medio de dispersión nuevo. Al finalizar el procedimiento de dispersión, quedó escaso tejido sin dispersar, y ésta fue completada pipeteando suavemente los fragmentos de tejido con una pipeta Gilson con una punta plástica cortada para evitar roturas celulares. Todos los sobrenadantes se centrifugaron en centrífuga refrigerada a 4° C, a 700 r.p.m. durante 1 hora y el pellet celular fue resuspendido en 5 ml de buffer KRBG que contenía 0,25% de BSA y 0,1 % de inhibidor de tripsina de porotos de Lima. La suspensión celular se filtró a través de una malla de nylon de 100 um. La suspensión celular se realizó en un volumen final de manera de tener $10^5 - 2 \times 10^5$ células/0,8 ml. Para valorar la actividad liberadora de ACTH y α -MSH por parte de las células dispersas de AH de pato se las estimuló de idéntica manera que a los pedazos de glándula. Los estímulos se agregaron en un volumen de 0,2 ml, de manera que el volumen final de incubación fue de 1 ml/ vial y el número de células incubadas de $10^5 - 2 \times 10^5$ células/vial. La ACTH y α -MSH liberadas

Figura 18. Esquema del aparato utilizado para realizar la dispersión celular con tripsina.

se valoraron por radioinmunoensayo. La ACTH se valoró por bioensayo (descrito anteriormente).

ii) Dispersión celular con collagenasa

Se siguió el método de Mulder y Smelick, 1977 (374) ligeramente modificado y que se describe brevemente a continuación.

Cuatro o cinco patos de la especie *Barcino chico* (*Annas flavirostris*) se decapitaron entre las 8h 30m - 9h a.m. Se extrajeron las AH como se describió anteriormente y se las separó de las neurohipófisis. Las AH se cortaron en ocho partes con un bisturí y se colocaron en un erlenmeyer siliconado de 25 ml que contenía 10 ml de buffer KRBG al cual se le había agregado 0,25% de BSA, 20 ug/ml de penicilina, 30 ug/ml de estreptomicina, 3,2 mg/ml de collagenasa y 0,1 mg/ml de DNA-asa. El pH se ajustó a 7,2 - 7,4. Los fragmentos hipofisarios en la solución de collagenasa-DNA-asa fueron agitados en un incubador metabólico Dubnoff cincuenta minutos a 37°C y se airearon con una mezcla de 5% CO₂- 95% aire. Una vez finalizado el período de agitación, la dispersión se completó disgregando los fragmentos de hipófisis pipeteando suavemente con una pipeta Pasteur siliconada entre 25 y 50 veces, cuidando de no introducir burbujas para evitar posibles roturas celulares. La suspensión celular se filtró a través de un filtro de nylon cuya malla era de 100 um. La suspensión celular se trasvasó a un tubo de plástico que se centrifugó a 100 g durante 20 minutos. La centrífuga se aceleró lentamente para evitar que las células se rompieran. El sobrenadante se descartó, y el pellet celular se resuspendió en 1,5 ml del buffer KRBG con el agregado de BSA y los antibióticos antes mencionados. Se tomó una porción de la suspensión de células y se las contó en una cámara cuenta/glóbulos con microscopio de fase. Para estimar la viabilidad de las mismas se las coloreó con azul Tripán al 0,4%. La suspensión celular final se realizó de manera de obtener 10⁵ - 2 x 10⁵ células/0,8 ml. Para valorar la actividad liberadora de ACTH y α -MSH de las células dispersas con collagenasa se siguió el mismo protocolo experimental que con las células dispersas con tripsina.

c. La columna de células dispersas de adenohipófisis de pato como bioensayo para estudiar actividad CL y ML en aves

La columna se construyó siguiendo la técnica descrita por Gillies y Lowry, 1978 (195) . Las células se dispersaron según la técnica de Mulder y Smelick 1977 (374) previamente descrita.

i) Preparación de la columna de células dispersas

La suspensión celular se filtró a través de una malla de nylon cuyos poros median 100 μ m de diámetro y se mezcló con 750 mg de Biogel P 2, malla: 200 - 400, que previamente se había hidratado durante toda la noche con 10 ml de ClNa 0,9% y luego se había lavado dos veces con el medio de perfusión (KRBG). La mezcla de Biogel y células dispersas (aproximadamente 3 ml de volumen) se introdujo en una jeringa plástica de 2,5 ml descartable (Figura No. 19). La columna se colocó verticalmente con el pico hacia arriba; se conectó a la bomba peristáltica, y se perfundió con un flujo de 1 ml por minuto con el buffer de perfusión KRBG (0,25% BSA , 0,21% Glucosa con Antibióticos). Luego de 3 minutos la mezcla de células y Biogel se empaquetaron a un volumen final de 2 ml. La columna se desconectó de la bomba y el volumen muerto se redujo a 0,1 - 0,2 ml, ajustando la posición del émbolo. La perfusión recomenzó a un flujo de 0,5 ml/min. con el buffer indicado anteriormente. Este buffer se siguió utilizando como buffer de perfusión durante el transcurso del experimento. La columna se sumergió en un baño de agua termostatzada a 41°C (temperatura corporal de las aves), el buffer de perfusión se aireó constantemente con una mezcla de 5% CO₂ - 95% aire. La columna se dejó perfundiendo con el buffer durante 90 minutos antes de comenzar la serie de estímulos, para lograr basales de secreción hormonal (ACTH y α -MSH) estables. En la Figura 19 se observa una representación esquemática del sistema antes descrito. Tanto el medio de perfusión, como las sustancias a ensayar disueltas en el medio de perfusión se bombearon a través de una espira de calentamiento a través de un deburbujeador, que está incluido en el sistema de perfusión para extraer burbujas de aire que puedan penetrar el sistema cuando se cambia del buffer de perfusión al estímulo y viceversa.

Las células se estimularon con pulsos de 3 minutos de diferentes diluciones de extractos crudos de EM de pato (ver próxima sección) o diferentes sustancias a testear diluídas convenientemente en el buffer de perfusión que contenía 30 μ g/ml de ácido ascórbico. El ascorbato

Esquema de la columna de células dispersas de
adenohipófisis (AH) de pato

Figura 19. El sistema de perfusión consiste de una jeringa plástica de 2 ml, en cuyo interior se empaquetan las células dispersas de AH de pato junto con Bio-Gel P₂, las que son perfundidas continuamente con el buffer de perfusión. Tanto el buffer como las espiras de calentamiento y la columna de células se mantuvieron en un baño a 41° C.

se utilizó para prevenir la oxidación de los secretagogos empleados, particularmente CRF (164) y aminas biógenas.

La columna de células dispersas de adenohipófisis y de lóbulos neurointermedios de rata, se preparó y estimuló de idéntica manera que el sistema de pato, que a su vez fué preparado de acuerdo a Gillies y Lowry, 1978 (195) con algunas modificaciones.

La concentración de ACTH y α -MSH en los efluentes de la columna se valoró por radioinmunoanálisis. La ACTH también se valoró por el bioensayo de células dispersas adrenal de rata.

d. Preparación de los extractos tisulares

i) Extractos de eminencia media de pato (EMP)

El tallo hipotálamo hipofisario con el área circundante: la eminencia media, fue removido con forceps muy finos al mismo tiempo que la adenohipófisis. Los fragmentos extraídos pesaban alrededor de 30 - 40 mg (peso húmedo). Estos se homogeneizaron en un homogenizador de vidrio en 1 ml de ClH 20 mM de manera de tener 1 EMP/ml. El extracto se centrifugó a 10.000 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se neutralizó con NaOH 0,1N y se diluyó convenientemente, para su uso posterior como secretagogo de las hormonas adenohipofisarias, en el buffer de incubación (Perfusión) correspondiente. Cuando los extractos se utilizaron para dosaje hormonal, no se procedió a neutralizarlos, y una vez centrifugados, el sobrenadante se guardó a -80°C para el posterior dosaje por radioinmunoanálisis de ACTH, α -MSH, AVT y CRF.

ii) Extractos de corteza cerebral de pato (CCP)

Las porciones de corteza cerebral extraídas pesaban 30 - 40 mg de peso húmedo. Los extractos de corteza cerebral de pato se prepararon de la misma manera que los de eminencia media de pato (EMP), de manera de tener 1 CCP/ml de ClH 20 mM

iii) Extractos de neurohipófisis (NH) y de adenohipófisis (AH) de pato

Tanto los extractos de neurohipófisis como los de adenohipófisis se prepararon de manera similar a los de EMP, de manera de tener 1 NH/ml ó 1 AH/ml de ClH 20 mM. Luego de centrifugar los extractos de 10000 g durante 30 minutos, a 4°C, el sobrenadante se guardó a -80°C para el posterior dosaje de ACTH, α -MSH, AVT y CRF.

3. Transplante de adenohipófisis de pato como modelo "in vivo" para el estudio del control de su actividad secretoria

Se trabajaron patos adultos de la especie *Barcinio chico* (*Annas flavirostris*) de ambos sexos. Los animales fueron adquiridos en una granja y cuatro de ellos fueron sacrificados por decapitación (patos donantes). Se les extrajo la hipófisis lo más rápidamente posible. Las adenohipófisis se disecaron de las neurohipófisis, se eliminaron los restos de tejido adyacente adherido a las mismas y se colocaron en una cápsula de Petri que contenía la solución buffer KRBG, a la que se le había agregado antibióticos: penicilina 20 ug/ml y estreptomina 30 ug/ml y BSA 2,5 g/l. La cápsula de Petri con el buffer y las AH se mantuvo sobre hielo. Cada adenohipófisis se seccionó en cuartos utilizándose los dos cuartos correspondientes a la porción cefálica, ya que según Iturriza y col. 1980 (56) es en esta porción donde se localizan las células corticometanotropas. Se utilizaron otros ocho patos como receptores a los cuales se les transplantó un cuarto de porción cefálica de adenohipófisis del pato dador en la cámara anterior del ojo. Para efectuar la operación, se anestesió previamente a los animales. Como anestésico se utilizó Ketalar; la dosis empleada fue: 240 mg/kg de peso, intraperitoneal. Para efectuar el transplante se coloca una gota de atropina en el ojo del pato receptor para provocar la dilatación de la pupila y de esa forma poder trabajar más cómodamente. La membrana nictitante del ojo se mantiene fija por medio de una pequeña sutura. Se hace una incisión en la córnea con un bisturí, y se introduce el cuarto de porción cefálica de AH por debajo de ésta, dentro de la cámara anterior del ojo del pato receptor. Se libera la membrana nictitante y se coloca al pato nuevamente en su jaula con agua y comida ad libitum. Como controles se utilizaron patos a los que se les practicó el mismo procedimiento quirúrgico, pero sin introducir el tejido hipofisario en el ojo. Todos los animales se mantuvieron en su jaula al aire libre con agua y comida ad libitum

Luego de 20 días de haber realizado el transplante aquellos patos que mostraron transplantes aparentemente bien preservados se sacrificaron por decapitación, y se recolectó la sangre del tronco de los animales, mante-

niéndose la misma en tubos plásticos heparinizados sobre hielo. La sangre se centrifugó a 3000 g en centrífuga refrigerada a 4°C, inmediatamente se separa el plasma al que se le agrega Trasylol en una dosis de 1000 UI/ml de plasma para evitar la proteólisis, y la consiguiente disminución del nivel de ACTH y α -MSH. Los plasmas de los patos control, y transplantados se guardaron a -20°C para su posterior dosaje de ACTH y α -MSH. Como controles se utilizaron animales intactos a los cuales se les determinó los niveles plasmáticos de ACTH y α -MSH.

Luego de abrir la córnea, se extrajeron los transplantes que se utilizaron para realizar los siguientes estudios:

a. Algunos de ellos se homogeneizaron en 1 ml de ClH 20 mM y fueron luego utilizados para dosar su contenido de ACTH y α -MSH por radioinmunoanálisis.

b. Otros se utilizaron para investigar ACTH y α -MSH por inmunohistoquímica, técnica que se describirá a continuación. Luego de ser fijados en el líquido de Elftman, se procesaron siguiendo la técnica de Stenberger 1974 (375) que fue puesta a punto para el material de pato por Iturriza y col., 1980 (56).

c. Un tercer grupo de transplantes se utilizó para evaluar su capacidad secretagoga in vitro. Cada transplante se incubó en forma individual en viales plásticos, en un volumen de 1 ml del buffer KRBG que contenía 0,5% de BSA. Los viales se incubaron durante 1 hora a 41°C en un incubador metabólico Dubnoff y se airearon con una mezcla de 95% aire - 5% CO₂. Luego de transcurrido ese tiempo, se recolectaron los medios de incubado y a algunos viales se les agregó 800 ul de medio fresco y 200 ul de medio que contenía 0,2 EMP/ml y que fue preparado según se explicó anteriormente; al resto de los viales, se les agregó un ml de medio fresco. Todos los viales fueron incubados una 2da. hora de idéntica forma que durante la 1a. hora. Luego de completar el tiempo de incubación, se determinó en los medios la cantidad de α -MSH secretada. Los resultados obtenidos mediante los incubados de los transplantes fueron comparados con los obtenidos luego de someter al mismo protocolo de incubación, a pequeñas porciones de la zona anterior de adenohipófisis normales. Como controles se utilizaron animales intactos a los que se les determinó el contenido hipofisario de ACTH y α -MSH; el contenido hormonal de los tejidos se

expresó como ng por mg de proteína, las que se determinaron por el método de Lowry y col., 1951 (376).

4. Tratamiento con drogas in vivo

Se tomaron tres grupos de patos, el primero de ellos se le inyectó: Haloperidol, 5mg/kg intraperitoneal (disuelto en solución de ClNa 0,9% al segundo se le administró 2-Br- α -ergocriptina, 3 mg/kg intraperitoneal, (preparado disolviendo iguales cantidades de ergocriptina y ácido tartárico en 1ml de agua bidestilada). Al tercer grupo (patos controles), se le inyectó el solvente de la ergocriptina. Los animales se decapitaron 30 min. luego de la inyección (275) y se recolectó la sangre del tronco de cada animal, en tubos plásticos heparinizados sobre hielo. Se centrifugó a 3000 g durante 20 min. a 4°C, el plasma se separó inmediatamente y se le agregó Trasylol en una dosis de 1000 UI/ml de plasma para evitar la proteólisis y por ende de degradación de ACTH y α -MSH. Una vez hecho esto el plasma se guardó a -20°C para el posterior dosaje de las hormonas antes mencionadas, por radioinmunoanálisis.

5. Técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) de ACTH α -MSH, AVT y CRF.

Se utilizaron sistemas de radioinmunoensayo específicos para ACTH, α -MSH, AVT y CRF. Las hormonas, antisueros y el isótopo de ^{125}I utilizados fueron descritos en la sección Materiales. Los buffers utilizados se especifican en la Tabla 5a y 5b y los protocolos de RIA utilizados se esquematizan en las Tablas 6 y 7. En todos los casos, tanto las muestras como los standards se diluyen seriadamente con un dilutor automático 1:2,33 en tubos plásticos. Los antisueros y las hormonas iodinadas (Trazador radioactivo) se diluyeron apropiadamente en el buffer correspondiente inmediatamente antes de su uso. A todos los buffers usados para diluir las muestras, los anticuerpos y las hormonas iodinadas, se les agregó azida de sodio para evitar posibles contaminaciones por hongos o bacterias (0,02% P/V). No se agregó azida sódica a los buffers usados en las reacciones de iodinación. El almacenamiento de las hormonas usadas para iodinar o como standards está especificado en la Tabla 8. Los stocks de anticuerpos anti ACTH I, anti CRF y anti AVT_G se guardaron en alícuotas de 100 μl en via-

TABLA 5

Buffers para radioinmunoanálisis

a) Buffer fosfato 0,5 M pH 7,4

Na_2HPO_4 o $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	74,60 g 93,62 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	19,50 g
Agua bidestilada	Agregar 1 l

b) Buffer para radioinmunoanálisis (RIA)

	BUFFER BSA	BUFFER MERCAPTOETANOL
Buffer fosfato 0,5 M; pH 7,4	10 ml	10 ml
Albúmina bovina sérica (BSA)	0,25 g	0,25 g
Mercaptoetanol	---	0,50 ml
Agua bidestilada	Agregar 100 ml	Agregar 100 ml

TABLA 6

PROTOCOLO UTILIZADO PARA LOS RADIOIMUNOANALISIS I

ENSAYO	BUFFER	VOLUMEN DE MUESTRA	ANTICUERPOS				TRAZADOR RADIOACTIVO		PROCEDIMIENTO DE SEPARACION.
			NOMBRE	VOLUMEN AGREGADO	DILUCION FINAL	VOLUMEN AGREGADO	VOLUMEN AGREGADO	cpm APROXIMADO	
ACTH	Buffer mercaptoetanol	200 ul	i) Ac. VD	50 ul	1:30.000	50 ul	50 ul	10.000	C-dextran
			ii) Ac. I	50 ul	1:24.000	50 ul	50 ul	10.000	C-dextran
MSH	Buffer mercaptoetanol	200 ul	Ac. Eberle	50 ul	1:240.000	50 ul	50 ul	10.000	C-dextran
CRF	Buffer mercaptoetanol	200 ul	i) Ac. CRF ₃	50 ul	1:24.000	50 ul	50 ul	10.000	C-dextran
			ii) Ac. ED	50 ul	1:12.000	50 ul	50 ul	10.000	C-dextran
AVT	Buffer BSA	200 ul	Ac AVP _G	50 ul	1:250.000	50 ul	50 ul	10.000	2º anticuerpo

Ac. = Anticuerpo

C-dextran = Carbón activado 1% + Dextrán 0,25% + suero de caballo 30% en H₂O destilada

cpm = Cuentas por minuto.

TABLA 7
 Protocolo utilizado radioinmunoanálisis II

ENSAYO	TIEMPO DE INCUBACION (HORAS)*			
	0	24	36	48
ACTH	Dilución del St o M + Ac.	-	+ Trazador	Separación
α-MSH	Dilución del St o M + Ac. + trazador	-	-	Separación
AVT	Dilución del St o M + Ac. + trazador	+ 2º Ac. + SNC 1:40	-	Separación
CRF	Dilución del St o M + Ac.	+ trazador	-	Separación

Ac = Anticuerpo
 St = Estándar
 M = Muestra

Trazador radioactivo (Hormona iodinada)

2º Ac = Anticuerpo precipitante anticonejo (cabra)

* = Todas las incubaciones se hicieron a 4ºC

TABLA 8
Almacenamiento de hormonas

HORMONA	ALMACENAMIENTO DE HORMONAS							
	PARA IODINAR				PARA ESTANDAR			
	VOLUMEN (ul)	CONCENTRACION	DILUYENTE	TEMP (°C)	VOLUMEN (ul)	CONCENTRACION	DILUYENTE	TEMP (°C)
ACTH 1-39* ACTH 1-24 (Phe ² ,Nle ⁴) ACTH 1,24	10	2 ug en 10 ul	0,1M Fosfato pH 7,4	-80	100 ^a	100 ng/ml	0,1M Fosfato pH 7,4	-20
	10	2 ug en 10 ul	0,1M Fosfato pH 7,4	-80	100	100 ng/ml	0,1M Fosfato pH 7,4	-20
	10	2 ug en 10 ul	0,1M Fosfato pH 7,4	-80	---	---	---	---
α-MSH	10	2 ug en 10 ul	0,1M Fosfato pH 7,4	-90	100	50 ng/ml	0,1M Fosfato pH 7,4	-20
AVT	10	2 ug en 10 ul	0,1M Fosfato pH 7,4	-80	100	50 ng/ml	0,1M Fosfato pH 7,4	-20
CRF**	10	2 ug en 10 ul	0,1M Fosfato pH 7,4	-90	100	200 ng/ml	0,1M Fosfato pH 7,4	-20

Temp. = temperatura
* = ACTH 1-39 humana sintética
a = usada para radioinmunoanálisis y para bioensayo
** = CRF = 41 aminoácidos sintético secuencia ovina

les plásticos a -70°C . Los antisueros en uso se diluyeron 1: 100 en buffer BSA en un volumen final de 10 ml y se conservaron en heladera a 4°C durante aproximadamente cinco meses. El stock de anticuerpo anti α -MSH Eberle se guardó en alícuotas de 10 μl diluidas 1: 10 en buffer BSA a 4°C . El anticuerpo en uso se diluyó 1: 1000 en el buffer BSA y se guardó en heladera a 4°C durante aproximadamente dos meses.

a. Métodos de iodinación

Los métodos utilizados son básicamente los descriptos por Rees y colab. 1971 (377); y Ratcliffe y colab., 1972 (378).

i) Reacción de iodinación

La iodinación de las hormonas puras se realizó en viales de iodinación plásticos. La reacción de iodinación y los reactivos empleados se describen en la Tabla 9. La reacción de iodinación de ACTH, de α -MSH y de CRF se pararon agregando al vial de iodinación BSA y sumergiendo el vial de iodinación y su contenido en un tubo conteniendo 5 ml del buffer mercaptoetanol. En el caso de AVT la reacción de iodinación se paró agregando metabisulfito de sodio y 1 ml de buffer acético - acetato de amonio 0,005 M pH 4,5.

ii) Purificación de las hormonas iodinadas

Tanto ACTH como α -MSH y CRF iodinadas se separaron del ^{125}I Na y de la hormona dañada, realizando una extracción con Vycor (100 mg) (silicatos finamente molidos), previamente activado a 600°C durante 1 hora. Los 5 ml del buffer que contenían la mezcla de iodinación se volcaron a un tubo plástico cónico que contenía los 100 mg de Vycor, se agitó en el vortex durante 30 seg. y se centrifugó a 3000 r.p.m. 10 min. El sobrenadante se descartó, y el precipitado se lavó dos veces con 2,5 ml de agua bidestilada, y una vez con 1 ml de ClH 1 M. La hormona iodinada se eluye del Vycor rotando el tubo durante 30 min. con 2 ml de una mezcla de acetona 60%, 40 % de agua bidestilada. Luego de centrifugar a 5000 rpm durante 10 min el sobrenadante se guarda a -20°C hasta el momento de su uso.

La AVT iodinada se separó del ^{125}I Na y de la hormona dañada pasando la mezcla de iodinación por una columna de carboximetil celulosa equilibrada con el buffer ácido acético - acetato de amonio 5 mM pH = 5. La columna se eluyó con un gradiente continuo del buffer hasta una

TABLA 9
Reacciones de iodinación

ORDEN DEL AGREGADO DE REACTIVOS AL VIAL DE IODINACION	ACTH	α -MSH	CRF	AVT
(1) Buffer Fosfato 0,5 M pH 7,4	10 ul	10 ul	10 ul	10 ul
(2) Hormona	2 ug en 10 ul	2 ug en 10 ul	2 ug en 10 ul	2 ug en 10 ul
(3) $^{125}\text{I Na}^*$	1 mCi en 10 ul	1 mCi en 10 ul	1 mCi en 10 ul	1 mCi en 10 ul
(4) Cloramina T*	20 ug en 10 ul	20 ug en 10 ul	20 ug en 10 ul	20 ug en 10 ul
(5) Tiempo de reacción	20"	20"	20"	20"
(6) Metabisulfito de sodio (NaMBS)	---	---	25 ug en 10 ul	25 ug en 10 ul
(7) BSA	50 ug en 50 ul	50 ug en 50 ul	50 ug en 50 ul	---

* = Se deben poner en contacto 5" (activación) previo a la reacción de iodinación

concentración 500 mM pH = 5. El pico de AVT iodizada es el último en eluir; se recojen fracciones de 1 ml que se mantienen en heladera a 4°C.

b) Separación de la hormona marcada unida al anticuerpo de la hormona marcada libre

i. Separación con la mezcla Carbón - Dextrán

Para el RIA de ACTH, α -MSH, y CRF, teniendo como volumen final en cada tubo de RIA 300 μ l, se utilizan 200 μ l de una mezcla de Carbón activado, 1% Dextrán 0,25% y suero de caballo 30% en solución de ClNa 0,9% que se agregan con una micropipeta, luego se agita cada vial en el vortex durante 15 seg, se dejan reposando sobre una mezcla de hielo y agua a 0°C durante 15 min; transcurrido ese tiempo, se procede a centrifugar los viales durante 10 min a 5000 r.p.m. Luego se aspira el sobrenadante y la radioactividad del precipitado, que es inversamente proporcional a la cantidad de hormona en cada vial se lee durante 60 - 120 seg. en un contador gamma.

ii. Separación con 2º anticuerpo

Todos los antisueros utilizados se obtuvieron en conejos y el complejo hormona anticuerpo fue precipitado agregando 50 μ l de un anticuerpo precipitante, obtenido en cabras, anti gamma-globulina de conejo diluido 1/10 en buffer BSA a cada vial de RIA. La precipitación se completó agregando 50 μ l de suero normal de conejo diluido 1/40 en el buffer BSA. Luego de incubar los viales 24 hs. a 4°C, se les agrega a c/u 200 μ l de solución fisiológica de ClNa 0,9%, se centrifuga 20 min a 5000 r.p.m. se aspira el sobrenadante y la radioactividad del precipitado se lee como se describió anteriormente.

6. Técnicas histológicas

a. Técnica de Mallory (379)

La técnica de coloración empleada para diferenciar histológicamente los diferentes constituyentes de la región hipotálamo-hipofisaria del pato fue la coloración tricrómica de Mallory que se describe brevemente a continuación: el tejido disecado (adenohipófisis - neurohipófisis - hipotálamo) fué fijado en el líquido de Elftman, deshidratado, incluido en parafina y cortado en secciones de 7 μ m de espesor.

Procedimiento de coloración:

1º Desparafinizar e hidratar el material.

2º Sumergir los preparados en Hematoxolina 10 a 15 min.

- 3º Colocar los preparados bajo agua de canilla durante 15 min hasta que el color de los mismos vire al azul.
- 4º Decolorar con una mezcla de ácido clorhídrico al 0,5% en alcohol 70º durante 30 min.
- 5º Colorear los preparados con la mezcla de Azan durante 15 a 20 min:

Azul de anilina	0,5 g
Orange G	2,0 g
Acido acético	8 ml
Agua destilada	100ml
calentar a 100°C y filtrar. El pH no debe superar 4,5.	

- 6º Dehidratar y montar

b. Técnica de Aldehído - Fucsina: demostración de neurosecreción (381)

La técnica empleada para observar neurosecreción en el pato fué la de Aldehído Fucsina (AF), debido a que se había demostrado que el material neurosecretorio tenía afinidad por esta coloración en todas las especies de vertebrados investigadas (97). A continuación describiré brevemente la técnica empleada. El tejido (adenohipófisis, hipotálamo y cerebro) fue fijado en el líquido de Bouin, deshidratado, incluido en parafina, y cortado en secciones de 7 um de espesor. Se ensayaron varias combinaciones de colorantes de modo de lograr la más apropiada. Se eligió la técnica de Aldehído Fucsina ligeramente modificada.

Procedimiento de coloración:

- 1º Desparafinizar e hidratar el material
- 2º Sumergir los preparados en la siguiente mezcla oxidante hasta que se tornen color tabaco:

permanganato de potasio	0,5 g
ácido sulfúrico	0,5 ml
agua destilada	100 ml
- 3º Realizar tres pasajes por agua destilada
- 4º Decolorar con una solución de bisulfito de sodio al 3%
- 5º Lavar con agua destilada
- 6º Sumergir los preparados en la solución de Aldehído Fucsina durante 2 ó 3 min:

solución al 0,5% de Fucsina básica en alcohol 70º	100 ml
ácido clorhídrico	1 ml
paraldehído	1 ml

se deja madurar 24 hs o más hasta que se torne color violeta; se conserva en haladera hasta el momento de su uso

(se debe preparar nueva cada vez)

7º Lavar en alcohol 70º

8º Deshidratar y montar

c. Técnicas de inmunohistoquímica

i. Determinación de ACTH y α -MSH

La técnica utilizada fue esencialmente la de Sternberger, 1974 (375) adaptada al material de pato por Iturriaza y colab. 1980 (56) que describo brevemente a continuación:

La presencia de ACTH y α -MSH se investigó en cortes de AH y de transplantes de AH por medio de la técnica de Peroxidasa antiperoxidasa, utilizando como aceptor de oxígeno ya sea 4-Cl-1-naftol o 3,3'-diaminobencidina (380). Como controles algunos cortes se trataron con: 1) sustitución con SNC de los sueros anti hormonas 2) tratamiento de los anticuerpos con ACTH 1-39 sintética o α -MSH. Para la obtención de las micrografías se procedió de la siguiente forma: los cortes se trataron con Cl-naftol como colorante final para demostrar la presencia de una determinada hormona. Se montaron en glicerina y se fotografiaron. Se dejó el preparado durante 2 -3 días a temperatura ambiente para permitir que la coloración se fije. Luego, los preparados se desmontaron y se trataron durante 1 h con tiocianato de amonio 3 M para desprender de las células los complejos antígeno-anticuerpo formados durante la primera coloración (380); luego, en esos mismos preparados se investigó la presencia de la otra hormona utilizando el anticuerpo correspondiente y diaminobencidina como aceptor final de oxígeno. Luego se montaron nuevamente y se fotografiaron.

ii. Determinación del Factor liberador de corticotrofina (CRF)

La técnica empleada en este caso fué la de Sternberger 1974 (375) adaptada al material de pato. La presencia de CRF se investigó en cortes de hipotálamo - adenohipófisis - neurohipófisis por medio de la técnica de Peroxidasa antiperoxidasa, utilizando como aceptor de oxígeno ya sea 4-Cl-1-naftol, o 3,3' - diaminobencidina (380). Como controles algunos cortes se trataron con: 1) sustitución con SNC de los sueros antihormonas, 2) tratamiento de los anticuerpos con CRF sintético.

Para la obtención de las micrografías se siguió el procedimiento descrito anteriormente en la sección precedente.

7. Determinación de Proteínas: Método de Lowry

La cantidad de proteínas por peso húmedo de los diferentes tejidos utilizados (hipófisis de pato, transplan-

tes de adenohipófisis de pato) se investigó mediante el método de Lowry (376), que describiré brevemente a continuación. Se colocan 0,4 ml de las distintas diluciones del standard de proteína (BSA) o de las muestras en tubos de vidrio de 5 ml (tubos de Kahn) por duplicado y se les agrega 2 ml de una solución compuesta por 50 partes de una solución de carbonato de sodio al 4% en hidróxido de sodio 0,1 N y una parte de una solución de sulfato de cobre pentahidratado al 1% y tartrato de sodio y potasio al 2% en agua. Se los agita en un vortex durante 10 seg. y se los deja en reposo durante 20 min. Luego se les agrega a cada tubo 0,2 ml de reactivo de Folin - Ciocalteu's, se los agita inmediatamente en un vortex durante 10 seg y se deja desarrollar el color durante 30 min. Se lee la densidad óptica en un espectrofotómetro a 750 mμ.

La cantidad de proteínas de las muestras se expresa como equivalente de albúmina sérica bovina en mg/ml, para lo cual se construye la curva standard correspondiente. Como blanco del ensayo se utiliza agua bidestilada en reemplazo de las muestras desconocidas. Las muestras desconocidas se preparan homogeneizando el tejido en 1 ml de ClH 20 mM, luego se centrifuga a 10000 g durante 30 min en centrífuga refrigerada a 4° C. El sobrenadante se reserva para el posterior dosaje de proteínas.

8. Mantenimiento de los animales

Los patos machos, adultos (Barcino chico: Annas Flavivirostris) se obtuvieron en una granja, se mantuvieron al aire libre en un gallinero, y se alimentaron con alimento balanceado macerado en agua, y agua ad libitum.

Las ratas, Sprague-Dawley fueron criadas en el bioterio de muestreo laboratorio y se alimentaron con alimento balanceado y agua ad-libitum.

9. Estadística

El análisis estadístico de los datos se hizo utilizando el análisis de varianza, seguido del test de Student para comparar las diferencias entre las medias (382). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM para n=3. Se hizo la transformación logit - log de las curvas de radioinmunoanálisis y el cálculo de la regresión lineal se realizó por medio del método de cuadrados mínimos. La evaluación estadística del paralelismo existente entre las curvas de regresión del standard y de los extractos hipofisarios de pato se realizó mediante el análisis de varianza de los coeficientes de regresión (383).

TERCERA PARTE

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I

Conteo de células y viabilidad

1.- Células dispersas de adrenal de rata:

La mayoría de las células obtenidas eran típicas células esféricas e intactas, con límites celulares bien definidos y conteniendo inclusiones lipídicas en su interior. Aproximadamente el 70% de las células aparecían aisladas o en pequeños grupos de 2 a 3 células. Entre el 90 y 95% de las células eran viables, ya que excluían el Azul Tripan al 0.4%. La suspensión final dió un rendimiento de $0,5 \times 10^6$ células por adrenal, que es un rendimiento similar al reportado por Swallow y Sayers, 1969 (169); Lowry y col., 1973 (372) y Guillies y Lowry, 1978 (195). La morfología y ultraestructura de las células adrenales de rata dispersas con tripsina fue observada mediante microscopía electrónica y descrita por Sayers y col., 1971 (384), quienes reportaron que estas células permanecen inalteradas luego de 2 horas de incubación, con o sin agregado de secretagogos y corroborado en nuestro laboratorio.

2.- Células dispersas de adenohipófisis de Pato:

Las células se obtuvieron prácticamente intactas y sin daños. Eran de tamaño variable, encontrándose una pequeña cantidad de glóbulos rojos. Se obtuvieron $1,3-2,0 \times 10^6$ células por hipófisis con una viabilidad superior al 90% (exclusión de Azul Tripan 0,4%) al comienzo del experimento. La determinación de la viabilidad celular al finalizar los experimentos se dificultaba por la presencia de las partículas de Bio Gel pero de acuerdo a las respuestas celulares comparativas obtenidas al final de cada experimento se demostró que las células permanecen viables durante por lo menos 48 horas.

3.- Células dispersas de adenohipófisis de Rata:

Una vez finalizada la dispersión, las células se observan en un microscopio de fase, y éstas aparecían intactas y sin daños. La suspensión celular contenía aproximadamente $0,7-1,0 \times 10^6$ células por cada hipófisis y la viabilidad de las mismas osciló entre el 85-90% al comenzar el experimento. El conteo de células al finalizar el experimento se vió complicado por la presencia de Bio Gel, pero un análisis cualitativo sugirió que las

células permanecían viables durante el transcurso de las 10 horas que duraban los experimentos.

4.- Células dispersas de lóbulo neurointermedio de Rata:

Al observar al microscopio óptico la suspensión celular obtenida luego de dispersar lóbulos neurointermedios, se vió que el número de células obtenidas por cada lóbulo dispersado osciló entre 20 y 30 x 10⁵ células. Las células aparecían aisladas o formando acúmulos, también se observaron glóbulos rojos y restos de tejido, probablemente nervioso, conjuntamente con las células. Las células de la Pars Intermedia, aparecían como una población homogénea de células esféricas, con núcleos grandes y redondeados, bien definidos. Nuevamente se observó (mediante el uso Azul Tripan 0,4%) que las células dispersas mantenían su integridad y morfología, y el porcentaje de viabilidad osciló entre el 85-90%.

5.- Discusión:

Los resultados antes descriptos nos indican que estamos trabajando con células íntegras y viables, y que aparentemente conservan su morfología y funcionalidad normales durante el intervalo de tiempo en que se llevaron a cabo los experimentos.

CAPITULO II

Dosaje de ACTH y α -MSH liberadas

Las cantidades de ACTH y de α -MSH liberadas por incubados estáticos de pedazos de glándula y de células dispersas de adenohipófisis de pato, y por células dispersas de adenohipófisis de pato, enpaquetadas en una columna junto con Bio Gel P2 y sometidas a perfusión continua, frente a las diferentes diluciones de extractos de eminencia media de pato, y a los diferentes secretagogos empleados, fueron dosadas por sistemas de radioinmunoanálisis (RIA) previamente adecuados al material de Pato. En el caso de ACTH, también se dosó por bioensayo utilizando un sistema de células dispersas de adrenal de rata previamente validado para material de pato. A continuación se describirán y discutirán los resultados obtenidos utilizando tanto los sistemas de radioinmunoanálisis como de bioensayo.

1.- Células dispersas de adrenal de rata como bioensayo para dosar ACTH:

En la Figura N° 20 se observa una curva dosis-respuesta típica obtenida utilizando como standard ACTH 1-39 humana, cuyas dosis se expresan en nanogramos por ml (ng/ml), en el bioensayo de adrenal de rata. Las curvas dosis-respuesta se construyeron graficando en ordenadas la producción neta de corticosterona con respecto a blancos con vehículo solamente, expresada en microgramos por ml en cada vial de incubación (μ g corticosterona/ml). Cuando se estimularon las células adrenales con diluciones de extractos de hipófisis de pato, la curva dosis-respuesta obtenida presentó un buen paralelismo con la obtenida para el standard de ACTH 1-39, condición esta necesaria si se pretende utilizar este bioensayo para dosar ACTH en material de pato (Figura N° 20). Cuando estimulamos células adrenales de rata con diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP) o de extractos de corteza cerebral de pato (CCP) (empleando la máxima concentración usada para estimular las células adenohipofisarias de pato) no se observó actividad corticotrófica.

La especificidad y precisión del bioensayo de adrenal de rata para dosar ACTH han sido validadas por Sayers y col. 1971; Lowry y col., 1973 y Estivariz, 1977 (384, 372, 385).

2.- Radioinmunoanálisis (RIA) de ACTH:

La Figura N° 21 muestra una curva standard para ACTH 1-39 utilizando el anticuerpo I (AcI) y una curva de desplazamiento utilizando diferentes diluciones de extractos de hipófisis de pato. El paralelismo entre las transformaciones lineales de ambas curvas (no mostrado) fue altamente significativo (90% de paralelismo, $P < 0,001$).

También se observan las reacciones cruzadas, del sistema de radioinmunoanálisis empleado con: α -MSH, des-acetil- α -MSH y CLIP, obteniéndose un 0,2% de reacción cruzada tanto con α -MSH como con des-acetil- α -MSH, y menos del 0,01% con CLIP.

Resultados igualmente buenos en cuanto a la reacción cruzada con la dilución de los extractos de hipófisis de pato se obtuvieron con el otro anticuerpo empleado (V.D.), en lo que respecta a las reacciones cruzadas del mismo con péptidos relacionados con ACTH, estas son similares a las obtenidas con el AcI, sin embargo, el anticuerpo V.D. es un anticuerpo anti-C-terminal ACTH, por lo que cruza un 100% con CLIP (17-39 ACTH). La concentración de ACTH medida por radioinmunoanálisis en hipófisis de pato fue de $2,21 \mu\text{g} \pm 0,10$ ($n=10$) por glándula (aproximadamente $0,16 \mu\text{g}$ por mg de peso húmedo). Estos resultados se obtuvieron en una serie de determinaciones utilizando 10 extractos hipofisarios de patos salvajes (Barcino chico: *Annas Flavirostis*) en época invernal.

Los extractos de eminencia media de pato no interfirieron en el sistema de radioinmunoanálisis empleado para dosar ACTH, en las diluciones finales presentes en las muestras a ensayar, ya sea en los incubados de pedazos de glándula, en los incubados de células dispersas o en los eluyentes de la columna de células dispersas de adenohipófisis de pato. Cuando se agregó una cantidad conocida de ACTH a un extracto de eminencia media de pato diluido de la misma forma que cuando se lo emplea como estímulo, o cuando se perfunde una cantidad conocida de ACTH a través de la columna de células dispersas, no se observan pérdidas de su inmunoadtividad, esto sugiere que: a) los extractos de eminencia media de pato no interfieren con el sistema de radioinmunoanálisis y no contienen sustancias que pudieran destruir la ACTH y b) las células adenohipofisarias de pato no secretan sustancias (aparte de la propia ACTH) que pudieran interferir con el sistema RIA empleado o que pudieran destruir la ACTH por ellas li-

berada .

Experimentos de especificidad de los anticuerpos empleados demostraron que tanto las hormonas neurohipofisarias de rata: Arginina-Vasopresina (AVP) y oxitocina (OT), como las de pato: Arginina-Vasotocina (AVT) y Mesotocina (MT); las hormonas hipotalámicas como el factor liberador de corticotrofina 41aa secuencia ovina (CRF), y las aminas biógenas ensayadas no interfirieron en el sistema de radioinmunoanálisis a las dosis utilizadas.

3.- Comparación de la ACTH bioensayable y radioinmunoensayable.

Los valores de ACTH determinados por radioinmunoanálisis fueron confirmados por bioensayo utilizando el sistema de células dispersas de glándulas adrenales de rata. El porcentaje de recuperación de la ACTH bioensayable de los extractos adenohipofisarios de pato respecto a la radioinmunoensayable era de 85-95%. En la Figura N° 22 observamos la relación existente entre la ACTH liberada por diferentes diluciones de extractos de eminencia media de pato (0,100 EMP/ml; 0,050 EMP/ml y 0,025 EMP/ml) dosada por radioinmunoanálisis y por bioensayo. Los valores graficados corresponden a tres determinaciones para cada punto, por los dos métodos utilizados (bioensayo y radioinmunoanálisis). Del análisis estadístico de los datos graficados en la Figura N° 22, se desprende que hay una muy buena correlación entre las cantidades de ACTH dosadas por uno u otro método, siendo el coeficiente de correlación $r=0,98$ con una $P=0,005$, no observándose diferencias significativas en los valores de ACTH dosados por cualquiera de los métodos empleados. Sin embargo el tiempo que lleva el método de dosaje de corticosterona, y también el número de células obtenidas por cada glándula adrenal de rata en cada dispersión, limita seriamente el número de muestras que pueden ser dosadas en cada experimento. Otro inconveniente del método de bioensayo es la menor sensibilidad que se obtiene con el mismo, si la comparamos con la sensibilidad obtenida por radioinmunoanálisis. Por otro lado, por radioinmunoanálisis se pueden dosar simultáneamente alrededor de quinientas muestras en cada ensayo, por lo que este método es más adecuado en términos de economía, practicidad y sensibilidad para realizar las determinaciones de ACTH en material de pato.

4.- Radioinmunoanálisis de α -MSH.

En la Figura N° 23 observamos las reacciones cruzadas del sistema de radioinmunoanálisis empleado para dosar α -MSH en material de pato.

Los péptidos ensayados fueron el standard α -MSH, des-acetil- α -MSH; ACTH 1-24; ACTH 1-39; ACTH 1-10 y ACTH 4-10. No se observa reacción cruzada con ACTH 4-10, ACTH 1-10, y el porcentaje de reacción cruzada con ACTH 1-24 o con ACTH 1-39 fue muy bajo ($<0,03\%$). La Figura N° 23 también muestra una curva de desplazamiento utilizando diferentes diluciones de extractos de hipófisis de pato. El anticuerpo empleado para realizar el RIA fue el Eberle. El paralelismo entre las transformaciones lineales de ambas curvas (no mostrado) fue altamente significativo (92% de paralelismo, $P<0,01$). La concentración de α -MSH medida por radioinmunoanálisis en extractos de hipófisis de pato fue de $220 \text{ ng/ml} \pm 14,7$ ($n=10$) por glándula (aproximadamente $15,7 \text{ ng}$ por mg de peso húmedo) estos resultados se obtuvieron en una serie de determinaciones utilizando diez extractos hipofisarios de patos salvajes (Barcino chico: *Annas Flavivros-tris*) en época invernal.

Los extractos de eminencia media de pato no interfirieron en el sistema de radioinmunoanálisis empleado para dosar α -MSH en las diluciones finales presentes en las muestras a ensayar, ya sea en los incubados de pedazos de glándulas, incubados de células dispersas, o en los eluyentes de la columna de células dispersas de adenohipófisis de pato perfundidas continuamente. Cuando se agregó una cantidad conocida de α -MSH a un extracto de eminencia media de pato diluida de la misma manera que cuando se lo emplea como estímulo, o cuando se perfunde una cantidad conocida de α -MSH a través de la columna de células dispersas, no se observan pérdidas de su inmuoactividad, esto sugiere que al igual que para ACTH: a) los extractos de eminencia media de pato no interfieren con el sistema de radioinmunoanálisis empleado y no contienen sustancias que pudieran degradar α -MSH, y b) las células adenohipofisarias de pato no secretan sustancias que pudieran interferir con los sistemas de radioinmunoanálisis empleados, y tampoco se produce una degradación de la α -MSH liberada por dichas células. También se demostró (resultados no mostrados) que ninguno de los estímulos probados como posibles secretagogos de α -

MSH interfieren con el sistema de radioinmunoanálisis empleado.

5.- Discusión.

Los resultados mostrados precedentemente demuestran que es igualmente válido utilizar el bioensayo de células dispersas de adrenal de rata o el radioinmunoanálisis para dosar ACTH en los medios de incubados de pedazos de adenohipófisis, en los medios de incubados de células dispersas adenohipofisarias, como así también en las fracciones eluidas de la columna de células dispersas empaquetadas junto con Bio Gel P2 y perfundidas continuamente. El límite de detección de ambos métodos es diferente, ya que mientras que con el radioinmunoanálisis la misma es de 20 picogramos/ml en el bioensayo es de 100 picogramos/ml. Por otra parte el sistema de radioinmunoanálisis tiene las siguientes ventajas:

- a) mide directamente ACTH en las muestras y por lo tanto hay menos posibilidades que se produzcan artefactos.
- b) se pueden determinar muchas más muestras por ensayo, hecho que permite un mejor diseño de los experimentos y a la vez obtener un menor error en la estimación de los resultados.
- c) la parte experimental es más sencilla, y los resultados son más precisos y confiables.

Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, el dosaje de ACTH en las muestras se realizó mediante el empleo del método de radioinmunoanálisis. Por contrapartida, el RIA mide la actividad inmunológica del péptido que no siempre se correlaciona con la actividad biológica del mismo. El sistema de radioinmunoanálisis empleado corrientemente para dosar ACTH en material de rata o humano, fue adaptado para el material de pato. Debido a que la ACTH presenta escasas variaciones a lo largo de la escala filogenética, seleccionamos un anticuerpo que reacciona contra la porción media de la molécula de ACTH (segmento que comprende los aa 10-20 del péptido), que tiene una reacción cruzada del 100% con el material del pato.

Hemos comparado la inmunoactividad y la bioactividad de los extractos hipofisarios y en las secreciones celulares y ambas muestran un elevado índice de correlación. La inmunoactividad de ACTH en las muestras es siempre ligeramente mayor que la bioactividad, esto probablemente se

deba a la inestabilidad de la actividad biológica de esta hormona. Aún así, los coeficientes de correlación para ACTH bioensayo-radioinmunoanálisis eran constantes en todos los medios de incubado, y en las muestras de la columna de perfusión, tomadas al azar, para hacer las correspondientes determinaciones. Por lo tanto concluimos que el sistema de radioinmunoanálisis empleado era un método adecuado para evaluar rutinariamente ACTH liberada por las células corticomelanotropas del pato.

Adicionalmente, como previamente habíamos demostrado que en la adenohipófisis del pato se produce α -MSH(55) y que esta hormona está almacenada en el mismo tipo celular en el que lo está ACTH (56) resultó necesario que el sistema de radioinmunoanálisis empleado no diera reacciones cruzadas con α -MSH o algún otro fragmento originado fisiológicamente de la conversión de ACTH a α -MSH. Esta condición fue satisfecha utilizando un anticuerpo antiACTH que reconoce la porción media de esta molécula, y cuyo porcentaje de reacción cruzada con α -MSH, des-acetil- α -MSH o con CLIP (el fragmento C-terminal de ACTH) es despreciable (ver Figura N° 21).

Para dosar α -MSH en el material de Pato, adaptamos el sistema de radioinmunoanálisis, usado corrientemente para dosar α -MSH en rata, al material de pato. Seleccionamos un anticuerpo, que tiene una escasa reacción cruzada con ACTH (<0,03%) de manera que no hubiera interferencias de esta última hormona en el dosaje de la α -MSH producida por las células corticomelanotropas del pato.

El anticuerpo mencionado cruza 100% con el material de Pato, tanto en los extractos adenohipofisarios como en el material liberado por las células adenohipofisarias, ya sea en incubados estáticos, o en la columna de perfusión. Para corroborar la posible reacción cruzada entre el anticuerpo anti α -MSH usado y la ACTH del pato, se pasó un extracto de adenohipófisis de pato por una columna de Sephadex G50 y se dosó α -MSH en todas las fracciones recogidas, comprobando que en la región donde se detecta ACTH (por el sistema de radioinmunoanálisis específico) no se detecta ningún pico de inmunoreactividad cuando empleamos el sistema de ra-

dioinmunoanálisis de α -MSH y en cambio, sí aparece el pico correspondiente a la región cuyo Kd corresponde con el de α -MSH (resultados no mostrados).

BIOENSAYO PARA ACTH

Figura N° 20: Respuesta de células dispersas de adrenal de rata frente a distintas dosis de ACTH 1-39 humana empleada como standard, y frente a diferentes diluciones de extractos de adenohipófisis de pato (Hip). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. (n=3)

REACCIONES CRUZADAS CARACTERISTICAS DEL SISTEMA
DE RIA DE ACTH SELECCIONADO

Figura N° 21: Curvas de desplazamiento obtenidas para el standard de $ACTH_{1-39}$, diluciones de extractos de hipófisis de pato (EHP), y tres péptidos relacionados con ACTH. La unión a la hormona iodinada se expresa como el porcentaje de B/B_0 ($\%B/B_0$), donde B_0 es la máxima unión a la hormona iodinada en ausencia de standard o de EHP y B representa el porcentaje de hormona iodinada unida en presencia de standard o de EHP. NS: unión no específica. (media $\pm$ SEM; n=3)

CORRELACION ENTRE LA ACTH RADIOINMUNOENSAYABLE Y BIOENSAYABLE
SEGREGADA POR CELULAS ADENOHIPOFISARIAS DE PATO

Figura N° 22: La ACTH liberada por células dispersas de adenohipófisis de pato perfundidas continuamente, frente a tres diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP/ml) fue dosada por radioinmunoanálisis (RIA) y por bioensayo. Cada punto de la curva corresponde a la relación existente entre la ACTH dosada por RIA y por bioensayo, frente a cada dilución de EMP empleada. Se grafican sólo las medias de tres determinaciones en cada tipo de ensayo.

REACCIONES CRUZADAS CARACTERISTICAS DEL SISTEMA
DE RIA DE α -MSH SELECCIONADO

Figura N° 23: Curvas de desplazamiento obtenidas para el standard de α -MSH, diluciones de extractos de hipófisis de pato (EMP), y tres péptidos relacionados con α -MSH. La unión a la hormona iodinada se expresa como el porcentaje de B/B_0 ($\%B/B_0$), donde B_0 es la máxima unión a la hormona iodinada en ausencia de standard o de EMP y B representa el porcentaje de hormona iodinada unida en presencia de standard o de EMP. (media $\pm$ SEM; n=3)

CAPITULO III

Adecuación, selección y validación de un sistema in-vitro para investigar los mecanismos de secreción de ACTH y α -MSH en la Hipófisis de Pato.

1.- Incubados de pedazos de glándula y de células dispersas de adenohipófisis de Pato:

La ACTH y α -MSH secretadas por los pedazos de adenohipófisis o por las células dispersas de adenohipófisis de pato, en respuesta a concentraciones crecientes de extractos de eminencia media de pato (EMP) se observan en la Figuras N° 24 y 25 respectivamente. Los incubados de pedazos de glándulas dieron blancos muy altos y respondieron pobremente frente a los extractos de EMP. Por otro lado los incubados de células dispersadas, utilizando collagenasa o tripsina, respondieron bien en respuesta a las diferentes diluciones de los extractos de EMP, obteniéndose buenas curvas dosis-respuesta tanto para ACTH como para α -MSH (ver Figuras N° 24 y 25). El método de dispersión con collagenasa, aparte de haber rendido mayor número de células por hipófisis, permitió una mayor sensibilidad de respuesta de las células frente a las diferentes diluciones de extractos de EMP que cuando se usa tripsina como enzima dispersante.. Con ambos tipos de dispersión celular, las células se preincubaron durante 60 minutos. Luego se incubaron durante dos horas con los estímulos a ensayar. Este último, resultó ser el mejor protocolo de incubación ya que con él se obtuvieron las máximas variaciones en la respuesta de las células tanto para ACTH como para α -MSH (basales de secreción mínimos, y máxima liberación de ACTH y α -MSH frente a cada estímulo ensayado).

2.- Columna de células dispersas de adenohipófisis de pato.

a) Estimulación con distintas diluciones de extractos de Eminencia Media de Pato (EMP):

En la Figura N° 26 se observa un perfil de respuesta típico de secreción de ACTH y α -MSH utilizando la columna de células dispersas de adenohipófisis de pato frente a diferentes concentraciones de extrac-

tos de EMP. El perfil corresponde a tres concentraciones diferentes de extractos de EMP, ensayadas por triplicado. Como puede observarse, el nivel basal de secreción para ambas hormonas se recuperó rápidamente, una vez que cesó el estímulo; lo que nos permitió perfundir un nuevo estímulo cada 10 minutos. Para la preparación de las células se eligió el método de dispersión con colagenasa, teniendo en cuenta los mejores resultados obtenidos con los incubados estáticos de las mismas. Las respuestas obtenidas con la variante de la columna de perfusión fueron altamente reproducibles y precisas. La sensibilidad lograda con la columna de perfusión fue mayor que con cualquiera de los otros métodos probados (Figuras N° 24 y 25), lográndose una respuesta significativa por sobre el basal de secreción con diluciones de EMP hasta 1/100. En las Figuras N° 24 y 25 observamos una curva dosis respuesta típica obtenida con tres concentraciones diferentes de EMP. Utilizando el sistema de perfusión, se obtuvieron las mejores curvas dosis-respuesta, con un índice de precisión $\lambda = S/b$ de 0,04 (límites de confianza del 95% para un error standard de $\pm 3\%$ del coeficiente de regresión).

Las respuestas de la columna frente a EMP no variaron durante el transcurso de todo el período de perfusión que usualmente abarcó dos días (8 hs. durante el primer día, y 10 hs. el segundo día) con un intervalo nocturno de 10 hs., período durante el cual se bajó el flujo de perfusión. Las variaciones interensayo fueron mínimas siempre y cuando se empaquetaran en la columna el mismo número de células, los patos usados fueran de la misma edad y en la misma época del año.

No se observó un agotamiento del sistema durante el transcurso del período completo de perfusión, y las células continuaron respondiendo normalmente al finalizar las 48 hs. de perfusión. Esto se corroboró perfundiendo la columna con una dilución del extracto de EMP al final del segundo día, comparando la respuesta obtenida con aquella obtenida al comenzar el experimento.

Como puede observarse en las Figuras N° 24, 25 y 26, la liberación de ACTH y α -MSH por parte de las células dispersas de adenohipófisis de pato empaquetadas en la columna de perfusión, es concomitante, es

decir las células liberan tanto ACTH como α -MSH en forma sincrónica frente a las diferentes diluciones de extractos de EMP. Lo mismo ocurre con los incubados estáticos de pedazos de glándula y de células dispersas de adenohipófisis. Sin embargo debemos destacar que las cantidades relativas de ACTH y α -MSH liberadas son diferentes. Ante el mismo estímulo, las células secretan aproximadamente 20 veces mas ACTH (en ng) que α -MSH.

b) Estimulación con distintas diluciones de extractos de corteza cerebral de Pato:

Los extractos de corteza cerebral de pato, preparados en idéntica forma (homogeneizando la misma cantidad en peso húmedo de tejido) que los extractos de eminencia media de pato, produjeron un efecto mínimo sobre la secreción de ACTH y α -MSH por parte de las células perfundidas de adenohipófisis de Pato (6 mg/ml de CCP produjeron un efecto secretagogo sobre ambas hormonas equivalentes al efecto producido por 0,2 mg/ml de EMP).

c) Efecto de una elevada concentración de Potasio sobre la secreción de ACTH y α -MSH.

Cuando se estimularon las células adenohipofisarias con el buffer KRBG, conteniendo 9 veces más potasio (45mM ClK), pero isotónico respecto al ringer normal se produjo una rápida y masiva secreción de ACTH, mientras que los niveles de α -MSH, permanecen en los basales de secreción (Figura N° 27).

d) Estabilidad y confiabilidad de los extractos de Eminencia Media:

Todos los bioensayos propuestos para CRF, tienen el inconveniente de la variabilidad de los resultados obtenidos. En este trabajo, se adoptó un extracto crudo ácido de eminencia media (hipotálamo basal), como estándar interno. Diferentes stocks de extractos de eminencia media dieron resultados comparables entre sí, con una escasa pérdida de la actividad secretagoga, producida por el almacenamiento a -80°C . Para 5 alícuotas de un pool de eminencias medias guardadas a -80°C durante un año, la actividad de 0,050 EMP/ml fue de 85-90% con respecto a la actividad de la misma dosis de un extracto de EMP preparado en el momento de su uso.

e) Efecto de ACTH y α -MSH sobre su propia secreción en los perfusatos de la columna.

No fue posible demostrar ningún efecto de inhibición por retroalimentación sobre la secreción de ACTH y/o α -MSH inducida por los extractos de EMP al agregar ACTH (hasta 20,0 ng/ml), o α -MSH (hasta 1,0 ng/ml) en el buffer de perfusión.

3.- Discusión.

De los tres sistemas de bioensayo utilizados para estudiar la actividad "corticoliberina y melanoliberina" ejercida por diferentes sustancias, los incubados de células dispersas de adenohipófisis de pato, y las células dispersas de adenohipófisis de pato perfundidas continuamente; pueden considerarse aptos para los propósitos enunciados.

Cuando comparamos los diferentes bioensayos de células dispersas empleados (incubados de células dispersas ya sea con collagenasa o con tripsina, versus el sistema de perfusión continua de células dispersas), este último es el mejor sistema de bioensayo en términos de precisión y sensibilidad (Figuras N° 24 y 25). El sistema de células perfundidas es también más práctico, ya que podemos probar sucesivamente un gran número de estímulos en una misma columna, sin una variación significativa en la respuesta obtenida, aún empleando el protocolo de perfusión de dos días. Ambos, el índice de precisión y la sensibilidad fueron significativamente mejores para la columna de células dispersas. La mínima dosis efectiva resultó ser de 0,01 EMP/ml para la columna de células y 0,05 EMP/ml para los incubados celulares.

No hemos explorado el sistema de cultivos de células de adenohipófisis de pato como bioensayo. Este método ha sido usado para estimar CRA en la rata, y se ha demostrado que es igualmente adecuado que la columna de células dispersas (223, 386). Sin embargo, consideramos que un sistema de estimulación y secreción agudo era más adecuado para nuestros propósitos, ya que pareciera ser que el comportamiento de una célula manipulada en forma aguda, es más factible que se asemeje a la situación "in-vivo", que el de una célula mantenida en cultivo.

La escasa respuesta por parte de la células perfundidas, frente a extractos de corteza cerebral, nos indica que no estamos observando un efecto inespecífico del extracto tisular cuando estimulamos con extractos de eminencia media de pato.

El efecto de una elevada concentración de potasio sobre la actividad secretoria de las células adenohipofisarias de pato es llamativo, ya que mientras que ACTH se libera masivamente al despolarizar la membrana plasmática, α -MSH permanece en sus niveles basales de secreción.

Descartamos un posible artefacto en lo que respecta al método de dosaje α -MSH, dado que una concentración 45 mM ClK no interfirió en el sistema de radioinmunoanálisis empleado.

Por otro lado al perfundir α -MSH iodinada a través de la columna de células dispersas de adenohipófisis de pato, conjuntamente con el buffer 45 mM ClK, sólo se recuperó en los eluyentes el 75% de la radioactividad perfundida. La α -MSH iodinada utilizada, era un 99% activa desde el punto de vista inmunológico (porcentaje de unión al anticuerpo específico 99% en condiciones de saturación de anticuerpo). Cuando la perfusión del trazador se realizó en ausencia de exceso de potasio en el buffer, el porcentaje de α -MSH recuperado fue del 97%. Una posible explicación de este fenómeno podría involucrar una recaptación selectiva de al menos parte de la α -MSH liberada por las células corticotelanotropas cuando son despolarizadas con concentraciones elevadas de potasio. La recaptación de α -MSH y no de ACTH podría explicarse teniendo en cuenta el menor tamaño de α -MSH (13aa) respecto al de ACTH (39aa) o a diferencias estructurales menos evidentes entre ambas. Sin embargo la supuesta captación de α -MSH en condiciones de alto potasio, sólo explicaría en parte los efectos de este estímulo sobre la secreción de ACTH y α -MSH por parte de las células C.M. del pato, ya que los niveles de secreción de α -MSH permanecen inalterados respecto a los basales de secreción. El fenómeno observado podría ser más fácilmente explicado si se postula la existencia de dos tipos celulares diferentes en la adenohipófisis del pato, uno que produjera principalmente ACTH, de igual manera que las corticotropas de la pars

distalis de mamíferos, y un segundo tipo celular que produjera los péptidos típicos de la pars intermedia (α -MSH, CLIP, etc). Esta alternativa no está sustentada por observaciones inmunohistoquímicas al microscopio óptico en las que sólo se demuestra un tipo celular en la adenohipófisis que contiene ambas hormonas (56).

Si debe explicarse el fenómeno de disociación de la secreción de ACTH y α -MSH ante el estímulo de alta concentración de potasio, en base a la existencia de un sólo tipo celular en la adenohipófisis del pato, debería pensarse en un mecanismo intracelular que sería activado solamente (por lo que sabemos hasta ahora) por ese estímulo. Podría pensarse entonces que existen en las células corticomelanotropas del pato al menos dos compartimientos diferentes, uno conteniendo exclusivamente ACTH y el otro solamente α -MSH o ambas. Ambos compartimientos (que podría tratarse de dos poblaciones diferentes de gránulos de secreción) serían movilizadas en la misma proporción por todos los secretagogos por nosotros ensayados, exceptuando el de alta concentración de potasio. Otra alternativa podría ser que la conversión de ACTH (intermediario usual en la formación de α -MSH) fuera un proceso inmediatamente presecretorio, y que el mismo fuera inhibido de alguna manera por una alta concentración de potasio. Al respecto es interesante destacar que en el sapo, existe al menos una fracción de la α -MSH cuya formación es un evento inmediatamente presecretorio (387). Una vez más los hallazgos inmunohistoquímicos argumetan en contra de esta posibilidad en el pato, ya que de no encontrarse almacenadas la α -MSH como tal en los gránulos de secreción no podría evidenciarse en el citoplasma de las células C.M.

Todas estas especulaciones son importantes dado que sería interesante explorar la posibilidad de que existiera un estímulo fisiológico hasta ahora no identificado, que operaría a través de un mecanismo similar al de alto potasio y que pudiera disociar la secreción de los péptidos ante determinadas situaciones fisiológicas. A ese respecto cabe destacar que la secreción de hormonas por alto potasio opera a través de un mecanismo calcio dependiente (388), de ser así podría ocurrir que el supuesto compartimiento que contiene α -MSH (y ACTH) no sería mo

vilizado por aquellos estímulos que son mediados intracelularmente por calcio, pero sí por otro mensajero intracelular (por ejemplo AMP cíclico) mientras que el otro compartimiento que contiene exclusivamente ACTH podría estar controlado por calcio, y además, quizás por otros mensajeros intracelulares (AMP cíclico). Tanto AVT, CRF, y catecolaminas activarían ambos mecanismos intracelulares de manera idéntica y como resultado ambos péptidos serían liberados. Por el contrario, alto potasio operaría a través de calcio y sólo ACTH sería segregada.

De los resultados hasta aquí discutidos en lo que respecta a los efectos de elevadas concentraciones de K^+ sobre la secreción hormonal de las células C.M. de la adenohipófisis del pato, surge, que se necesita más información acerca de como un medio que posee una elevada concentración de K^+ afecta la permeabilidad de las células C.M. al Ca^{+2} , y por lo tanto afecta la liberación de los productos contenidos en los gránulos de secreción. Por otro lado, también habría que profundizar los conocimientos acerca de los mecanismos diferenciales de procesamiento, almacenamiento y secreción de los péptidos derivados del precursor POMC en dichas células. A la luz de los conocimientos actuales este efecto aún no puede ser explicado de una manera contundente.

De los resultados presentados en este capítulo concluimos que hemos desarrollado un sistema de células dispersas de adenohipófisis de pato que reúne los requisitos de ser preciso, sensible y práctico.

Este sistema de bioensayo, conjuntamente con el radioinmunoensayo para ACTH y α -MSH adaptados al material de pato, constituye una herramienta adecuada para estudiar el control de ACTH, α -MSH y otros péptidos relacionados de la hipófisis de las aves.

Bioensayo de sustancias liberadoras de ACTH. Comparación de diferentes métodos in-vitro. Curvas dosis-respuesta para ACTH.

Figura N° 24: Curvas dosis-respuesta obtenidas con incubados de pedazos de adenohipófisis, incubados de células dispersas (con collagenasa o con tripsina); y células dispersas de collagenasa perfundidas continuamente, frente a distintas diluciones de extractos de eminencia media de pato. Cada punto representa la cantidad total de ACTH liberada en ng, medida por radioinmunoanálisis (RIA). (Media $\pm$ SEM; n=3)

Bioensayo de sustancias liberadoras de α -MSH. Comparación de diferentes métodos in-vitro. Curvas dosis-respuesta para α -MSH.

Figura N° 25: Curvas dosis-respuesta obtenidas con incubados de pedazos de adenohipófisis, incubados de células dispersas (con colagenasa o con tripsina); y células dispersas con colagenasa perfundidas continuamente, frente a distintas diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP). Cada punto representa la cantidad total de α -MSH liberada en ng, medida por radioinmunoanálisis (RIA). (media $\pm$ SEM; n=3)

Perfil de secreción de ACTH y α -MSH de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato estimuladas con extractos de eminencia de pato.

Figura N° 26: Perfil de secreción de ACTH y α -MSH de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato frente a tres diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP). Cada estímulo se aplicó tres veces. La velocidad de perfusión fue de 0,5 ml/min, el volumen de cada fracción fue de 1 ml, y la duración de cada estímulo fue de 3 min.

Perfil de secreción de ACTH y α -MSH de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato estimuladas con EMP y alta concentración de potasio.

Figura N° 27: Perfil de secreción de ACTH y α -MSH de células dispersas, perfundidas, de adenohipófisis de pato frente a extractos de eminencia media de pato (EMP 0,050/ml) y frente a una solución 45 mM ClK. Cada estímulo se aplicó tres veces, la velocidad de perfusión fue de 0,5 ml/min, el volumen de cada fracción fue de 1 ml, y la duración de cada estímulo fue de 3 min.

CAPITULO IV

Investigación de la actividad liberadora de ACTH (CL) y α -MSH (ML) de diversos péptidos de origen hipotalámico de mamíferos y de aves.

1.- Curvas dosis-respuesta

Las curvas dosis-respuesta que se obtuvieron para cada péptido y para los extractos de eminencia media de pato, se realizaron con por lo menos tres concentraciones (diluciones) diferentes de los secretagogos empleados. Cada estímulo fue perfundido tres veces. Dos dosis de eminencia media de pato se interpusieron repetidas veces entre cada serie de estimulaciones con los péptidos ensayados, a lo largo de todo el experimento, para verificar variaciones interensayo en las respuestas obtenidas. Las distintas curvas dosis-respuesta se obtuvieron por lo menos dos veces en distintos experimentos. Las variaciones interensayo fueron mínimas, en la serie total de experimentos realizados (menos del 10%). Esta aseveración fue corroborada comparando la respuesta del sistema en cada experimento utilizando como secretagogo alícuotas de un "pool" de extractos de eminencia media de pato conservado a -80°C .

La actividad biológica de los secretagogos fue caracterizada utilizando dos parámetros: la capacidad para inducir una respuesta biológica máxima ($V_{\text{máx}}$) y, siempre que fuera posible, la potencia relativa respecto de un secretagogo determinado, según Schwyzer y col., 1971 (389) y Sayers y col., 1975 (390).

La cantidad total de ACTH liberada por las células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato osciló entre 11 y 115 ng, mientras que la cantidad de α -MSH lo hizo entre 0,4 y 5,4 ng en la serie de experimentos descritos. El contenido de ACTH y α -MSH de los extractos de eminencia media de pato o de rata fue negligible a las diluciones en que se perfundieron. Ninguno de los estímulos empleados interfirieron en el radioinmunoanálisis de ACTH o α -MSH a las concentraciones utilizadas. Las curvas dosis-respuesta obtenidas luego de estimular las células dispersas de adenohipófisis de pato con diferentes dosis de eminencia media de pato (EMP), péptidos neurohipofisarios, y oCRF, se observan en

las Figuras N^o 28 y 29. De todos los secretagogos ensayados el que ejerció la máxima respuesta fue el extracto de eminencia media de pato diluido al quinto (0,2 EMP/ml). En el caso de ACTH, la respuesta obtenida fue equivalente a la obtenida luego de perfundir las células con el buffer de perfusión que contenía una concentración despolarizante de iones K⁺ (45 mM ClK). El resto de los secretagogos probados se comportaron como agonistas parciales con respecto a EMP, ya que la respuesta de todos ellos llegaba a una meseta, sin alcanzar la capacidad máxima o V_{máx} (390) alcanzada por los EMP.

Ambos péptidos neurohipofisarios de las aves AVT y MT, mostraron efectos secretagogos similares, con una V_{máx} equivalente a 0,65 de la V_{máx} ejercida por EMP. Todos los otros péptidos probados mostraron una muy débil "CL" y "ML" incluyendo al oCRF (V_{máx} 0,1 de la capacidad ejercida por EMP). Las respuestas de secreción de ACTH y α -MSH de las células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato, frente a: EMP, MT y AVT, dieron curvas de regresión lineal muy exactas con índices de precisión $\lambda=s/b$ de 0,04 para EMP y 0,1 para AVT y MT. Las curvas de regresión obtenidas para las respuestas celulares frente a AVP, OT y oCRF son chatas, con λ mayor que 0,3.

Las curvas de regresión de EMP no son paralelas con ninguna de las curvas correspondientes a los péptidos probados ($P<0,01$). Por otro lado las curvas de regresión lineal de AVT y MT tampoco son paralelas respecto a las de los agonistas más débiles: oCRF, AVP y OT ($P<0,005$). No hay diferencias significativas entre las potencias relativas de AVT y MT.

En la Figura N^o 30 observamos un perfil de secreción de ACTH y α -MSH de la columna de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato, frente a extractos de eminencia media de pato (EMP), AVT y oCRF.

Se observa una correlación entre las dosis del secretagogo probadas y la respuesta de las células frente a las mismas. Asimismo observamos que la liberación de ACTH es concomitante con la de α -MSH, y todos los secretagogos que liberan ACTH se comportan de igual manera respecto a α -MSH, existiendo un estrecho paralelismo entre las curvas dosis-respuesta para ambos péptidos con cada uno de los secretagogos probados. Debe destacarse, sin embargo, que las cantidades relativas de ambas hormo

nas liberadas difieren, siendo la cantidad de ACTH liberada alrededor de 20 veces mayor que la de α -MSH.

2.- Efecto sinérgico entre AVT y CRF.

En las Figuras N^o 31 y 32, se observa el sinergismo existente entre AVT y CRF sobre las secreciones de ACTH y α -MSH cuando estos péptidos se perfunden juntos en cantidades iguales en peso (ng/ml). Los coeficientes de regresión de las curvas dosis-respuesta obtenidas cuando estos péptidos se perfunden conjuntamente, difirieron significativamente ($P < 0,01$) respecto del coeficiente de regresión de las curvas dosis-respuesta obtenidas con AVT. El test de interacción de los efectos combinados de los dos péptidos fue estadísticamente significativo ($P < 0,01$). Se hicieron ensayos en los cuales se variaron las cantidades relativas de AVT y CRF combinadas, pero el efecto potenciador era menor que el obtenido con las proporciones utilizadas en los experimentos mostrados en las Figuras N^o 31 y 32. Cuando se mantuvo la concentración de AVT constante, variando la cantidad de CRF perfundida, no obtuvimos un aumento significativo en el efecto potenciador observado con las dosis menores del péptido (resultados no mostrados).

3.- Comparación de la respuesta de la células corticomelanotropas del pato con células corticotropas y melanotropas de rata.

De manera de poder comparar la respuesta de las células adenohipofisarias del pato con la respuesta de las células corticotropas de la rata, respecto de los secretagogos probados, se prepararon células dispersas de adenohipófisis de rata y se trataron con los mismos estímulos que las células de pato. Las curvas dosis-respuesta se observan en la Figura N^o 33. Los resultados obtenidos son esencialmente similares a los publicados anteriormente (164, 165, 195) utilizando el mismo sistema.

Hay diferencias llamativas en lo que respecta a la respuesta de las células adenohipofisarias de rata que se evidencian inmediatamente al compararlas con las respuestas obtenidas con el sistema de células adenohipofisarias de pato. En primer lugar, de todos los péptidos probados el oCRF ejerció la máxima respuesta relativa respecto de los extractos de eminencia media de rata (EMR).

En segundo lugar, el sistema de células dispersas de adenohipófisis de rata no discriminó entre los diferentes péptidos neurohipofisarios probados; que ejercieron respuestas significativamente menores ($P < 0,01$) que el oCRF, a las máximas dosis empleadas.

Finalmente el sinergismo observado entre CRF y AVP dio una curva dosis-respuesta que era bastante paralela a la curva dosis-respuesta obtenida con los EMR.

Por otro lado, con el objeto de comparar la respuesta de las células corticotelanotropas del pato, frente a los diferentes secretagogos ensayados, con la respuesta de las células melantropas de la Pars Intermedia de la rata, se prepararon células Pars Intermedia, de la misma forma, y se trataron, con los mismos estímulos que las células de pato. Los resultados obtenidos (no se muestran) coinciden en general con los obtenidos previamente por otros investigadores (285) con la diferencia que mientras que Kraicer, 1985 (316) demuestra que CRF libera simultáneamente ACTH y α -MSH, nosotros observamos que el mismo, produce secreción de ACTH, pero no de α -MSH en la PI de la rata. Hay otras diferencias notables, en cuanto al comportamiento del sistema de células dispersas de Pars Intermedia de rata cuando lo comparamos con el sistema de células Corticotelanotropas de pato. En primer lugar, en el sistema de células dispersas de PI de rata AVP, la hormona presora típica de los mamíferos, no ejerce ningún efecto sobre la secreción de ACTH o α -MSH, mientras que el oCRF, provoca la liberación de ACTH, pero no provoca ningún efecto sobre la secreción de α -MSH. En segundo lugar, al estimular las células de Pars Intermedia de rata con una concentración despolarizante de iones K^+ (45 mM ClK) se produce la liberación simultánea de ACTH y α -MSH. (resultados no mostrados)

4.- Discusión.

Los experimentos descriptos en el presente capítulo, se llevaron a cabo como primer paso para intentar dilucidar la identidad de las sustancias involucradas en la actividad corticoliberina (CL) y melanoliberina (ML) de los extractos de eminencia media de pato, y por lo tanto, esclarecer los mecanismos de regulación fisiológica de las células corticotelanotropas de la adenohipófisis de las aves. Comenzamos nuestro estudio proban-

do los mismos péptidos que se sabía eran los más importantes secretagogos de ACTH en las células corticotropas de mamíferos (154, 164); o sea péptidos neurohipofisarios típicos de mamíferos como AVP y Oxitocina (OT) y de aves, como AVT y Mesotocina (MT); y también el factor liberador de corticotrofina recientemente caracterizado de 41 aminoácidos, secuencia ovina (oCRF).

La elevada sensibilidad y precisión del sistema "in-vitro" utilizado nos permitió evaluar la respuesta de las células corticomelanotropas de pato frente a los diversos péptidos probados y comparar los datos, con los obtenidos utilizando el mismo sistema en la rata. Como dijimos previamente, los extractos de eminencia media dieron curvas dosis-respuesta muy empinadas con una capacidad ($V_{m\acute{a}x}$) igual a la ejercida por una concentración despolarizante de iones potasio (45 mM ClK) en lo que la liberación de ACTH respecta (recordemos que una solución 45mM ClK no provoca ningún efecto sobre la liberación de α -MSH en células corticomelanotropas de pato). Todos los péptidos probados se comportaron como agonistas parciales lo que era previsible teniendo en cuenta lo que sucedía en la rata (164). (Ver Figura N^o 6). Lo que distingue a las células corticomelanotropas del pato si las comparamos con las corticotropas de la rata es la actividad relativa observada por los distintos péptidos probados respecto a las respuestas obtenidas con los extractos de eminencia media. CRF ovino, el factor secretagogo de corticotrofina más potente en la rata (154, 164), mostró una potencia muy similar a los secretagogos de ACTH y α -MSH más débiles probados en el sistema de células corticomelanotropas de pato, a saber: AVP y OT.

Para explicar estas diferencias, postulamos que: a.- el CRF natural del pato es diferente del péptido de mamíferos, y consecuentemente, este péptido es sólo parcialmente activo en el sistema de células corticomelanotropas de pato o; b.- el control hipotalámico sobre la secreción de ACTH y α -MSH en aves, recae fundamentalmente en otras sustancias no relacionadas con el CRF. La información de la cual disponemos nos sugiere la existencia de una sustancia relacionada con el CRF, que estaría involucrada en la regulación de la secreción de ACTH y α -MSH en las aves. Corroborando nuestros resultados in-vitro con el CRF, la coloración inmunohistoquímica

de los terminales nerviosos de la eminencia media de la codorniz (Mikami, 1984) (391); del pollo (Bläsher, 1984) (392) y del pato (ver capítulo 7) con un antisuero anti oCRF sugiere la presencia de un péptido CRF-simil que podría estar involucrado en la modulación de la liberación de ACTH y α -MSH en las aves. Más aún, hemos detectado un material CRF-simil en extractos de eminencia media de pato, utilizando un sistema de radioinmunoanálisis para CRF de mamíferos, que desplaza la marca de oCRF de una forma indistinguible con respecto al oCRF utilizado como standard (ver capítulo VII). Una posible interpretación de todos estos resultados podría ser que el CRF de las aves estuviera relacionado antigénicamente con el CRF de mamíferos, pero que tuviera diferencias estructurales en el sitio biologicamente activo, lo que lo haría mucho más potente a nivel de los receptores de las células corticomelanotropas del pato. Una inactivación del CRF utilizado en la perfusión no es probable, ya que el mismo ejerció la respuesta más potente de todos los péptidos ensayados en el sistema de rata, lo que está de acuerdo con los reportes previos de otros investigadores que usaron un sistema de bioensayo de actividad liberadora de corticotrofina similar al aquí utilizado. En consecuencia, el menor sinergismo relativo observado cuando perfundimos conjuntamente AVT y CRF en el sistema de pato, comparado con el mismo efecto en la rata, también puede ser explicado por la débil actividad biológica del oCRF en el pato. Más aún, aumentando la cantidad de CRF relativa a AVT no resultó en un incremento de la potencia secretagoga observada para AVT. La otra diferencia llamativa, en el sistema de pato, reside en el patrón de respuesta con respecto a los diferentes péptidos neurohipofisarios ensayados. Mientras que las células corticotropas de la rata no discriminan los diferentes péptidos neurohipofisarios, en términos de su capacidad para estimular la liberación de ACTH, las células corticomelanotropas del pato parecen poseer una gran especificidad de respuesta en lo que respecta a la ocurrencia filogenética de estos péptidos, ya que responden preferencialmente frente a AVT y MT, los péptidos neurohipofisarios naturales de las aves. Contrariamente, los péptidos neurohipofisarios típicos de mamíferos, OT y AVP se comportan como agonistas parciales muy débiles en el pato.

Otra característica importante de la respuesta de las células corticomelanotropas del pato al péptido presor natural de las aves AVT, es que la misma es de alrededor del 60% respecto a la capacidad de los extractos de eminencia media de pato, mientras que la capacidad de AVP en el sistema de rata, relativa a la ejercida por los extractos de eminencia media de rata es de aproximadamente el 25%. Teniendo en cuenta las diferencias interespecie en lo que respecta a la actividad de los péptidos neurohipofisarios, se podría postular en que las aves, los péptidos neurohipofisarios desempeñarían un rol más importante en la liberación de ACTH y α -MSH de las células corticomelanotropas del pato, que el que desempeñan en mamíferos.

Si comparamos la respuesta de las células corticomelanotropas del pato con la de las células corticotropas y melanotropas de la rata observamos algunas similitudes y diferencias, algunas de las cuales ya hemos discutido. Desde un punto de vista topográfico e histológico las células CM del pato se asemejan a las células corticotropas de la adenohipófisis de la rata, pero desde el punto de vista inmunohistoquímico, éstas también se asemejan a las células melanotropas de la Pars Intermedia de la rata, ya que como habíamos dicho anteriormente, hemos demostrado por técnicas de inmunohistoquímica (56) la coexistencia de ACTH y α -MSH en el mismo tipo celular de la adenohipófisis del pato. Desde el punto de vista de la regulación fisiológica de la secreción de estas hormonas, estas células se asemejarían más a las corticotropas típicas de los mamíferos que a las melanotropas de mamíferos, con la salvedad que en las células CM del pato, la relación entre la ACTH y α -MSH secretadas es de alrededor de 20 veces más ACTH que α -MSH mientras que en las corticotropas de mamíferos esta relación es de más de 100 veces. Esto quedó demostrado al comparar las respuestas de estas células frente a los diferentes secretagogos probados, mientras las corticotropas de mamíferos y las células CM del pato respondían secretando ACTH; y ACTH concomitantemente con α -MSH respectivamente, frente a oCRF y péptidos neurohipofisarios, las células melanotropas no respondieron frente al péptido neurohipofisario típico de mamíferos AVP y frente al oCRF respondieron secretando ACTH, pero no α -MSH.

Como conclusión, de los resultados hasta aquí discutidos puede sugerirse que, como en los mamíferos, la regulación de la secreción de ACTH y α -MSH en las aves, estaría bajo el control de un sistema de múlticomponentes, entre los que se pueden incluir: AVT, MT, y probablemente una sustancia CRF-simil.

La localización de axones que contenían AVT y MT (75) y de una sustancia CRF-simil en los axones de la eminencia media de diversas especies aviares (391,392), sustentan dicha hipótesis. Por otro lado, hemos demostrado, en extractos de eminencia media de pato, la presencia de otras sustancias (catecolaminas) que también contribuyen a la actividad liberadora de ACTH y α -MSH de los mismos (ver capítulo V).

Curvas dosis-respuesta de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato frente a varios péptidos y extractos de eminencia media de pato. (ACTH)

Figura N° 28: Las curvas dosis-respuesta se obtuvieron luego de perfundir células dispersas de adenohipófisis de pato empaquetadas en una columna junto con Bio Gel P2 con varias diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP) o diferentes dosis de los péptidos sintéticos: Arginina-Vasopresina (AVP), oxitocina (OT), Arginina-Vasotocina (AVT), Mesotocina (MT) y el factor liberador de corticotrofina (oCRF). Los valores para cada dosis probada corresponden a la cantidad total de ACTH liberada (ng) dosada por radioinmunoanálisis. (media $\pm$ SEM; n=3)

Curvas dosis-respuesta de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato frente a varios péptidos y extractos de eminencia media de pato. (α -MSH)

Figura Nº 29: Las curvas dosis-respuesta se obtuvieron luego de perfundir células dispersas de adenohipófisis de pato empaquetadas en una columna junto con Bio Gel P2 con varias diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP) o diferentes dosis de los péptidos sintéticos: Arginina-Vasopresina (AVP), Oxitocina (OT), Arginina-Vasotocina (AVT), Mesotocina (MT) y el factor liberador de corticotrofina (oCRF). Los valores para cada dosis probada corresponden a la cantidad total de α -MSH liberada (ng) dosada por radioinmunoanálisis. (media $\pm$ SEM; n=3).

Perfil de secreción de ACTH y α -MSH de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.

Figura N° 30: Perfil de secreción de ACTH y α -MSH de células dispersas de adenohipófisis de pato empaquetadas en una columna junto con Bio Gel P2 frente a diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP). Diferentes dosis de Arginina Vasotocina (AVT) y factor liberador de corticotrofina (α CRF). Cada estímulo se perfundió durante 3 min., con intervalos de 10 min. entre un estímulo y el siguiente. Las fracciones colectadas fueron de 1 ml y la velocidad de perfusión fue de 0,5 ml/min. Tanto la ACTH como la α -MSH liberadas se valoraron por radioinmunoanálisis.

Sinergismo entre AVT y CRF sobre la liberación de ACTH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.

Figura N° 31: Las curvas dosis-respuesta se obtuvieron al perfundir células dispersas de adenohipófisis de pato con varias dosis de AVT y CRF; perfundidos juntos en iguales dosis (ng/ml). Se incluyen curvas dosis-respuesta para extractos de eminencia media de pato (EMP) y para los péptidos perfundidos en forma individual, de modo de poder comparar los efectos producidos. Los valores para cada dosis probada corresponden a la cantidad total de ACTH liberada (ng) dosada por radioinmunoanálisis. (media $\pm$ SEM: n=3).

Sinergismo entre AVT y CRF sobre la liberación de α -MSH en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato.

Figura N° 32: Las curvas dosis-respuesta se obtuvieron al perfundir células dispersas de adenohipófisis de pato con varias dosis de AVT y CRF perfundidos juntos en iguales dosis (ng/ml). Se incluyen curvas dosis-respuesta para extractos de eminencia media de pato (EMP) y para los péptidos perfundidos en forma individual, de modo de poder comparar los efectos producidos. Los valores para cada dosis probada corresponden a la cantidad total de α -MSH liberada (ng) dosada por radioinmunoanálisis. (media $\pm$ SEM; n=3).

Curvas dosis-respuesta de células dispersas de adenohipófisis de rata frente a extractos de eminencia media de rata y varios péptidos. Sinergismo entre AVT y CRF.

Figura N° 33: Las curvas dosis-respuesta se obtuvieron luego de perfundir células dispersas de adenohipófisis de rata con AVP, AVT, OT y CRF; se observó un efecto sinérgico cuando estos péptidos se perfundieron juntos en iguales dosis (ng/ml). Se incluye una curva dosis-respuesta para extractos de eminencia media de rata (EMR), de modo de poder comparar los efectos producidos. Los valores para cada dosis probada corresponden a la cantidad total de ACTH liberada (ng) dosada por radioinmunoanálisis. (media $\pm$ SEM; n=3).

CAPITULO V

Investigación de la actividad liberadora de ACTH y α -MSH de varias aminas biógenas.

1.- Experimentos "in-vitro": curvas dosis- respuesta.

La cantidad total de ACTH liberada por el sistema de células adenohipofisarias de pato osciló entre 9 y 105 ng, mientras que la cantidad total de α -MSH lo hizo entre 0,4-5,2ng en la serie de experimentos descriptos. Ninguno de los estímulos empleados, a las concentraciones ensayadas interfirieron en los sistemas de radioinmunoanálisis utilizados. Las curvas dosis-respuesta se obtuvieron tanto para cada amina biógena, como para los extractos de eminencia media (EMP), con por lo menos cuatro concentraciones (diluciones) diferentes de los secretagogos empleados. La actividad biológica de los secretagogos fue caracterizada utilizando los siguientes parámetros: la capacidad para inducir una respuesta biológica máxima ($V_{m\acute{a}x}$ o actividad intrínseca) y, siempre que fuera posible la potencia relativa, respecto de un secretagogo determinado, según Shwyzer y col. 1971 (389); y Sayer y col., 1975 (390) (A_{50} : concentración del estímulo que provoca el 50% de la respuesta máxima).

a) Efecto de Noradrenalina (NA) y Adrenalina (A).

La estimulación de las células corticotelanotropas de pato con pulsos de tres minutos de diferentes concentraciones de A y NA provocó una liberación paralela y simultánea de ACTH y α -MSH, obteniéndose una buena correlación dosis-respuesta en el rango de concentraciones ensayadas: desde 10^{-9} hasta 10^{-4} M. En las Figuras N^o 34 y 35, se observan las curvas dosis-respuesta obtenidas luego de estimular las células adenohipofisarias de pato con diferentes diluciones de EMP y con diferentes concentraciones de las catecolaminas A y NA. El EMP equivalente a 0,2 EMP/ml ejerció la respuesta máxima en la secreción tanto de ACTH como de α -MSH. Tanto NA como A se comportaron como agonistas parciales en el sistema empleado con respecto a los EMP, ya que la respuesta de ambas catecolaminas llegó a una meseta sin alcanzar la respuesta biológica máxima ($V_{m\acute{a}x}$ o actividad intrínseca) observada para los EMP. Tanto la NA como la A mostraron potencias semejantes, con una $V_{m\acute{a}x}$ de

aproximadamente 0,66 con respecto a la $V_{\max}$ ejercida por los EMP tanto para ACTH como para α -MSH. No se observaron diferencias significativas en las potencia relativas de A y NA. Ambas catecolaminas provocaron un aumento en la secreción de ACTH y α -MSH de 5 veces respecto del basal, a una A_{50} de 80 nM. Con los EMP se observa un aumento relativo en la secreción de ACTH y α -MSH de 7 veces respecto del basal de secreción a una A_{50} de 0,043 EMP/ml. A dosis de A y NA menores de 10^{-9} M no se observaron aumentos respecto de los basales de secreción para ACTH o α -MSH.

b) Efecto de Fenilefrina (Phe) e Isoproterenol (IP).

La especificidad de los efectos de Adrenalina y Noradrenalina sobre la secreción de ACTH y α -MSH en células corticomedulotropas de adenohipofisis de pato se estudió utilizando el agonista α -adrenérgico Fenilefrina y el agonista β -adrenérgico Isoproterenol. En las Figuras N° 36 y 37, se observan las curvas dosis-respuesta obtenidas luego de estimular las células adenohipofisarias de pato con las distintas diluciones de los extractos de eminencia media de pato (EMP) y con diferentes concentraciones de Fenilefrina e Isoproterenol. El EMP ejerció la respuesta máxima con respecto a los otros estímulos ensayados: Phe e IP. Tanto Phe e IP se comportaron como agonistas parciales respecto a los EMP, y también respecto a NA y a A, ya que la respuesta de ambos agonistas farmacológicos llegó a una meseta sin alcanzar la actividad intrínseca o $V_{\max}$ observada para los EMP y para NA o A respectivamente (ver Figura N° 34 y 35). Las actividades intrínsecas ($V_{\max}$) de Phe e IP son significativamente diferentes ($P < 0,01$) entre sí siendo la $V_{\max}$ de Phe aproximadamente 0,38 con respecto a la $V_{\max}$ ejercida por EMP, mientras que la $V_{\max}$ de IP es de 0,19 respecto a la ejercida por EMP tanto en lo que respecta a la secreción de ACTH como de α -MSH. También se observan diferencias significativas en las potencias relativas de ambas aminas siendo la A_{50} de la Phe de 700nM, mientras que la A_{50} del IP es de 5.000 nM. En varios experimentos se ha podido establecer el siguiente orden de potencias para varios agentes catecolaminérgicos (valores de A_{50}): (-) Adrenalina = (-) Noradrenalina (80nM) > Fenilefrina (700 nM) > Isoproterenol (5000nM), en lo que respecta a sus efectos secretagogos sobre ACTH y α -MSH.

c) Efecto de los antagonistas adrenérgicos Fentolamina y Propranolol sobre la secreción de ACTH y α -MSH inducida por Noradrenalina.

Para intentar dilucidar la especificidad de los efectos de la NA sobre la liberación de ACTH y α -MSH en células dispersas de adenohipófisis de pato, probamos los efectos de la Fentolamina, un antagonista de los receptores adrenérgicos α_1 y α_2 (Starke y Dogherty, 1980) (393) y del Propranolol un antagonista que posee igual afinidad por los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 (Leclerc y col., 1981) (394). En las figuras N°38 y 39 observamos los efectos de dosis crecientes de Fentolamina y Propranolol sobre la secreción de ACTH y α -MSH de células corticomelanotropas de adenohipófisis de pato, inducida por una concentración 10^{-6} M de Noradrenalina. Tanto la Fentolamina como el Propranolol se ensayaron en el rango de dosis desde 10^{-9} M hasta 10^{-4} M. Ninguno de los dos antagonistas probados interfirieron en el radioinmunoanálisis de ACTH y α -MSH en el rango de dosis ensayados, ni tampoco alteraron la secreción basal de estas hormonas cuando fueron perfundidos sólo a través de la columna de células dispersas de adenohipófisis de pato. Como puede observarse en las Figuras N° 38 y 39, la Fentolamina revierte el efecto estimulatorio tanto sobre ACTH como sobre α -MSH, de la NA. Los efectos inhibitorios de la Fentolamina ya se hacen significativos a partir de una concentración de 10^{-8} M ($P < 0,01$). A concentraciones de Fentolamina de 10^{-6} M, los efectos secretagogos de la Noradrenalina 10^{-6} M son totalmente bloqueados por dicho antagonista α -adrenérgico. Cuando se perfundieron las células corticomelanotropas con dosis crecientes del antagonista β -adrenérgico Propranolol, observamos que este sólo ejerce un ligero aunque significativo efecto inhibitorio sobre la potencia secretagoga de NA 10^{-6} M, a concentraciones superiores a $10 \mu\text{M}$ ($P < 0,01$).

d) Efectos de Serotonina (5-HT).

Al perfundir las células corticomelanotropas de adenohipófisis de pato, con Serotonina (5-HT) en el rango de dosis desde 10^{-9} M hasta 10^{-6} M, no se observa ningún efecto sobre la secreción de ACTH o α -MSH, sólo se observa un débil efecto estimulatorio a partir de una concentración de

10^{-5} M (Figura N° 40). 5-HT no interfirió con los sistemas de radioinmunoanálisis empleados para dosar ACTH o α -MSH en el rango de dosis utilizado para estimular las células.

e) Efectos de Dopamina (DA).

Al perfundir las células corticotelanotropas de adenohipófisis de pato con Dopamina (DA), en el rango de dosis desde 10^{-9} M hasta 10^{-6} M, no se observa ningún efecto sobre la secreción de ACTH o α -MSH, sólo se observa, al igual que con 5-HT, un ligero efecto estimulatorio a partir de una concentración de 10^{-5} M (ver Figuras N° 41 y 42). DA no interfirió con los sistemas de radioinmunoanálisis empleados para dosar ACTH o α -MSH en el rango de dosis empleado para estimular las células. Para intentar dilucidar la especificidad del débil efecto secretagogo de la DA sobre ACTH y α -MSH en células dispersas de adenohipófisis de pato, probamos los efectos del sulpiride, un antagonista dopaminérgico, y de Propranolol, un antagonista β -adrenérgico. Ninguno de los dos antagonistas, en el rango de dosis ensayadas (10^{-7} M- 10^{-4} M). Logró revertir el débil efecto secretagogo tanto sobre ACTH como sobre α -MSH de la DA 10^{-5} M.

Para estudiar los efectos de esta monoamina en diferentes estados secretorios de las células corticotelanotropas de adenohipófisis de pato, se perfundi6 un extracto de eminencia media de pato en presencia de diferentes concentraciones de Dopamina. El rango de dosis de la monoamina fue desde 10^{-9} M hasta 10^{-4} M, y las dosis de extracto de eminencia media de pato empleada fue de 0,050 EMP/ml. La liberación de ACTH y α -MSH frente a estos estímulos se observa en las Figuras N° 41 y 42 respectivamente. Como puede observarse en la Figura N° 41, el extracto de EMP, a la dosis ensayada provoca una liberación de ACTH de aproximadamente 8,6 veces respecto al basal, y su potencia secretagoga no sufrió modificaciones en presencia de las distintas concentraciones de DA probadas. En la Figura N° 42 se observan los efectos secretagogos sobre α -MSH ejercidos por una dilución de un extracto de EMP sólo (0,050 EMP/ml) provocó un aumento en la secreción de α -MSH de aproximadamente 9,0 veces respecto al basal de secreción, y su po-

tencia secretagoga no se ve afectada en presencia de las distintas dosis de DA probadas.

f) Actividad intrínseca ($V_{\max}$) de las distintas monoaminas probadas.

En las Figuras N^o 43 y 44 observamos la máxima cantidad de ACTH y α -MSH liberada ($V_{\max}$) en ng totales luego de estimular las células corticomelanotropas de adenohipófisis de pato con: extractos de EMP, NA, A, Phe, IP, DA y 5-HT. De todos los secretagogos probados,, el que tiene una mayor actividad intrínseca ($V_{\max}$) son los extractos de EMP, a una concentración equivalente a 0,20 EMP/ml provocando una liberación de ACTH de 105 ± 5 ng totales y de α -MSH de $5,1 \pm 0,2$ ng totales, en la serie de experimentos descriptos. Tanto NA como A ejercen su máxima respuesta biológica a una concentración de 10^{-5} M siendo sus $V_{\max}$ 69 ± 3 ng de ACTH totales liberados y de $3,2 \pm 0,1$ ng de α -MSH totales liberados.

La Phe también ejerce su máxima respuesta biológica a una concentración de 10^{-5} M, pero su $V_{\max}$ es de aproximadamente $0,57 \pm 0,02$ respecto a la $V_{\max}$ ejercida por NA y A, tanto para ACTH como para α -MSH. El Isoproterenol, la Dopamina y la Serotonina también ejercen su $V_{\max}$ a una concentración de 10^{-5} M, pero la respuesta evocada es mucho menor que con los estímulos anteriormente ensayados, siendo ésta de alrededor de $0,27 \pm 0,01$ respecto a la $V_{\max}$ de NA y A para el Isoproterenol, y de $0,20 \pm 0,01$ para Dopamina y Serotonina; tanto para ACTH como para α -MSH.

2.- Experimentos "in-vivo": efectos de Ergocriptina y Haloperidol sobre los niveles plasmáticos de α -MSH.

En el grupo de animales tratados con Haloperidol (un antagonista dopaminérgico) no se observan diferencias significativas en los niveles plasmáticos de α -MSH, respecto de los patos controles, mientras que en el grupo de animales tratados con Ergocriptina (un agonista dopaminérgico), se observa una disminución significativa en los niveles plasmáticos de esta hormona. (ver Tabla N^o 10).

3.- Discusión.

Los experimentos descriptos en el presente capítulo se llevaron a cabo con el objeto de probar el efecto de algunas aminas biógenas en la

liberación de ACTH y α -MSH sobre las células corticomelanotropas de la adenohipófisis del pato, como un primer paso para esclarecer la posible participación de estas sustancias en el efecto ACTH y α -MSH liberador que poseen los EMP, y subsecuentemente contribuir a dilucidar los mecanismos de regulación fisiológica de estas células. Los neurotransmisores probados, fueron aquellos que se sabía ejercían un efecto regulador en la secreción de ACTH y/o α -MSH en la rata (157, 218, 284, 285).

El sistema "in-vitro" utilizado es muy sensible y preciso (1) y nos permitió evaluar la capacidad secretagoga de ACTH y α -MSH por parte de los distintos neurotransmisores probados. Como habíamos dicho anteriormente los extractos de EMP dieron curvas dosis-respuesta con una gran pendiente y con una actividad intrínseca ($V_{m\acute{a}x}$) igual a la obtenida con una concentración despolarizante de iones potasio (45mM ClK) en lo que a la secreción de ACTH se refiere. Todos los neurotransmisores se comportan como agonistas parciales, ya que con ninguno de ellos se logró la $V_{m\acute{a}x}$ alcanzada con los extractos de EMP. De todos los agonistas probados se observó que en el pato la NA y la A son los más potentes, ejerciendo una $V_{m\acute{a}x}$ del 66% con respecto a la $V_{m\acute{a}x}$ ejercida por los EMP, esto concuerda con lo observado en la rata por Raymond y col., 1981 (157); la diferencia reside que mientras en la rata el orden de potencias es $A > NA$, en el pato ambas catecolaminas son equipotentes con una A_{50} de 80 nM tanto para ACTH como para α -MSH. Estas diferencias encontradas pueden deberse en parte al sistema "in-vitro" empleado, ya que mientras Raymond y col. (157) emplearon cultivos primarios de células dispersas de adenohipófisis de rata, nosotros empleamos un sistema de células dispersas sometidas a perfusión continua. Otra explicación posible para esta diferencia, podría ser que el receptor catecolaminérgico del pato tuviera una cinética de respuesta diferente al correspondiente en la rata. Es importante destacar que mientras que con los extractos de EMP se obtiene un aumento de la secreción de ACTH y α -MSH que va desde 4 hasta 13 veces en el rango de dosis probado; con A y NA, se logra un aumento de 5,8 veces a una dosis correspondiente a la $V_{m\acute{a}x}$, esto daría un indicio del posible rol fisiológico

de estas catecolaminas en la actividad corticoliberina y melanoliberrina en el pato. Estos resultados "in-vitro" están sustentados por los datos bioquímicos que confirman la presencia de cantidades apreciables de NA en extractos de EMP (4) que podrían contribuir de manera apreciable a la actividad secretagoga de ACTH y α -MSH de dichos extractos. El hallazgo de esta catecolamina concuerda con los estudios histoquímicos de Hartwig, 1975 (395) y Hatwig y Reynhold, 1980 (396), quienes detectaron por técnicas de microscopía de fluorescencia fibras que contenían NA y probablemente A en el hipotálamo de las aves. Estos hallazgos podrían contribuir a dar una mayor sustentación a la hipótesis que las catecolaminas tendrían importancia fisiológica en la regulación de ACTH y α -MSH en las aves. Cuando comparamos la capacidad máxima de respuesta en lo que respecta a la secreción de ACTH y α -MSH en el pato, de diferentes catecolaminas y neurofármacos, podemos establecer el siguiente orden de $V_{m\acute{a}x}$:: NA=A> Phe>>IP> DA= 5-HT. Se hace necesario destacar que la $V_{m\acute{a}x}$ del agonista α -adrenérgico Fenilefrina es del orden 190% respecto a la $V_{m\acute{a}x}$ del agonista β -adrenérgico Isoproterenol. Estos resultados podrían indicar que las respuestas a las catecolaminas en células dispersas de adenohipófisis de pato estarían mediadas por un receptor adrenérgico α -simil, consecuentemente, para corroborar esta hipótesis se bloquearon los efectos de los agonistas con los correspondientes antagonistas α y β -adrenérgicos Fentolamina y Propranolol respectivamente. Los efectos de estos antagonistas sobre la actividad liberadora de ACTH y α -MSH de la Noradrenalina, son consistentes con las características de un mecanismo α -adrenérgico-simil que mediaría la liberación de estas hormonas en las células corticome^llanotropas del pato. Los datos presentados en el presente capítulo contribuyen a dilucidar las características de la estimulación α -adrenérgica-simil en las células corticome^llanotropas de la adenohipófisis del pato, y muestran los cambios paralelos que se producen en la secreción de los péptidos derivados del precursor común POMC (ACTH y α -MSH) por parte de estas células ante los diversos agentes catecolaminérgicos ensayados. Sin embargo, hay que señalar que en el perro, el efecto neto de la administración "in-vivo" de agonistas α -adrenérgicos, produce una

inhibición en la secreción de ACTH (220). Esta aparente discrepancia puede ser explicada teniendo en cuenta los efectos de los agonistas α -adrenérgicos a nivel del Sistema Nervioso Central, donde se demostró que NA inhibe la secreción de CRF inducido por 5-HT o acetilcolina en tejido hipotalámico "in-vitro" (397).

En el presente trabajo no se ha explorado esa posibilidad en el pato, dado que no fueron probadas catecolaminas o fármacos adrenérgicos "in-vivo". En lo que respecta a la actividad intrínseca sobre la secreción de ACTH y α -MSH de 5-HT, esta es escasa, y sólo ejerce un débil efecto secretagogo a concentraciones de $10\mu\text{M}$.

La Dopamina es actualmente considerada como el factor inhibidor de la liberación de α -MSH(MIF) de la PI en los vertebrados (236, 253, 284, 285).

Los resultados mostrados en el presente capítulo, demuestran que en el pato, la Dopamina no ejerce efectos inhibitorios sobre la secreción de ACTH y α -MSH en las células corticomelanotropas y sólo a elevadas concentraciones ejerce un ligero efecto estimulatorio sobre la secreción de estas hormonas probablemente a través de un receptor α -adrenérgico dado que los antagonistas dopaminérgicos y β -adrenérgicos probados no modifican el débil efecto secretagogo de esta monoamina sobre ACTH y α -MSH en las células CM del pato. No hay reportes sobre la acción de esta monoamina en lo que respecta a la secreción de las hormonas derivadas de POMC de la adenohipófisis de las aves. Como es bien sabido, en mamíferos existe una gran similitud entre los mecanismos que regulan la secreción de α -MSH y PRL. En aves, existen numerosos trabajos que tratan sobre los posibles mecanismos que regulan la secreción de PRL, en los que se demuestra que si bien la DA no afecta los niveles basales de secreción de esta hormona, sí actúa inhibiendo la liberación de la misma, cuando su secreción está estimulada por el hipotálamo (398). Estos autores demuestran que los efectos inhibitorios de la DA sobre la secreción de PRL, se ejercen tanto a nivel hipofisario, como hipotalámico. Nuestros resultados en lo que respecta al efecto de DA sobre la secreción de ACTH y α -MSH de las células corticomelanotropas del pato, demuestran que esta monoamina no actuaría como un factor

inhibidor, ni en condiciones de secreción basal ni cuando la secreción de estas hormonas está estimulada por extractos de EMP "in-vitro". Con lo que demostramos que en el pato, la DA no tiene una acción directa a nivel de las células adenohipofisarias. Sin embargo, nuestros resultados "in-vivo", nos indican, que como la Ergocriptina, un agonista dopaminérgico, produce una disminución de los niveles plasmáticos de α -MSH en el pato, esta monoamina (DA) podría actuar inhibitoriamente a nivel hipotalámico. Esto nos sugiere que en el pato la secreción de la hormona liberadora de MSH (MRH) (que por lo que hasta el momento sabemos podría ser idéntica a la corticoliberina) podría estar bajo un control inhibitorio ejercido por Dopamina hipotalámica. De lo hasta aquí expuesto, podríamos concluir que en el hipotálamo podría haber neuronas dopaminérgicas (conclusión sustentada por la presencia de dopamina en el Lóbulo Infundibular) que podrían inhibir otras células nerviosas que a su vez secretarían algún factor liberador de melanotrofina (MRF), y este a su vez podría llegar a las células CM de la adenohipófisis a través de los vasos porta. La razón por la cual el Haloperidol no afecta los niveles plasmáticos de MSH resulta difícil de explicar a la luz de los resultados obtenidos, podría ser que en la circunstancia de nuestros experimentos, el mencionado mecanismo inhibitorio dopaminérgico endógeno no estuviera operando, pero que el mismo pudiera ser evocado por la inyección de ergocriptina. Debemos agregar que por técnicas bioquímicas hemos podido demostrar (4) la presencia de DA en extractos de EMP. Asimismo, por técnicas de microscopía de fluorescencia, se ha demostrado la presencia de fibras conteniendo Serotonina y Dopamina en el hipotálamo de la paloma y la codorniz (396). Por lo expuesto, nuestros resultados indicarían que estas monoaminas no actúan a nivel de las células corticomelanotropas adenohipofisarias en la regulación del mecanismo de secreción de ACTH y α -MSH, pero tal vez ejerzan su acción a nivel del Sistema Nervioso Central controlando la secreción de las hormonas hipofisiotrópicas correspondientes.

De lo hasta aquí expuesto se desprende que diversos agentes catecolaminérgicos ejercen un efecto potente y concomitante sobre la secreción de ACTH y α -MSH actuando directamente a nivel de la adenohipófisis del

pato. El orden de potencias de los diferentes agentes catecolaminérgicos probados, así como la especificidad de la acción de los antagonistas con el proceso secretorio inducido por catecolaminas (NA), son consistentes con las características de un mecanismo α -adrenérgico en las aves.

Se concluye por lo tanto, que en las aves, al igual que en los mamíferos, la regulación de la secreción de ACTH y α -MSH estaría mediada por un sistema de multicomponentes entre los que se sitúan péptidos neurohipofisarios, CRF y catecolaminas de origen central y/o periféricos.

Por otra parte, es interesante destacar que el hallazgo de una secreción concomitante y paralela de ACTH y α -MSH inducida por las distintas monoaminas probadas, al actuar sobre las células corticotelotropas de adenohipófisis de pato, extienden los resultados presentados en los anteriores capítulos, donde observamos que extractos de EMP, CRF, y diversos péptidos neurohipofisarios también provocaban una liberación paralela y concomitante de las hormonas antes mencionadas. Estos datos nos indican que al igual que lo descrito para las células corticotropas de rata (346) los estímulos agudos de secreción de las hormonas liberadas por las células corticotelanotropas de la adenohipófisis del pato, no producen cambios en las proporciones relativas en que se segregan los diferentes productos del precursor POMC, lo que equivale a decir que esos estímulos no afectan la actividad de las endopeptidasas involucradas en el procesamiento de ese precursor.

EFFECTO DE NORADRENALINA Y ADRENALINA SOBRE LA SECRECION
DE ACTH EN CELULAS DISPERSAS PERFUNDIDAS DE
ADENOHIPOFISIS DE PATO

Figura 34. Curvas dosis-respuesta obtenidas perfundiendo células adenohipofisarias de pato con diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP/ml) o diferentes concentraciones de las catecolaminas Noradrenalina (NA) y Adrenalina (A) expresadas como logaritmo de la concentración molar (Log.M). Los valores obtenidos para cada concentración corresponden a la cantidad total de ACTH liberada medida por radioinmunoanálisis (RIA) (media $\pm$ SEM ; n=3)

EFFECTO DE LA NORADRENALINA Y ADRENALINA SOBRE LA
SECRECION DE α -MSH EN CELULAS DISPERSAS PER-
FUNDIDAS DE ADENOHIPOFISIS DE PATO

Figura 35. Curvas dosis-respuesta obtenidas perfundiendo células adenohipofisarias de pato con diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP/ml) o diferentes concentraciones de las catecolaminas Noradrenalina (NA) y Adrenalina (A) expresadas como logaritmo de la concentración molar (log M). Los valores obtenidos para cada concentración corresponden a la cantidad total de α -MSH liberada, medida por radioinmunoanálisis (RIA) (media $\pm$ SEM; n=3)

EFFECTO DE FENILEFRINA E ISOPROTERENOL SOBRE LA SECRECION
DE ACTH EN CELULAS DISPERSAS PERFUNDIDAS DE
ADENOHIPOFISIS DE PATO

Figura 36. Curvas dosis-respuesta obtenidas perfundiendo células adenohipófisarias de pato con diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP/ml) o diferentes concentraciones de los agonistas adrenérgicos Fenilefrina (Phe) e Isoproterenol (IP) expresadas como logaritmo de la concentración molar (Log.M). Los valores obtenidos para cada concentración corresponden a la cantidad total de ACTH liberada medida por radioinmunoanálisis (RIA) (media $\pm$ SEM; n=3)

EFFECTO DE FENILEFRINA E ISOPROTERENOL SOBRE LA SECRECION
DE α -MSH EN CELULAS DISPERSAS PERFUNDIDAS DE
ADENOHIPOFISIS DE PATO

Figura 37. Curvas dosis-respuesta obtenidas perfundiendo células adenohipofisarias de pato con diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP/ml) o diferentes concentraciones de los agonistas adrenérgicos Fenilefrina (Phe) e Isoproterenol (IP) expresadas como logaritmo de la concentración molar (log M). Los valores obtenidos para cada concentración corresponden a la cantidad total de α -MSH liberada, medida por radioinmunoanálisis (RIA) (media $\pm$ SEM; n=3).

EFFECTO DE LOS ANTAGONISTAS ADRENERGICOS FENTOLAMINA Y PROPRANOLOL SOBRE LA SECRECION DE ACTH EN CELULAS DISPERSAS PERFUNDIDAS DE ADENOHIPOFISIS DE PATO

Figura 38. Efectos de concentraciones crecientes, expresadas como logartimo de la concentración molar (log M) del antagonista α -adrenérgico Fentolamina y del antagonista β -adrenérgico Propranolol, sobre la secreción de ACTH inducida por una concentración de Noradrenalina (NA) 10^{-6} M ($\blacksquare$), en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato. Basal de secreción: $\square$. Los valores obtenidos para cada concentración corresponden a la cantidad total de ACTH liberada medida por radioinmunoanálisis (RIA) (medida $\pm$ SEM, $n=3$).

EFFECTO DE LOS ANTAGONISTAS ADRENERGICOS FENTOLAMINA Y PROPRANOLOL SOBRE LA SECRECION DE α -MSH EN CELULAS DISPERSAS PERFUNDIDAS DE ADENOHIPOFISIS DE PATO

Figura 39. Efectos de concentraciones crecientes, expresadas como el logaritmo de la concentración molar (log M) del antagonista α -adrenérgico Fentolamina y del antagonista β -adrenérgico Propranolol, sobre la secreción de α -MSH inducida por una concentración de Noradrenalina (NA) 10^{-6} M (■), en células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato. Basal de secreción: □. Los valores obtenidos para cada concentración corresponden a la cantidad total de α -MSH liberada medida por radioinmunoanálisis (RIA) (media $\pm$ SEM, n=3).

EFFECTO DE LA SEROTONINA SOBRE LA SECRECION DE ACTH Y α -MSH
EN CELULAS DISPERSAS PERFUNDIDAS DE ADENOHIPOFISIS DE PATO

Figura 40. Curvas dosis-respuesta obtenidas luego de perfundir las células adenohipofisarias de pato con distintas concentraciones de serotonina (5-HT) expresadas como logaritmo de la concentración molar (log M). Se incluye una curva dosis-respuesta para distintas diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP), para comparar las respuestas obtenidas. Los valores para cada concentración se expresan como ng totales de ACTH y α -MSH liberados dosados por radioinmunoanálisis (RIA) (media $\pm$ SEM; n=3).

EFFECTO DE LA DOPAMINA SOBRE LA SECRECION DE ACTH EN CELULAS
DISPERSAS PERFUNDIDAS DE ADENOHIPOFISIS DE PATO

Figura 41. Células dispersas de adenohipófisis de pato empaquetadas en una columna junto con Bio Gel P2 se perfundieron con el buffer de perfusión (Basal de secreción: $\square$). Se estimularon con diferentes concentraciones de dopamina (DA: $\blacksquare$) expresadas como el logaritmo de la concentración molar (log M), con una dilución 1/20 de extractos de eminencia media de pato (0,050 EMP/ml: $\diamond$) y con 0,050 EMP/ml en presencia de diferentes concentraciones de dopamina ($\blacksquare$). Los valores obtenidos para cada concentración corresponden a la cantidad total de ACTH liberada, medida por radioinmunoanálisis (RIA) (media $\pm$ SEM; n=3).

EFFECTO DE LA DOPAMINA SOBRE LA SECRECION DE α -MSH EN CELU-
LAS DISPERSAS PERFUNDIDAS DE ADENOHIPOFISIS DE PATO

Figura 42. Células dispersas de adenohipófisis de pato empaquetadas en una columna junto con Bio Gel P2 se perfundieron con el buffer de perfusión (Basal de secreción: $\square$). Se estimularon con diferentes concentraciones de dopamina (DA: $\blacksquare$) expresadas como el logaritmo de la concentración molar (log M); con una dilución 1/20 de extractos de eminencia media de pato (0,050 EMP/ml: $\circ$) y con 0,050 EMP/ml en presencia de diferentes concentraciones de dopamina ($\bullet$). Los valores obtenidos para cada concentración corresponden a la cantidad total de α -MSH liberada medida por radioinmunoanálisis (RIA) (media $\pm$ SEM; n=3).

CAPACIDAD LIBERADORA DE ACTH DE: EMP Y VARIAS
AMINAS BIOGENAS

Figura 43. Capacidad secretagoga máxima ($V_{m\acute{a}x}$) expresada como ng totales de ACTH liberados por células adenohipofisarias de pato en respuesta a un extracto de eminencia media de pato (0,2 EMP/ml), noradrenalina (NA), adrenalina (A) fenilefrina (Phe), isoproterenol (IP), dopamina (DA), y serotonina (5-HT), C: basal de secreción de ACTH expresado en ng totales de ACTH liberados. Los valores de ACTH medidos para cada uno de los estímulos se obtuvieron por radioinmunoanálisis (RIA) (media $\pm$ SEM; n=3).

CAPACIDAD LIBERADORA DE α -MSH DE: EMP Y
VARIAS BIOGENAS

Figura 44. Capacidad secretagoga máxima ($V_{m\acute{a}x}$) expresada como ng totales de α -MSH liberados por células adenohipofisarias de pato en respuesta a un extracto de eminencia media de pato (0,200 EMP/ml), noradrenalina (NA), adrenalina (A), fenilefrina (Phe), isoproterenol (IP), dopamina (DA) y serotonina (5-HT); C: basal de secreción de α -MSH expresado en ng totales de α -MSH liberados. Los valores de α -MSH medidos para cada uno de los estímulos se obtuvieron por radioinmunoanálisis (RIA) (media $\pm$ SEM; n=3).

TABLA N° 10

EFFECTO DE LA INYECCION INTRAPERITONEAL DE HALOPERIDOL Y ERGO-
CRIPTINA SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE α -MSH

Condición Experimental	Número de patos	α -MSH (ng/ml)
Ninguna	7	0,126 $\pm$ 0,004
Solvente (a)	5	0,119 $\pm$ 0,008
Haloperidol (a)	8	0,129 $\pm$ 0,003
Ergocriptina (a)	8	0,068* $\pm$ 0,007

El valor señalado con el asterisco es el único significativo cuando se lo compara con los restantes. El resto de los valores no mostraron diferencias significativas entre ellos. (* $P < 0,001$)

(a) El sangado se llevó a cabo 30 minutos luego de la inyección.

CAPITULO VI

Efectos de trasplantes de Adenohipófisis de pato en la cámara anterior del ojo de patos receptores sobre la secreción de ACTH y α -MSH.

1.- Inmunohistoquímica de ACTH y α -MSH en cortes de Adenohipófisis de pato: normotrópicas y transplantadas.

Por técnicas inmunohistoquímicas se demostró que tanto en la hipófisis de los animales control como en la hipófisis in situ de los animales transplantados, las células que dan inmunoreacción positiva para ACTH y para α -MSH son células redondas u ovals localizadas en la zona rostroventral del lóbulo cefálico de la Pars Distalis.

La intensidad de la reacción de coloración varía de célula a célula. Algunas células tienen un citoplasma muy reactivo mientras que otras tienen una reacción muy débil. Entre estos límites se puede observar intensidades intermedias. Esta técnica nos permitió demostrar que tanto ACTH como α -MSH coexisten en el citoplasma del mismo tipo celular de la Pars Distalis (56). Cuando se realizó la técnica de inmunohistoquímica en cortes de Pars Distalis transplantadas en la cámara anterior del ojo, se observó que las células daban una reacción de coloración positiva para ACTH, mientras que para α -MSH daban una reacción de coloración negativa (Figuras N^o 45a y b).

2.- Dosaje de ACTH y α -MSH en extractos de mitad rostral y mitad caudal de Adenohipófisis, y en extractos de trasplantes de Adenohipófisis de Pato:

En la Tabla N^o 11 observamos las concentraciones de ACTH (expresadas en ng/mg de proteínas) en homogenados de trasplantes (de porción rostral de A.H.); de la mitad rostral y de la mitad caudal de hipófisis normotrópicas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por inmunohistoquímica donde se observa que las células ricas en ACTH se encuentran localizadas en la mitad rostral en mucha mayor proporción con respecto a la mitad caudal.

En la Tabla N^o 11 también se observan los niveles de α -MSH, correspondientes al trasplante, a la mitad rostral, y a la mitad caudal de

la hipófisis de los patos intactos controles.

Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por inmunohistoquímica, donde se observa que las células que contienen α -MSH se localizan en la zona rostro ventral del lóbulo cefálico de la adenohipófisis, mientras que en el transplante no se detectan células que den inmunoreacción positiva para α -MSH.

En el caso de los patos transplantados, los niveles de ACTH y de α -MSH por mg de proteínas en homogenatos tanto de la mitad rostral como de la mitad caudal de la adenohipófisis normotrópica no difieren significativamente de los niveles hallados en la mitad rostral y en la mitad caudal de los patos intactos controles. Si bien los transplantes contenían menos ACTH y α -MSH por mg de proteínas que las correspondientes porciones rostrales obtenidas de adenohipófisis normotrópicas, la relación ACTH/ α -MSH se hizo mayor en el caso de los transplantes.

3.- Niveles plasmáticos de ACTH y α -MSH en patos controles intactos y patos transplantados:

En la Tabla N° 12, observamos los niveles plasmáticos de ACTH y de α -MSH de patos control, comparados con los niveles plasmáticos de ACTH y α -MSH de los patos transplantados. No se observan diferencias significativas entre los animales controles y los animales transplantados, en lo que respecta a los niveles plasmáticos de ninguna de las dos hormonas antes mencionadas.

4.- Incubados estáticos de pedazos de mitad rostral de Adenohipófisis de pato y de Transplantes. Efecto secretagogo sobre α -MSH.

En la Tabla N° 13 observamos la respuesta de incubados de pedazos de mitad rostral de adenohipófisis de pato y de transplantes frente a un estímulo conteniendo una dilución de un extracto de eminencia media de pato (1/5: 0,020 EMP/ml) o vehículo solamente. Se observa que durante la primera hora de incubación la cantidad de α -MSH secretada (ng/mg de proteínas) fue mayor que en los medios de incubado de pedazos de adenohipófisis normotrópicas controles que en los medios de incubado de

los trasplantes no estimulados. Durante la segunda hora de incubación observamos que los niveles de α -MSH en ng/mg de proteínas secretadas por los trasplantes y por los pedazos de Adenohipófisis normotrópicas en presencia de medio de incubado sólo, no difieren significativamente de los valores detectados durante la primera hora de incubación.

Cuando incubamos los pedazos de Adenohipófisis normotrópicas y los trasplantes en presencia de medio de incubado que contenía 0,200 EMP/ml, en ambos casos se observa un aumento significativo con respecto a los basales de secreción, sin embargo los niveles de α -MSH en ng/mg de proteínas liberados por los trasplantes son significativamente mayores ($p < 0,05$) que aquellos detectados en los incubados de pedazos de Adenohipófisis normotrópicas estimuladas con la misma dilución de EMP.

5.- Discusión.

Debido a que en las aves α -MSH es producida en las células corticomelanotropas de la pars distalis, la regulación de su secreción (y la de las demás hormonas adenohipofisarias) por parte del hipotálamo debe realizarse por vía sanguínea a través de los vasos porta debido a que la adenohipófisis carece de inervación (93). Los trasplantes de Pars Intermedia en lugares distantes del Hipotálamo, constituyeron la aproximación clásica utilizada por muchos autores para demostrar la inhibición hipotalámica sobre la secreción de MSH en diversos órdenes de animales (399). En el presente capítulo, se describen los experimentos donde utilizamos una condición experimental similar: trasplantes de porción rostral de adenohipófisis de pato en la cámara anterior del ojo de otro pato receptor, para intentar dilucidar la influencia hipotalámica sobre el control de secreción de MSH y ACTH en las aves.

Previamente habíamos demostrado por técnicas inmunohistoquímicas la existencia de células en la adenohipófisis del pato que contenían en su citoplasma ACTH y α -MSH. Estas células se localizan en mucho mayor proporción en la zona rostro ventral del lóbulo cefálico de la Pars Distalis (56). Estos resultados se corroboraron bioquímicamente por métodos de radioinmunoensayo previamente adecuados al material de pato (1). Como puede observarse en la Tabla N^o 11, los niveles de ACTH y α -MSH ex-

presados en ng/mg de proteínas son mucho mayores en la mitad rostral que en la mitad caudal. No obstante no se observan diferencias significativas entre los contenidos relativos de ambas hormonas (la relación ACTH/ α -MSH en ng/mg de proteína permanece constante). Para el trasplante dicha relación es significativamente mayor (ver Tabla N^o 11). Esta diferencia podría sugerir un control diferencial en la producción y en consecuencia en la secreción de ACTH y α -MSH en el trasplante con respecto a la hipófisis in situ. También debemos destacar que la concentración de ambas hormonas en el trasplante disminuye significativamente respecto a la concentración de dichas hormonas en la mitad rostral de la hipófisis normotrófica.

Estos resultados fueron corroborados en parte por inmunohistoquímica ya que en el trasplante la inmunoreacción de coloración dio positiva para ACTH pero negativa para α -MSH. La reacción negativa para α -MSH podría deberse a la menor cantidad de α -MSH contenida en los trasplantes que lo sitúan por debajo del límite de detección del método de inmunohistoquímica. Estos resultados podrían ser un indicio de la naturaleza estimulatoria del control ejercido por el hipotálamo sobre la secreción de ACTH y α -MSH de la hipófisis del pato, ya que en situaciones crónicas de desconexión del eje hipotalámico-hipofisario, una disminución en el contenido hormonal puede interpretarse como una disminución de la estimulación tónica sobre el tejido. Si comparamos la disminución relativa de la concentración de ACTH y de α -MSH en el trasplante respecto a la mitad rostral de la adenohipófisis in situ, observamos que la relación de ACTH disminuyó menos, proporcionalmente (alrededor del 83%) que la concentración de α -MSH (alrededor del 95%). Esto podría sugerir que la desconexión hipotalámica, aparte de provocar una disminución en la producción de hormonas (ya que no se debería a una mayor liberación dado que los niveles plasmáticos permanecen inalterados), alteraría también selectivamente la etapa de conversión de ACTH a α -MSH.

Si comparamos los niveles plasmáticos de ACTH y α -MSH expresados en ng/ml de plasma de los patos control con los niveles de estas hormonas de los patos transplantados, vemos que no hay diferencias significativas. Estos resultados "in vivo" están de acuerdo con los anteriores re-

sultados obtenidos "in-vitro" (Capítulo IV), donde demostramos que el control de secreción de ACTH y α -MSH en las células corticomelanotropas del pato es de tipo estimulatorio mediado por factores peptídicos hipotalámicos como CRF, AVT y MT, y catecolaminas. Si por el contrario el control hubiera sido de tipo inhibitorio como en el caso de Prolactina o α -MSH en la rata (228, 229, 235, 248) los niveles plasmáticos de estas hormonas en los patos transplantados deberían estar significativamente aumentados respecto de los niveles en los patos control.

Cuando medimos la cantidad de MSH liberada a los medios de incubado, referida a mg de proteínas, los transplantes liberaron menos cantidad de esta hormona que los pedazos de mitades rostrales de adenohipófisis de pato normotrópicas. Este resultado sugiere que una inhibición hipotalámica sobre las células corticomelanotropas es negligible o nula en esta ave, ya que los transplantes al haber estado desconectados crónicamente de una supuesta inhibición hipotalámica deberían haber mostrado basales más elevados que los incubados de adenohipófisis normotrópicas. Paradójicamente cuando se incubaron transplantes y pedazos rostrales de adenohipófisis de pato en presencia de extractos de eminencia media, éstos indujeron una mayor respuesta en lo que a la secreción de α -MSH se refiere en los transplantes, que en las hipófisis normotrópicas. Presumiblemente esta respuesta se deba al desarrollo de una hipersensibilidad en los transplantes, para un posible factor de liberador de MSH (MRF) contenido en los extractos hipotalámicos. Estos resultados se encuentran sustentados por los resultados "in-vitro" presentados en el Capítulo IV donde utilizando la columna de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato demostramos que diversos péptidos neurohipofisarios tanto de mamíferos como de aves y el CRF provocaba un aumento en la secreción de ACTH y α -MSH por parte de las células corticomelanotropas en el pato.

Como es bien sabido, Prolactina y MSH comparten varias propiedades en lo que se refiere a su respuesta común frente a diferentes sustancias reguladoras. En los mamíferos, el hipotálamo ejerce un control de secreción eminentemente inhibitorio sobre ambas hormonas (228). Por o-

tro lado, en las aves, la secreción de Prolactina ~~e~~stá controlada estimulatoriamente por el hipotálamo, esto ha sido bien documentado por Nicoll y col., 1970 (400) y por Hall y Chadwich, 1983 (401). Si comparamos nuestras observaciones con la de estos autores, podemos concluir que en las aves, ambas hormonas están bajo el mismo tipo de control: estimulatorio, mediado por factores de naturaleza hipotalámica.

Tabla 11

CONTENIDO DE ACTH Y α -MSH (ng/mg DE PROTEINAS) EN
MITAD ROSTRAL Y CAUDAL DE HIPOFISIS DE PATOS
INTACTOS NORMOTROPICOS Y DE TRASPLANTES

	MITAD ROSTRAL (n = 6)	MITAD CAUDAL (n = 6)	TRASPLANTES*
α -MSH	250,95 $\pm$ 497	9,09 $\pm$ 0,21	14,88 $\pm$ 0,36
ACTH	3053,13 $\pm$ 84,33	104,35 $\pm$ 2,78	529,77 $\pm$ 9,98
ACTH/ α -MSH	12,16	11,47	35,60

* Los trasplantes estaban constituidos por tejido rostral.

Dos secciones histológicas del mismo trasplante

a) Inmunohistoquímica para ACTH

b) Inmunohistoquímica para α -MSH

Figura N°45: Notar la ausencia de inmunoreacción de coloración positiva para α -MSH. Las flechas señalan células teñidas positivamente para ACTH. M: macrófagos con actividad peroxidasa. Método PAP x 120.

Tabla 12

EFFECTOS DE TRASPLANTES DE ADENOHIPOFISIS SOBRE LOS
NIVELES PLASMATICOS DE ACTH Y α -MSH

CONDICION EXPERIMENTAL	CONTROLES INTACTOS	TRASPLANTES
Número de patos	7	11
ACTH (ng/ml)	$0,462 \pm 0,012^a$	$0,486 \pm 0,030^b$
α -MSH (ng/ml)	$0,126 \pm 0,004^c$	$0,123 \pm 0,003^d$

Los valores de ACTH y α -MSH no mostraron diferencias signi-
ficativas entre ellos: a vs b y c vs d

Tabla 13

CANTIDAD DE α -MSH EN ng/mg DE PROTEINA LIBERADA A LOS MEDIOS DE INCUBADOS POR PEDAZOS DE ADENOHIPOFISIS NORMOTROPICAS, O POR TRASPLANTES EN PRESENCIA O NO DE EXTRACTOS DE EMP. LOS VALORES SE EXPRESAN COMO LA MEDIA $\pm$ SEM

NUMERO DE INCUBACIONES	MATERIAL	1ª HORA	2ª HORA	
		SIN EMP	SIN EMP	CON EMP
6	Trasplantes	1,09 $\pm$ 0,06 ^a	1,17 $\pm$ 0,04 ^b	
8	Adenohipófisis Normotrópicas	3,90 $\pm$ 0,20 ^c	3,52 $\pm$ 0,16 ^d	
5	Trasplantes	1,19 $\pm$ 0,04 ^e		13,55 $\pm$ 0,45 ^f
6	Adenohipófisis Normotrópicas	4,12 $\pm$ 0,30 ^g		6,08 $\pm$ 0,37 ^h

Los mismos tejidos fueron utilizados en cada serie de incubaciones horizontales; a vs b y c vs d no presentan diferencias significativas; e vs f, g vs h, e vs g y f vs h son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

CAPITULO VII

Neurosecreción en el pato y su relación con el control de la liberación de ACTH y α -MSH.

En el presente capítulo describiremos y discutiremos los resultados acerca de la neurosecreción en aves y su correlato con hallazgos bioquímicos de péptidos posiblemente involucrados en dicho proceso, en lo referente al control de secreción de ACTH y α -MSH. Adoptaremos la convención de Scharrer B. y Scharrer, E., 1954, (97); E. Scharrer, 1959 (402) y Ortman, 1960 (403), ya que no incluimos aquí resultados sobre acetilcolina, noradrenalina, adrenalina o 5-hidroxitriptamina, mientras que incluimos resultados sobre arginina vasotocina (AVT) y el factor liberador de corticotrofina 41 aminoácidos (CRF). Para identificar la presencia de neurosecreción en las diferentes estructuras constituyentes del sistema hipotálamo-hipofisario en el pato, recurrimos tanto a técnicas histológicas como bioquímicas. Dentro de las primeras utilizamos las técnicas de Aldehído Fucsina que nos permite localizar en forma inespecífica al menos ciertas regiones donde existe material neurosecretorio ya que el colorante utilizado en la misma tiene afinidad por los puentes disulfuro, abundantes en algunas sustancias constituyentes del material neurosecretorio. También utilizamos una técnica específica para demostrar la presencia de CRF: Técnica Inmunohistoquímica. Los métodos bioquímicos empleados para demostrar péptidos involucrados en el proceso de neurosecreción fueron un sistema de Radioinmunoanálisis (RIA) específico para CRF de mamífero, previamente adaptado y validado para material de pato, y un sistema específico de RIA para AVT. También incluimos un estudio histológico de la región hipotálamo-hipofisaria en el pato utilizando la técnica de coloración tricrónica de Mallory, con el objeto de ubicarnos en las diferentes estructuras que forman parte de este sistema en las aves.

1.- Corte sagital de la región hipotálamo-hipofisaria en el pato: Técnica de coloración tricrómica de Mallory.

En la Figura N° 46, observamos un corte sagital de la región hipotálamo hipofisaria del pato. En él podemos distinguir sus partes cons-

tituyentes: en primer lugar mencionaremos a la neurohipófisis ubicada en la parte superior del mismo, en conexión con el sistema nervioso central (SNC); en segundo lugar, en la parte inferior, observamos la adenohipófisis. La neurohipófisis se tiñe, mediante el uso de esta técnica, de un color rosa pálido. En la región inferior izquierda, observamos el tercer ventrículo (zona sin teñir); y la zona infundibular, que aparece a manera de franja angosta bordeando el piso del tercer ventrículo. Podemos observar, que este tejido poco celular se continua hacia arriba con el tejido nervioso hipotalámico. En la zona inferior de la neurohipófisis y también a su alrededor, se observa una delgada zona coloreada de azul intenso que corresponde al tejido conectivo. Por debajo de la neurohipófisis y separada de ella por tejido conectivo, observamos la adenohipófisis (A.H.). Mediante el uso de esta técnica aparece teñida de un color rojo ladrillo, debido a la coloración que toma el citoplasma de algunas células endocrinas y a eritrocitos contenidos en los vasos de la glándula.

En la región superior de la A.H., observamos una región que se tiñe de color azul, que como dijimos anteriormente corresponde a un tabique de tejido conectivo. Este tejido se introduce difusamente en la glándula, en forma trabecular. En esta zona, podemos observar pequeñas luces que corresponden a los capilares que forman parte del sistema portahipofisario. En el ángulo inferior izquierdo de este corte se aprecia un elemento vascular, se trata de la arteria carótida interna. Tal como se dijo anteriormente no existe pars intermedia en la hipófisis de pato.

En la Figura N^o 47, se observa el mismo corte que en la Figura ^a 46 pero a mayor aumento. Al igual que en la Figura N^o 46, distinguimos claramente la parte nerviosa y glandular de la hipófisis; la zona superior rosa claro y la zona inferior rosa-ladrillo intenso respectivamente. De la neurohipófisis, se aprecia el infundíbulo y la región de la pars nervosa. De la adenohipófisis, observamos la zona superior de la pars distalis. A continuación describiremos con más detalle, las estructuras mencionadas anteriormente.

Neurohipófisis: Rodeando al tercer ventrículo en su borde inferior se observa el infundíbulo de aspecto fibrilar. El tejido nervioso se tiñe escasamente. En el borde inferior del mismo, en la zona que contacta con los elementos conectivos que recubren al tejido nervioso, se observa una delgada franja que se tiñe de un color rojizo más intenso. Esta región corresponde a la zona externa de la eminencia media donde terminan las fibras neurosecretorias que contactan con los capilares del plexo primario del sistema porta hipotálamo-hipofisario.

A la izquierda de la fotografía y separada de la adenohipófisis y del infundíbulo por elementos conectivos, se observa la pars nerviosa, coloreada de un color rojo oscuro, que representa al conjunto de elementos nerviosos, que contienen el material neurosecretorio de la misma. Esta está surcada por espacios vacíos y láminas de color azul que representan elementos conectivos donde transcurren los vasos que irrigan la glándula.

Adenohipófisis: Debajo del septo de tejido conectivo teñido de azul observamos el parénquima de la adenohipófisis que presenta una tinción heterogénea en la que predomina el color rojo intenso, que se manifiesta en particular en la región inferior izquierda y derecha de la fotografía. Estos elementos corresponden a células basófilas cuyos citoplasmas se tiñen intensamente. También corresponden a eritrocitos contenidos en los sinusoides que irrigan la glándula, que conforman el plexo secundario del sistema porta hipotálamo-hipofisario. Algunos de estos elementos se encuentran contenidos en el tejido conectivo perteneciente al estroma de la glándula que le dan un aspecto reticulado de color azul

2.- Demostración de material Neurosecretorio en cortes sagitales de hipotálamo en el pato.

a.) Técnica Aldehído - Fucsina (A.F.)

En la figura N° 48a observamos un corte sagital de la eminencia media (EM) de pato (Barcino chico: *Annas Flavirostris*), coloreada mediante la técnica Aldehído-Fucsina. Esta técnica se utiliza para demostrar la presencia de neurosecreción ya que la misma se tiñe de color púrpura.

Observamos que la zona externa de la eminencia media denominada "Zona en empalizada" aparece más intensamente teñida que el resto, ya que es allí donde hay mayor concentración de neurosecreción. Mediante esta técnica, logramos visualizar la existencia de numerosos y pequeños acúmulos granulares localizados, muchos de ellos, alrededor de los capilares del sistema porta, en la zona externa de la eminencia media (E.M.).

b.) Técnica Inmunohistoquímica para CRF

En la Figura N° 48b observamos un corte sagital de la eminencia media de pato, coloreado mediante la técnica inmunohistoquímica de la peroxidasa antiperoxidasa, específica para CRF. La zona central de la eminencia media al igual que la porción de adenohipófisis, dan inmunoreacción de coloración negativa para CRF. Hacia la zona externa de la EM la inmunoreacción de coloración da positiva para CRF observándose un color marrón debido a que es allí, donde hay una mayor concentración del mismo. Desde el punto de vista histológico observamos pequeños y numerosos cuerpos redondeados que constituyen los terminales axónicos de las neuronas neurosecretorias (o acúmulos de varios de ellos), coloreados intensamente de marrón, que se concentran hacia la zona externa de la E.M. y rodeando las luces vasculares de los capilares del sistema porta - hipofisario.

También hemos detectado, mediante la técnica Inmunohistoquímica de la peroxidasa antiperoxidasa específica para AVT, una inmunoreacción de coloración positiva en la zona externa de la EM (resultados no mostrados).

3.- Investigación del contenido de AVT y CRF en: Eminencia Media (EM), Neurohipófisis (NHP); Adenohipófisis (AHP) y corteza cerebral del pato (CCP).

a.) Radioinmunoanálisis (RIA) de Arginina-vasotocina (AVT)

La Figura N° 49 muestra una curva standard para arginina-vasotocina (AVT) sintética utilizando el anticuerpo: Ac.AVP_g. También observamos las reacciones cruzadas del sistema de radioinmunoanálisis empleado, con mesotocina (MT) la hormona ocitócica típica de las aves, y con arginina-

vasoprecina (AVP) y oxitocina (OT) las hormonas antidiurética y ocitócica respectivamente típicas de los mamíferos. Como puede observarse, este anticuerpo cruza 100% con AVP, mientras la reacción cruzada con MT y OT es de menos de 0,01%. por lo tanto podemos afirmar que tanto en las determinaciones bioquímicas como en las técnicas de inmunohistoquímica evidenciamos solamente AVT, dado que la reacción cruzada del anticuerpo AVP_G con MT es despreciable. En la Figura N° 50 observamos una curva standard para AVT sintética, utilizando el anticuerpo AVP_G, y varias curvas de desplazamiento utilizando diferentes diluciones de: extractos de eminencia media de pato (EMP), extractos de neurohipófisis de pato (NHP), extractos de corteza cerebral de pato (CCP) y extractos de adenohipófisis de pato (AHP) como puede observarse en la Figura N° 50, todos los extractos ensayados dieron curvas de desplazamiento que diluían en forma paralela a la curva standard. La concentración de AVT medida por radioinmunoanálisis (RIA) en eminencia media de pato fue: $180,9 \text{ ng} \pm 4,44$ por E.M. (aproximadamente 4,52 ng por mg de peso húmedo); en corteza cerebral de pato: $0,73 \pm 0,06$ ng por CCP (aproximadamente 0,018 ng por mg de peso húmedo); en adenohipófisis de pato: $20,0 \text{ ng} \pm 0,91$ por AHP (aproximadamente 1,44 ng por mg de peso húmedo); y en neurohipófisis de pato: $3,78 \mu\text{g} \pm 0,10$ por NHP. (Ver Tabla N° 14).

Estos resultados se obtuvieron en una serie de determinaciones utilizando 6 extractos ácidos de cada uno de los tejidos antes mencionados, obtenidos de patos salvajes (Barcino chico: *Annas Flavirostris*) en época invernal. La cantidad de AVT dosada en las fracciones eluidas de la columna de células dispersas de adenohipófisis de pato, empaquetadas junto con Bio Gel P2, y sometidas a perfusión continua, luego de haber lavado el sistema durante 1-2 horas, con el buffer de perfusión, fue de $0,008 \text{ ng/ml} \pm 0,001$. Esta cantidad es negligible si la comparamos con las mínimas cantidades de AVT necesarias para lograr un efecto estimulador sobre la secreción de ACTH y α -MSH en este sistema (ver capítulo III).

b.) Radioinmunoanálisis (RIA) de Factor liberador de corticotrofina CRF.

La Figura N° 51 muestra una curva standard para el factor liberador de corticotrofina sintético de 41 aminoácidos secuencia ovina (oCRF) utilizando como antisuero el Ac. CRF₃; y una curva de desplazamiento utilizando diferentes diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP). El paralelismo entre las transformaciones lineales de ambas curvas (no mostrado) fue muy significativo (90% de paralelismo, $P < 0,005$). También se observa la reacción cruzada del sistema de radioinmunoanálisis empleado con: CRF sintético 41 aminoácidos, secuencia de rata (rCRF). Observamos que la reacción cruzada de ambos péptidos es del 100%. Resultados igualmente buenos en cuanto a la reacción cruzada con las diluciones de los extractos de eminencia media de pato, se obtuvieron con el otro anticuerpo empleado: Ac ED, en lo que respecta a la reacción cruzada del mismo, con rCRF, esta es similar a la obtenida con el anticuerpo CRF₃ (resultados no mostrados). La concentración de CRF medida por radioinmunoanálisis en eminencia media de pato (EMP) fue $28,97 \text{ ng} \pm 0,6$ por EMP, y en neurohipófisis de pato (NHP): $5,1 \text{ ng} \pm 0,3$ por NHP.

Estos resultados se obtuvieron en una serie de determinaciones utilizando 6 extractos ácidos de cada uno de los tejidos antes mencionados, de patos salvajes (Barciní chico: Annas Flavistrostris) en época invernal. Tanto en corteza cerebral, como en adenohipófisis de pato, no fue posible detectar CRF con el método de RIA utilizado para su dosaje (Ver Tabla N° 14).

4.- Discusión.

El sistema hipotalámico-neurosecretorio en las aves está formado por:

1. Los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular, entre otros, que contienen los cuerpos neuronales de las neuronas neurosecretorias;
- 2.- los tractos neurosecretorios, tracto supraóptico-hipofisario y el tracto paraventrículo-hipofisario;
- 3.- los tractos ricos en neurosecreción que terminan en la eminencia media; y
- 4.- el lóbulo nervioso, de la hipófisis (neurohipófisis, proceso infundibular, o lóbulo posterior).

Aunque los estudios histológicos de la neurosecreción en las aves son escasos, se ha podido observar: (1) posee una baja afinidad por los colorantes ácidos que la diferencia del resto de los vertebrados hasta a-

hora estudiados y (2) posee una afinidad mucho mayor por la coloración aldehído-fucsina (AF) (98). Ello motivó que seleccionáramos la técnica A.F. para determinar la presencia de neurosecreción en el sistema hipotálamo-hipofisario en el pato. Como observamos en las Figuras N^o 48a y b, existen numerosos terminales axónicos de fibras nerviosas, que en lugar de dirigirse hacia la neurohipófisis, lo hacen hacia la sección basal del infundíbulo: la eminencia media (E.M.). En la zona externa de la eminencia media se produce la primera capilarización del sistema porta hipofisario (Figuras N^o 47, 48a y b). Estos capilares son drenados por los vasos porta largos, que a su vez originan una segunda capilarización en la pars distalis de la adenohipófisis. En comparación con otros grupos de vertebrados, la E.M. de las aves se caracteriza por poseer grandes cantidades de material neurosecretorio que se colorea con aldehído-fucsina. Hemos observado que en el pato, al igual que en otras aves (98) el material neurosecretorio que posee afinidad por la coloración aldehído fucsina, aparece en íntimo contacto con los capilares del sistema porta de manera similar al material neurosecretorio en la neurohipófisis.

Si bien mediante la técnica A.F. no podemos caracterizar el material neurosecretorio, sí lo podemos hacer utilizando técnicas inmunohistoquímicas específicas. En la Figura N^o 48b mediante el empleo de esta técnica pudimos determinar que al menos parte de la neurosecreción presente en la zona de la eminencia media detectada mediante la técnica A.F. (Figura N^o 48a); corresponde al factor liberador de corticotrofina (CRF). Otros autores también han detectado mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas la presencia de CRF en los terminales nerviosos de la eminencia media de la codorniz japonesa (391) y del pollo (392) utilizando un anticuerpo específico anti oCRF.

Estos resultados fueron corroborados mediante el uso de sistemas de radioinmunoanálisis de mamíferos específicos para arginina-vasotocina (AVT) y para el factor liberador de corticotrofina (CRF), adaptados y validados para material de pato. Mediante el uso de esta técnica pudimos demostrar la presencia de AVT y CRF en extractos de eminencia media (EMP) y de lóbulo posterior de neurohipófisis de pato. Tanto los extrac

tos de EMP como los de lóbulo posterior de pato desplazaron tanto al oCRF como a la AVT iodinadas de manera indistinguible de los péptidos sintéticos AVT y oCRF utilizados como standard.

De los trabajos realizados por Benoît y Assenmacher en 1951, 1953 (99, 100) se desprenden las bases anatómicas e histológicas del control neurohumoral de la adenohipófisis aviar. Numerosos estudios (101, 102) sobre las posibles conecciones vasculares y nerviosas demostraron que la conección neurovascular entre el tracto supraóptica hipofisario y el tracto tubero-hipofisario con la circulación portal de la hipófisis constituye el nexo funcional más importante entre el hipotálamo y la denohipófisis de las aves. Si bien el conocimiento acerca del sistema hipotalámico-neurosecretorio en aves, es fragmentario, tiene características semejantes a las encontradas en otros grupos de vertebrados estudiados. Las funciones más importantes reconocidas hasta el presente son: 1. Regulación de la actividad de la adenohipófisis: en ella están involucradas las fibras neurosecretorias antes mencionadas y probablemente otros componentes de la eminencia media; factores hipotalámicos liberadores o inhibidores de la liberación de las correspondientes hormonas adenohipofisarias que son transportadas hacia la adenohipófisis via el sistema porta hipofisario y, 2. Las funciones del lóbulo posterior entre las cuales las funciones de osmoregulación y antidiurética han sido las más estudiadas. De los mecanismos de regulación de la adenohipófisis aviar, los más estudiados han sido los que regulan las funciones gonadotropas. Si bien hay numerosos estudios in vivo e "in-vitro" que intentaron dilucidar los mecanismos de regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en aves (59, 60, 78, 404) no había aún evidencias concluyentes acerca de cuales eran los factores hipotalámicos involucrados en los mismos. Nuestros resultados "in-vitro" (ver capítulo III) utilizando células dispersas de adenohipófisis de pato empaquetadas en una columna junto con Bio Gel P2, perfundidas continuamente y estimuladas con péptidos neurohipofisario de aves: AVT y MT y de mamíferos: AVP y OT, como así también con oCRF y los resultados inmunohistoquímicos y bioquímicos mostrados en el presente capítulo sugieren: 1.-

la presencia de un péptido CRF-simil en la EM de pato que podría estar involucrado en los mecanismos que regulan la liberación de ACTH y α -MSH en el pato. Si bien las potencias secretagogas en el pato se invierten con respecto a lo encontrado en la rata, como ya se discutió anteriormente estas diferencias podrían explicarse en parte sobre la base de posibles diferencias a nivel del sitio activo, las que harían que el oCRF probado tuviera menos afinidad por los receptores específicos a nivel de las células corticomelanotropas del pato, y por ende menor actividad biológica que el péptido análogo típico de esta ave. Por otro lado si tenemos en cuenta las cantidades relativas de AVT y CRF encontradas en extractos de EMP y comparamos la potencia secretagoga de dichos extractos con la potencia secretagoga de los péptidos sintéticos vemos que la contribución de AVT a la potencia secretagoga de dichos extractos es de alrededor del 60% lo que nos indicaría que en el pato, los péptidos neurohipofisarios (AVT en particular) jugarían un rol más importante en su actividad secretagoga de ACTH y α -MSH que aquel que tendrían en el control de la secreción de ACTH en la rata. De los resultados aquí discutidos concluimos que, en el pato la regulación de la secreción de ACTH y α -MSH estaría determinada por un sistema de multicomponentes entre los que mencionaremos AVT, MT, y un péptido CRF-simil; asimismo teniendo en cuenta los resultados "in-vitro" presentados en el capítulo V, también debemos incluir a las catecolaminas A y NA.

Curvas de desplazamiento de péptidos neurohipofisarios con el sistema de RIA para AVT.

Figura N° 49:Curvas de desplazamiento obtenidas para el standard de AVT, AVP, MT y OT utilizando como cazador radioactivo ^{125}I -AVT. La unión a la hormona iodinada se expresa como el porcentaje de B/B_0 (% B/B_0), donde B_0 es la máxima unión a la hormona iodinada en ausencia del standard y B representa el porcentaje de hormona iodinada unida en presencia de standard. (media $\pm$ SEM; n=3).

Figura 46. Corte sagital de la región hipotálamo-hipofisaria del pato. Técnica de Mallory. X 63.

EM = eminencia media; AH = adenohipófisis; PN = Pars nervosa; III V = tercer ventrículo; C = arteria carótida.

Figura 47. Corte sagital de la eminencia media del pato.
Técnica de Mallory. X 160.

EM = eminencia media; AH = adenohipófisis; PN = pars
nervosa; IIIV = tercer ventrículo.

Figura 48a. Corte sagital de la eminencia media del pato. Técnica aldehído fucsina (AF) para demostrar neurosecreción. X 160.

EM = eminencia media; AH = adenohipófisis.

Figura 48b. Corte sagital de la eminencia media del pato coloreada mediante el método peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) para demostrar CRF. Aceptor de oxígeno: diaminobencidina. X 160.

EM = eminencia media; AH = adenohipófisis.

Curvas de desplazamiento obtenidas para el standard de AVT, EMP, CCP, NHP y AHP.

Figura N° 50: Curvas de desplazamiento obtenidas para el standard de AVT, extractos de eminencia media de pato (EMP), de corteza cerebral de pato (CCP), de neurohipófisis de pato (NHP), y de adenohipófisis de pato (AHP). La unión a la hormona iodinada se expresa como el porcentaje de B/B_0 ($%B/B_0$), donde B_0 es la máxima unión a la hormona iodinada en ausencia de standard o de extractos tisulares, y B representa el porcentaje de hormona iodinada unida en presencia de standard o de extractos tisulares. (media $\pm$ SEM; n=3)

Curvas de desplazamiento de corticoliberina de mamíferos y extractos de eminencia media de pato con el sistema de RIA para CRF utilizado.

Figura N° 51: Curvas de desplazamiento obtenidas para el standard de oCRF, rCRF y diluciones de extractos de eminencia media de pato (EMP). La unión a la hormona iodinada se expresa como el porcentaje de B/B_0 ($\%B/B_0$), donde B_0 es la máxima unión a la hormona iodinada en ausencia de standard o de EMP y B representa el porcentaje de hormona iodinada unida en presencia de standard o de EMP. (media $\pm$ SEM; n=3)

Tabla 14

CONTENIDO DE VASOTOCINA Y CRF EN EXTRACTOS DE EMINENCIA
MEDIA, LOBULO NERVIOSO, CORTEZA CEREBRAL
Y ADENOHIPOFISIS DE PATO

TEJIDO	VASOTOCINA	CRF 41 AMINO ACIDOS
Eminencia media de pato (EMP)	180,9 $\pm$ 4,4 ng/EMP	28,97 $\pm$ 0,6 ng/EMP
Neurohipófisis de pato (NHP)	3,78 $\pm$ 0,10 μ g/NHP	5,1 $\pm$ 0,3 ng/NHP
Corteza cerebral de pato (CCP)	0,73 $\pm$ 0,062 ng/CCP	No detectable
Adenohipófisis de pato (AHP)	20,0 $\pm$ 0,91 ng/AHP	No detectable

Resultados de tres determinaciones de un pool de seis EMP, seis neurohipófisis, 6 extractos de corteza cerebral y seis adenohipófisis de pato (media $\pm$ SEM).

CUARTA PARTE

CONCLUSION FINAL Y RESUMEN

CONCLUSION FINAL Y RESUMEN

Las aves constituyen la única clase entera de vertebrados cuya hipófisis carece de pars intermedia, Como quedó expresado en la parte introductoria de este trabajo, por técnicas de cromatografía y electroforesis se demostró la existencia de una de las hormonas típicas de la pars intermedia, la α -MSH, en la adenohipófisis del pato (55). Esto fue luego corroborado por técnicas inmunohistoquímicas mediante las cuales se determinó la coexistencia de ACTH y α -MSH en idénticas células adenohipofisarias a las que denominamos corticomelanotropas (CM) (56). Ellas se encuentran localizadas en la región rostral del lóbulo cefálico de la pars distalis.

De lo expresado más arriba se desprende que las células CM del pato muestran características topográficas y bioquímicas (inmunológicas) que, por un lado las harían similares a las células corticotropas de la pars distalis de los mamíferos; mientras que por otro lado, tendrían también semejanza con las células melanotropas de la pars intermedia de los mamíferos.

Como es bien sabido, las células corticotropas se hallan bajo control estimuladorio del hipotálamo (164-167); contrariamente, las melanotropas lo están principalmente bajo control inhibitorio (236,252,253, 283).

Las células CM podrían ser consideradas como un tipo celular intermedio entre las células corticotropas y las melanotropas, razón por la cual nos resultó de interés establecer si el hipotálamo las controla en forma estimulante o inhibitoria. El otro aspecto que nos pareció interesante dilucidar era si las células CM no sólo contienen, sino secretan tanto ACTH como α -MSH, o si solamente una de ellas era la hormona secretada predominantemente. En el caso de que ambas hormonas fueran secretadas, si la secreción de las mismas se hacía en forma concomitante o coordinada, o si por el contrario una y otra eran controladas de manera diferencial.

Los mecanismos involucrados en el control de secreción de ACTH y α -MSH de la hipófisis aviar han sido muy poco estudiados, excepto por al-

gunos trabajos de Stanier y Holmes, 1969 (117) que sugieren la existencia de un factor liberador de ACTH (CRF) en el hipotálamo aviar.

En los mamíferos, la identificación de sustancias liberadoras de corticotrofina ha resultado una tarea sumamente complicada en el campo de la investigación neuroendocrina. En primer lugar, esto se debió a dificultades técnicas que enmascaraban la comprensión de los mecanismos que controlaban la liberación de ACTH de la adenohipófisis como por ejemplo, la falta de sistemas de bioensayo apropiados para evaluar la actividad liberadora de corticotrofina (CRA) de los extractos hipotalámicos u otros posibles secretagogos. Dificultades similares se presentaron en las investigaciones tendientes a dilucidar los mecanismos hipotalámicos que controlaban la liberación de la hormona melanocito estimulante (MSH) de las pars intermedia de los mamíferos. En años recientes el descubrimiento de técnicas adecuadas para evaluar la actividad liberadora de corticotrofina (ACTH) y melanotrofina (MSH) en mamíferos, permitió un avance sustancial en el conocimiento de los mecanismos que controlan la secreción de esta hormona en los mamíferos. De manera, similar, el desarrollo de una técnica adecuada para valorar la actividad liberadora de ACTH y MSH en aves nos proporcionó los medios adecuados para avanzar en nuestro conocimiento acerca de los mecanismos que controlan la secreción de estas hormonas en las aves.

De los tres métodos ensayados, incubados de pedazos de glándula, incubados de células dispersas de adenohipófisis y células dispersas de adenohipófisis empaquetadas en una columna junto con Bio Gel P2 y sometidas a perfusión continua; el mejor en términos de practicidad, sensibilidad y precisión fue la columna de perfusión. El método que utiliza pedazos de glándula es relativamente insensible, posiblemente ello se deba a la dificultad de que las sustancias presentes en el medio de incubado difundan de manera rápida y homogénea hacia el interior del tejido. Por otro lado, la necrosis que pueda producirse en el tejido puede provocar resultados incorrectos. Los incubados estáticos ya sea de pedazos de glándula como de células dispersas tienen el inconveniente de que los productos metabólicos de desecho se acumulan en el medio que baña las células y esto puede afectar el normal funcionamiento de las

mismas y también inactivar los productos de secreción. Este inconveniente es subsanable mediante el empleo de la columna de perfusión, ya que el medio fresco oxigenado y las sustancias a ensayar circulan bañando las células de una manera continua, lo que permite un íntimo contacto entre la sustancia a probar y las células. Las hormonas liberadas por las células son recogidas en tubos que se congelan hasta su posterior dosaje hormonal. El dosaje hormonal se realiza en forma directa, utilizando métodos de radioinmunoanálisis de mamíferos que previamente fueron convalidados para el material de pato. Concluimos, por lo tanto, que hemos desarrollado un sistema de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato, que reúne las características de ser sensible, preciso y práctico y ello, conjuntamente con los sistemas de radioinmunoanálisis de ACTH y α -MSH adecuados para el material de pato, constituye una herramienta adecuada para el estudio del control de secreción de ACTH y α -MSH de la hipófisis de esta ave.

Como dijimos anteriormente, en las aves, aunque el eje hipotálamo-hipofiso- adrenal ha sido objeto de numerosos estudios (59, 60, 78, 404) la naturaleza del control hipotalámico sobre la secreción de ACTH y α -MSH, ha sido muy poco estudiado. Había reportes previos que indicaban los efectos estimulatorios de extractos hipotalámicos sobre la liberación de ACTH en pollos y posiblemente involucrando péptidos neurohipofisarios (117; 118). Por lo tanto, decidimos aplicar el sistema de células dispersas perfundidas para estudiar la actividad corticoliberina y melanoliberina de varios péptidos neurohipofisarios de mamíferos: AVP y OT y de aves, AVT y MT y del factor liberador de corticotrofina sintético de 41 amino ácidos secuencia ovina que fue comparada con extractos de eminencia media de pato (EMP) como un primer paso para intentar dilucidar la naturaleza de los mecanismos que controlan la actividad de las células corticomelanotropas del pato. Con el objeto de poder comparar las respuestas de células corticotropas de pars distalis y de células melanotropas de PI, probamos los mismos secretagogos utilizados en el pato, en la rata, utilizando un diseño experimental idéntico.

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos nos demostrar

que todos los péptidos probados se comportaron como agonistas parciales con respecto a los extractos de EMP, que resultaron ser los más potentes secretagogos de ACTH y α -MSH en el pato. Esto no es sorprendente, ya que lo mismo había sido previamente demostrado en la rata, en lo que respecta al control de secreción de las células corticotropas, por Guillies y col., 1982 (164). Lo que es distintivo en las células de AH de pato, cuando las comparamos con las células corticotropas de AH de rata, aparte del hecho de secretar α -MSH, en cantidades significativas, además de ACTH, es la actividad observada para los diferentes péptidos ensayados, cuando los comparamos con las respuestas obtenidas con los extractos de eminencia media. Mientras que en el pato el orden de actividad intrínseca era $AVT = MT \gg AVP = OT > CRF$, en la rata era $CRF \gg AVP = OT = AVT$. Estas diferencias se pueden explicar si el CRF natural del pato fuera diferente del péptido ovino y por lo tanto, este péptido fuera sólo parcialmente activo en el sistema de pato. La otra explicación posible sería que el control hipotalámico sobre la actividad "CL" y "ML" en el pato estuviera ejercido por otras sustancias no relacionadas con el CRF. Sin embargo, la información de la cual disponemos sugiere la existencia de una sustancia relacionada con CRF que estaría involucrada en los mecanismos que regulan la secreción de ACTH y α -MSH en el pato. Por técnicas inmunohistoquímicas mediante el uso de un anticuerpo específico anti CRF, se ha detectado la presencia de una sustancia CRF similar en los terminales nerviosos de la eminencia media de pollo (391), de la codorniz japonesa (392) y del pato. Por otro lado, también hemos detectado por técnicas de radioinmunoanálisis adaptadas y validadas para material de pato, la presencia de una sustancia CRF similar, en la eminencia media del pato. Una interpretación posible para todos estos datos sería que el CRF aviar estuviera antigénicamente relacionado con el CRF de mamífero, pero que tuviera diferencias estructurales a nivel del sitio biológicamente activo, que lo harían más potente a nivel de los receptores específicos de las células CM del pato. Esto explicaría además, el menor sinergismo observado entre AVT y CRF en el pato, cuando lo comparamos con el observado en la rata. La otra característica llamativa de las células CM del pato es la capacidad

que tienen de discriminar los diferentes péptidos neurohipofisarios utilizados para estimularlas, ya que responden preferentemente a los péptidos naturales de las aves AVT y MT, mientras que OT y AVP se comportan como agonistas muy débiles. En la rata, la respuesta de las células corticotropas es idéntica para los péptidos neurohipofisarios probados, ya sean de aves -AVT y MT- o de mamíferos -AVP y OT-. Por otro lado, mediante el uso de un sistema de radioinmunoanálisis de mamíferos adaptado y validado para material de pato, hemos podido detectar la presencia de AVT en eminencia media de pato. Si tenemos en cuenta las cantidades de AVT presentes en los extractos de EMP y comparamos su potencia secretagoga con cantidades equivalentes del péptido sintético, observamos que la contribución de AVT a la potencia secretagoga de los extractos de EMP es de alrededor del 60%, mientras que en la rata la capacidad de AVP relativa a la de los extractos de eminencia media de rata, ésta es sólo de un 25%. Por lo tanto, se podría especular que en las aves los péptidos neurohipofisarios podrían desempeñar un rol más importante como secretagogos de ACTH y de α -MSH, que como secretagogos de ACTH en las células corticotropas de la adenohipófisis de la rata. Por otro lado, en células dispersas perfundidas de PI de rata, AVP no produce ningún efecto sobre la secreción de ACTH y/o α -MSH. De lo hasta aquí reseñado podemos concluir que en las aves, al igual que en los mamíferos, la regulación de la secreción de ACTH y α -MSH de las células CM de adenohipófisis, consiste de un sistema multicomponente que incluye AVT, MT y una sustancia CRF-simil.

Posteriormente nos interesó probar el efecto de varias aminas biógenas en la liberación de ACTH y α -MSH por parte de las células CM de la adenohipófisis del pato, utilizando el mismo sistema in vitro de células dispersas perfundidas que fuera utilizado para estudiar el efecto de CRF y péptidos neurohipofisarios. Era nuestro interés esclarecer la posible participación de estas sustancias en el efecto ACTH- α -MSH liberador que poseen los extractos de EMP y subsecuentemente contribuir a dilucidar los mecanismos de regulación fisiológica de las células CM. Los neurotransmisores probados fueron aquellos que se sabía ejercían algún efecto regulador en la secreción de ACTH y/o α -MSH en la rata (157,

218, 284, 285). Todos los neurotransmisores se comportaron como agonistas parciales respecto a los extractos de EMP, siendo los más potentes secretagogos de ACTH y α -MSH, NA y A, ejerciendo ambas la misma potencia. Estos resultados in vitro están sustentados por los datos bioquímicos que confirman la presencia de cantidades apreciables de NA en extractos de EMP, que podrían contribuir de manera apreciable a la actividad secretagoga de ACTH y α -MSH de dichos extractos. El hallazgo de esta catecolamina concuerda con los estudios histoquímicos que demostraron fibras conteniendo NA y probablemente A en el hipotálamo de otras especies aviares (395, 396). Estas observaciones podrían contribuir a sustentar la hipótesis de que las catecolaminas tendrían un significativo rol fisiológico en el control hipotalámico de liberación de ACTH y α -MSH en las aves. Al probar los efectos de los neurofármacos fenilefrina e isoproterenol sobre la secreción de ACTH y α -MSH de células CM, éstos se comportan como secretagogos de las dos hormonas antes mencionadas, siendo la fenilefrina un agonista α -adrenérgico, mientras que el isoproterenol es un agonista β -adrenérgico. La potencia secretagoga de la fenilefrina es mayor que la potencia secretagoga del isoproterenol, lo que podría indicar que la respuesta de las células CM a las catecolaminas estaría mediada por un receptor α -adrenérgico.

Para corroborar esta hipótesis, bloqueamos los efectos de los agonistas con los correspondientes antagonistas α o β -adrenérgicos: fentolamina y propranolol respectivamente. Los resultados obtenidos mediante el uso de los mencionados antagonistas sobre la secreción hormonal inducida por la noradrenalina son consistentes con un mecanismo α -adrenérgico similar que mediaría la actividad secretagoga de las catecolaminas en las células CM del pato. Estos resultados concuerdan en parte con los obtenidos por Raymond y col. (157) en rata, la diferencia reside en que mientras que en la rata el orden de potencias es $A > NA$, en el pato ambas catecolaminas son equipotentes. Estas diferencias podrían deberse al sistema in vitro empleado, ya que mientras Raymond y col. (157) utilizaron cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata, nosotros empleamos un sistema de células dispersas perfundidas continuamente. La otra

explicación posible para justificar esta diferencia es que tal vez los receptores catecolaminérgicos de las células CM del pato respondan de forma diferente a los de la rata, característica que ha sido señalada en otros órganos en las aves (405). Asimismo, es necesario recordar que en el perro el efecto neto de la administración in vivo de agonistas α -adrenérgicos produce una inhibición en la secreción de ACTH (220). Esta aparente discrepancia puede explicarse teniendo en cuenta los efectos de los agonistas α -adrenérgicos a nivel del sistema nervioso central, donde se demostró que la NA inhibe la liberación de CRF inducida por 5-HT o acetilcolina en tejido hipotalámico in vitro.

Por otro lado, la falta de respuesta de las células CM frente a la serotonina y a la dopamina salvo a dosis muy elevadas (1 μ M) sugerirían que estas monoaminas no estarían implicadas en los mecanismos que controlan la secreción de ACTH y α -MSH por parte de estas células. Actualmente se considera que la secreción de α -MSH y de otros péptidos derivados de POMC en la pars intermedia de los mamíferos está fundamentalmente mediada inhibitoriamente por dopamina (236, 253, 284, 285). En aves no hay reportes sobre los efectos de esta monoamina en lo que respecta a la secreción de las hormonas derivadas de POMC en adenohipófisis. Actualmente es bien conocida la gran similitud existente entre los mecanismos que regulan la secreción de prolactina (Prl) y MSH en mamíferos. Por otro lado se ha demostrado que en las aves, si bien la DA no afecta los niveles basales de secreción de PrL, sí actúa inhibitoriamente cuando la secreción de PrL está estimulada por el hipotálamo (398). Nuestros resultados in vitro, en lo que a la secreción de ACTH y α -MSH respecta, nos indican que esta monoamina no ejerce ningún efecto directo a nivel de las células C del pato, aún en condiciones de estimulación con extractos de EMP. Sin embargo, la significativa disminución de los niveles plasmáticos de α -MSH por debajo de los niveles normales cuando se inyectaron patos con ergocriptina (un agonista dopaminérgico) podría sugerir que esta monoamina (DA) actúa inhibitoriamente a nivel hipotalámico, inhibiendo la secreción de los posibles factores liberados de MSH (MRF). Estos resultados están sustentados por los datos bioquímicos que confirman la presencia de DA

en extractos de eminencia media de pato. Asimismo se ha demostrado por técnicas histoquímicas la existencia de esta monoamina en el hipotálamo de otras especies aviares (396). A la luz de estos resultados podría ser que la DA ejerza su acción a nivel del SNC, controlando la secreción de las hormonas hipofisiotrópicas que a su vez regulan la secreción de MSH en las células CM de la adenohipófisis del pato.

Los transplantes de pars intermedia en lugares distantes del hipotálamo constituyeron la aproximación clásica utilizada por numerosos investigadores al estudiar el control hipotalámico sobre los mecanismos de secreción hormonal hipofisaria en diversos órdenes de animales (399). En el intento de esclarecer los mecanismos que controlan la secreción de ACTH y α -MSH en el pato, utilizamos una condición experimental similar: transplantamos la porción rostral de adenohipófisis de pato en la cámara anterior del ojo de otro pato receptor. Por técnicas inmunohistoquímicas demostramos la presencia de ACTH, pero no de α -MSH en las células del transplante a diferencia de lo que ocurre en la hipófisis in situ donde como se aclaró previamente ACTH y α -MSH coexisten en el mismo tipo celular del lóbulo cefálico de la adenohipófisis. Estos resultados fueron corroborados por las determinaciones bioquímicas donde observamos que la relación ACTH/ α -MSH está significativamente aumentada en los transplantes comparativamente con la adenohipófisis in situ. Esto podría sugerir por un lado una diferencia relativa en la producción de estas hormonas en el transplante respecto a lo que ocurre en la hipófisis normotrópica. Por otro lado, esta diferencia también podría ser reflejo de una secreción diferencial de estos péptidos en el transplante. Sin embargo, los niveles plasmáticos de ACTH y α -MSH en los patos transplantados respecto de los patos controles no mostraron diferencias significativas, indicando que la contribución de las hormonas producidas por el transplante en los niveles plasmáticos es insignificante, lo que sugiere que el control de secreción de estas hormonas en el pato no es inhibitorio. Los experimentos realizados con los transplantes in vitro nos demuestran que en condiciones basales, los pedazos de mitades rostrales de adenohipófisis secretan más α -MSH por mg de proteínas que los transplantes, sin em-

bargo en condiciones de estimulación con extractos de EMP, la cantidad de esta hormona secretada por mg de proteína está significativamente aumentada en los transplantes con respecto a las mitades rostrales de adenohipófisis normotrópicas. Esto podría deberse al desarrollo de una hipersensibilidad en los transplantes para un posible factor liberador de MSH (MRF). Todos estos resultados están sustentados por los hallazgos in vitro obtenidos utilizando la columna de células dispersas perfundidas de adenohipófisis de pato, que demuestran que diversos péptidos neurohipofisarios de mamíferos y aves y el oCRF actuaban como secretagogos sobre ACTH y α -MSH en estas células.

Todos los secretagogos con posible función fisiológica ensayados, estimularon la secreción tanto de ACTH como de α -MSH, en forma concomitante y coordinada. Esto indicaría que al igual que lo que ocurre con la secreción de péptidos POMC por las células corticotropas de rata no existirían estímulos que podrían controlar de manera diferencial la secreción de ambos péptidos, sin embargo debe destacarse que cuando se expuso a las células CM a una alta concentración de potasio, sólo ACTH resultó ser liberada abundantemente, mientras que α -MSH permaneció en sus niveles basales. Como el proceso de secreción producido por alto potasio es mediado por Ca^{+2} (388), no se descarta la existencia de algún secretagogo aún no identificado que, intracelualarmente, pudiera mediar su efecto a través del Ca^{+2} , y que pueda disociar la secreción de ACTH y α -MSH.

Podemos concluir que en las aves, el mecanismo que regula el control de secreción de ACTH y α -MSH de las células corticomelanotropas está constituido por un sistema de multicomponentes, entre los que podemos incluir los péptidos neurohipofisarios AVT y MT; una sustancia CRF-simil que podría actuar sinérgicamente con los péptidos antes mencionados y diversas catecolaminas como NA y A. A la luz de los resultados obtenidos podemos suponer que si bien las células CM de la adenohipófisis del pato muestran propiedades topográficas y bioquímicas (inmunológicas) que por un lado las harían semejantes a las corticotropas de la pars distalis de los mamíferos, por el otro (debido a la pre

sencia de α -MSH) tendrían también semejanzas con las células melano-
tropas de la pars intermedia, pero desde el punto de vista de los me-
canismos que controlan la liberación de sus hormonas, estas células se
comportan de manera análoga a las corticotropas de la PD de mamíferos,
es decir, están bajo control hipotalámico estimulatorio por intermedio
del mismo tipo de sustancias que en esta clase de vertebrados.

H. J. Costa

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Castro, M.G.; Estivariz, F.E. and Iturriza, F.C. (1984). Comp. Biochem Physiol., 79A: 169.
- 2.- Castro, M.G.; Estivariz, F.E. and Iturriza, F.C. (1986). Comp. Biochem. Physiol., 83A: 71.
- 3.- Castro, M.G.; Morano, M.I.; Estivariz, F.E., Iturriza, F.C. (1986) Acta Physiol. Pharmacol. Latinoamericana. En prensa.
- 4.- Iturriza, F.C.; Castro, M.G. and Estivariz, F.E. (1986). Gen. Comp Endocrinol. En prensa.
- 5.- Fingl, E. y Dixon, M.W. (1978). En: "Bases Farmacológicas de la Terapéutica". Goodman, L.S. y Gilman, A. (Eds). Interamericana, Quinta Edición, pp:1.
- 6.- Eberle, A.N.; Kriwaczek, V.M. and Schulster, D. (1981). En: "Perspectives in Peptide Chemistry". Eberle, A; Geiger, R. and Wieland, T. (Eds) Krager, Basel, pp: 407.
- 7.- Rodbell, M. (1980) Nature (london), 284: 17.
- 8.- Wingstrand, K.G. (1963). En: "Cytologie de l'Adenohypophyse". Benoit, J. and Da Lage, Ch. (Eds). Centre National de la Recherche Scientific, París, pp: 243.
- 9.- Legait, E. and Legait, H. (1955) Comp. Rend. Soc. Biol. CXLIX:2207
- 10.- Mikami, S.I. (1958). The cytological significance of regional patterns in the adenohypophysis of the fowl. J. Fac. Agric., Iwate University.
- 11.- Herlant, M., Benoit, J., Tixier-Vidal, A. and Assenmacher, I. (1960) Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris) 250: 2936.
- 12.- Stockell-Hartree, A. and Cunningham, F.J. (1969). J. Endocrinol, 43: 609.
- 13.- Licht, P., Papkoff, H., Farmer, S.W., Muller, C.H., Tsui, H.W., and Crewes, D. (1977). Rec. Prog. Horm. Res., 33: 169.

- 14.- Burke, W.H., Licht, P., Papko, F.M., and Bonagallo, A. (1979) Gen. Comp. Endocrinol., 39: 508.
- 15.- Long, R., Serio, R., Germershausen, J., Taylor, J., Leung, F., Olson, G. and Weppelman, R. (1984). En: "The Journal of Steroid Biochemistry". Labrie, F. and Proulx, L. (Eds). Pergamon Press, New York, Vol. 20, N^o 6B: H66 (Res).
- 16.- Moszkowski, A. (1949). Comp. Rend. Soc. Biol., 143: 1332.
- 17.- Benoit, J. (1950) En: "Traité de zoologie". Grassé, P.P. (Ed). Tome XV: Oiseaux. Mason & Co., Paris, pp: 316.
- 18.- Nalbandov, A. and Card L.E. (1942). Poultry Sci. 21: 474 (ABS).
- 19.- Nalbandov, A., And Card L.E. (1943). J. Exp. Zool. 94: 387.
- 20.- Scanes, C.G.; Bolton, N.J. and Chadwick, A. (1975) Gen. Comp. Endocrinol., 27: 371.
- 21.- Burke, W.H. and Papkoff, H. (1980). Gen. Comp. Endocrinol., 40:297.
- 22.- Asawaeroengchai, H.; Russell, S.M. and Nicoll, C.S. (1978). Endocrinology, 102: 407.
- 23.- Garnier, P.E.; Aubert, M.C.; Kaplan, S.L. and Grumbach, M.M. (1978) J. Clin. Endocrinol. Metab., 47: 1273.
- 24.- Leung, F.C.; Russell, S.M. and Nicoll, C.S. (1978) Endocrinology, 103: 1619.
- 25.- Saeki, Y. and Tanabe, Y. (1955) Poultry Science, 34: 909.
- 26.- Riddle, O.; Bates, W.R. and Lahr, E.L. (1935). Am J. Physiol., 111: 352.
- 27.- Chermis, F.L.; Merrick, R.B.; McSahn, W.H. and Hymer, W.C. (1962). Endocrinology, 71: 288.
- 28.- Mitchell, J.B. (1929) Physiol.Zool., 2: 411
- 29.- Martindale, F.M. (1941). Anat. Rec., 79: 373.
- 30.- Shellabarger, C.J. and Godwin, J.T. (1954) Am J.Physiol., 176: 371.
- 31.- Scanes, C.G. (1974). Neuroendocrinology, 15: 1.

- 32.- Breneman, W.R. and Bathkamp, W. (1973) *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 52: 189.
- 33.- Bolton, N.J.; Chadwick, A. and Scanes, C.G. (1974). *J. Physiol.*, 238 78.
- 34.- Fichera, G. (1905). *Arch. di Biol. Norm. e Pat.*, LIX: 739.
- 35.- Solomon, J. and Greep, R.D. (1959) *Endocrinology*, 65:334.
- 36.- Moudgal, N.R. and Li: H.C. (1961) *Arch. Biochem Biophys.*, 93: 122.
- 37.- Hayashida, T. (1972). En: "Comparative immunochemical studies of pituitary growth hormones." Pecile, A. And Müller, E.E. (Eds). *Growth and growth hormone. Excerpta Medica, Amsterdam*, pp:25.
- 38.- Nicoll, C.S. and Licht, P. (1971) *Gen Comp. Endocrinol.* 17: 490.
- 39.- Farmer, S.W.; Papkoff, H. and Hayashida, T. (1974). *Endocrinology*, 95: 1560.
- 40.- Harvey, S. and Scanes, C.G. (1977) *J. Endocrinol.*, 73: 321.
- 41.- Proudman, J.A. and Wentworth, B.C. (1978) *Gen.Comp. Endocrinol.*, 34, 294.
- 42.- Papkoff, H. and Hayashida, T. (1972) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140: 251.
- 43.- Jozsa, R.; Scanes, C.G.; Vigh, S. and Mess, B. (1979). *Gen Comp. Endocrinol.*, 39: 158.
- 44.- Enemar, A. (1967) *J. Endocrinol.*, 37: 9.
- 45.- Harvey, S., Scanes, C.G., Chadwick, A. and Bolton, N.J. (1979). *Br. Poult. Sci.*, 20: 9.
- 46.- Harvey, S.; Godden P.M.M. and Scanes, C.G. (1977). *Br. Poult. Sci.*, 547.
- 47.- Proudman, J.A. and Nentworth, B.C. (1980) *Br. Poult. Sci.*, 59: 906.
- 48.- Harvey, S. and Phillips, J.G. (1980) *Gen. Comp. Endocrinol.*, 42: 334.
- 49.- Scanes, C.G.; Harvey, S.; Chadwick, A. and Bolton, N.J. (1977). *J. Endocrinol.*, 73: 10P.

- 50.- Harvey, S.; Scanes, C.G.; Chadwick, A.; Broder, G. and Bolton, N. J. (1979) J. Endocrinol., 82:193.
- 51.- Harvey, S.; Scanes, C.G.; Chadwick, A. and Bolton, N.J. (1978). Neuroendocrinology, 26: 249.
- 52.- Souza, H. (1984). En: "Journal of Experimental Zoology." Alan R. Li INC., New York, Vol. 232.
- 53.- Li, C.H.; Chung, D.; Oelofson, W. and Naude, R.J. (1978). Biophys. Res. Commun., 81: 900.
- 54.- Chang, W.C.; Chung, D. and Li, C.H. (1980). Int. J. Peptide Prot. Res., 15: 261.
- 55.- Estivariz, F.E.; Levitin, H and Iturriza, F.C. (1980). Gen. Comp. Endocrinol., 40: 123.
- 56.- Iturriza, F.C.; Estivariz, F.E. and Levitin, H. (1980). Gen. Comp. Endocrinol., 42: 110.
- 57.- Herbert, S.K. (1939) J. Pharm. Exp. Tera., 65: 104.
- 58.- Breitenbach, R.P. (1962) Poultry Sci., 41: 1318.
- 59.- Nagra, C.L.; Birnie, B.J.; Baum, J. and Meyer, K.R. (1963). Gen. Comp. Endocrinol., 3: 274.
- 60.- Perek, M.; Eckstein, B and Eschkol, Z. (1959). Endocrinology, 64: 831.
- 61.- Chen, G.F.; Oldham, F.K. and Geiling, E.M.E. (1940). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 45: 810.
- 62.- Kleinholz, L.H. and Rahn, H. (1940). Anat. Rec., 76: 157.
- 63.- Acher, R. (1974). En: "The pituitary gland and its neuroendocrine control". Konobil, E. and Sawyer, W.H. (Eds). A, Physiol. Soc. Washington, D.C., 4(7): 119.
- 64.- Sawyer, W.H. (1968). En: "Handbook of experimental pharmacology: neurohypophysial hormones and similar polipeptides". Berde, B. (Ed) Springer-Verlag, New York, 23: 717.
- 65.- Sawyer, W.H. and Pang, P.K.T. (1977). En: "Neurohypophysis". Moses,

- A.M. and Share, L. (Eds). Karger, Basel, pp:1.
- 66.- Vizsolyi, E. and Perks, A.M. (1969). *Nature* (London), 223: 1169.
- 67.- Rurak, D.W. and Perks, A.M. (1974). *Gen Comp. Endocrinol.*, 22: 480.
- 68.- Rurak, D.W. and Perks, A.M. (1976). *Gen Comp. Endocrinol.*, 29: 301.
- 69.- Acher, R.; Chauvet, J. and Chauvet, M.T. (1970). *Eur. J. Biochem.*, 17: 509.
- 70.- Burford, G.D.; Jones, C.W. and Pickering, B.T. (1971). *Biochem. J.*, 124: 809.
- 71.- Russell, J.T.; Brownstein, M.J. and Gainer, H. (1980). *Endocrinology* 107: 1880.
- 72.- Schmale, H.; Heinsohn, S. and Richter, D. (1983). *EMBO J.*, 2: 763.
- 73.- Peek, J.C. and Watkins, W.B. (1979). *Neuroendocrinology*, 28: 52.
- 74.- Goosens, N.; Bläsher, S.; Oksche, A.; Vandesaende, F. and Dierickx, K. (1977) *Cell Tiss. Res.*, 184: 1.
- 75.- Bons, N. (1980). *Cell Tiss. Res.*, 213: 37.
- 76.- Bons, N.; Kerdelhué, B. and Assenmacher, I. (1978). *Cell Tiss. Res.*, 188: 99.
- 77.- Calas, A.; Kerdelhué, E. and Assenmacher, I. (1976). *Colloque Inserm, A.T. Neuroendocrinologie*, 7: 91.
- 78.- Legait, M. (1959) "Contribution a l'étude morphologique et expérimentale du système hypothalamo-neurohypophysaire de la poule Rhode-Island". Thèse, Louvain-Nancy.
- 79.- Oksche, A.; Laws, F.D.; Kamemoto, I.F. and Farner, D.S. (1959). *Z. Zellforsch.*, 51: 1.
- 80.- Bläschner, S. and Simon, E. (1978) *Gen. Comp. Endocrinol.*, 34: 67.
- 81.- Koike, T.I.; Pryor, L.R.; Neldon, H.L. and Venable, R.S. (1977). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 33: 359.
- 82.- Kihlstrom, J.E. and Danninger, I. (1972). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 18: 115.

- 83.- Munsik, R.A.; Sawyer, W.H. and Van Dyke, H.B. (1960). *Endocrinology*, 66: 860.
- 84.- Sturkie, P.D. and Lin, Y. (1966). *J. Endocrinol.*, 35: 325.
- 85.- George, J.C. (1974/76). *J. Bombay. Nat. Hist. Soc.*, 71: 394.
- 86.- Wied, D. de and Versteeg, D.H.G. (1979). *Fed. Proc.*, 38: 2348.
- 87.- Harris, G.W. (1948). *Physiol. Rev.*, 28: 139.
- 88.- Hinsey, J.C. and Markee, J.E. (1933) *Recent Prog. Horm. Res.*, 31: 270.
- 89.- Harris, G.W. (1937). *Proc. Roy. Soc. B*, 122: 374.
- 90.- Popa, G.T and Fielding, U. (1933). *J. Anat. (London)*, 67: 227.
- 91.- Houssay, B.A.; Biasotti, A. and Sanmartino, R. (1935). *C.R. Soc. Biol.*, 120: 725.
- 92.- Wislocki, G.B. and King, L.S. (1936). *Amer. J. Anat.*, 58: 421.
- 93.- Green, J.D. and Harris, G.W. (1947). *J. Endocrinology*, 5: 136.
- 94.- Green, J.D. and Harris, G.W. (1949). *J. Physiol. (London)*, 108: 359.
- 95.- Xuereb, G.P.; Prichard, M.M.L. and Daniel P.M. (1954). *Quart. J. Exp. Physiol.*, 39: 219.
- 96.- Adams, J.H.; Daniel, P.M. and Prichard, M.M.L. (1964). *Endocrinology*, 75: 120.
- 97.- Scharrer, E. and Scharrer, B. (1954). *Recent. Prog. Horm. Res.*, 10: 183.
- 98.- Farner, D.S. and Oksche, A. (1962). *Gen. and Comp. Endocrinol.*, 2: 113.
- 99.- Benoit, J. and Assenmacher, I. (1951). *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 40: 27.
- 100.- Benoit, J. and Assenmacher, I. (1953). *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 42: 334.
- 101.- Wingstrand, K.G. (1951). "The structure and development of the avian pituitary". C.N.K. Gleerup. (Ed). Lund, Sweden.

- 102.- Grignon, G. (1956). "Développement du complexe Hypothalamo-hypophysaire chez l'embryon de poulet". Société D'Impressions Typographiques, Nancy.
- 103.- Mosier, H.D. (1955). Endocrinol., 57: 661.
- 104.- Duncan, D. (1956). Anat. Rec., 125: 457.
- 105.- Assenmacher, I. (1957). Comp. Rend. Soc. Biol., 41: 1301.
- 106.- Drager, G.A. (1945). Endocrinol., 36: 124.
- 107.- Benoit, J. (1962). Gen. and Comp. Endocrinol., Suppl,1: 254.
- 108.- Okamoto, S. and Ihara, Y. (1960). Anat, Rec., 137: 485.
- 109.- Green, J.D. (1951) Amer. J. Anat., 88: 225.
- 110.- Boler, J.; Enzmann, F.; Fokers, K.; Bowers, C.Y. and Schally A.B. (1969). Biochem. Biophys. Res. Commun., 37: 705.
- 111.- Matsuo, H.; Baba, Y.; Nair, R.M.G.; Arimura, A and Schally, A.V. (1971). Biochem Biophys. Res. Commun., 43: 1334.
- 112.- Amoss, M.; Burgus, R.; Blackwell, R.; Vale, W.; Fellows, R. and Guillemin, R. (1971). Biochem. Biophys. res. Commun., 44: 205.
- 113.- Brazeau, P.; Vale, W.; Burgus, P.; Ling, N.; Butcher, M.; Rivier, J. and Guillemin, R. (1973). Science, 179: 77.
- 114.- Guillemin, R.; Brazeau, P.; Bohlen, P; Esch, F.; Ling, N. and Wehrenberg, W.B. (1982). Science, 218: 585.
- 115.- Vale, W.; Spiess, J.; Rivier, C. and Rivier, J. (1981). Science, 213, 1394.
- 116.- Peczley, P. (1969). Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 35: 47.
- 117.- Stanier, I.M. and Holmes, W.N. (1969). Gen. Comp. Endocrinol., 12: 350.
- 118.- Salem, M.H.M.; Norton, H.W. and Nalbandov, A.V. (1970). Gen. Comp. Endocrinol, 14: 270.
- 119.- Jackson, I.M.D. and Reichlin, S. (1974). Endocrinology, 95: 854.
- 120.- Follet, B.K. (1970). Gen. Comp. Endocrinol., 15: 165.

- 121.- Müller, E.E.; Sawano, S and Schally, A.V. (1967). Gen Comp. Endocrinol., 9:349.
- 122.- Kling, J.A. and Millar, R.P. (1982). J. Biol. Chem., 257: 10729.
- 123.- Brownstein, M.J.; Palkovits, M.; Saavedra, M.J. and Kizier, S. J. (1976). En: "Frontiers in neuroendocrinology". Martini, L. and Ganong, W.F. (Eds). Raven Press, New York, 4: 1.
- 124.- Zimmerman, E.A. (1976). En: "Frontiers in neuroendocrinology". Martini, L. and Ganong, W.F. (Eds), 4:
- 125.- Goosens, N; Bläsher, S; Oksche, A.; Vandesande, F. and Dierickx, K. (1977). Cell and Tiss. Res. 184:1.
- 126.- Bons, N.; Kerdelhue, N. and Assenmacher, I. (1978). C.R. Acad. Sc. Paris , 287: 145.
- 127.- Yokoyama, K.; Oksche, A.; Dardin, T.R. and Farner, D.S. (1978). Cell Tiss. Res., 189:441.
- 128.- Bläsher S, Fellman D. and Bugnon C. (1978). Cell Tiss. Res., 195:183.
- 129.- Bläsher, S. (1980) Verh. Anat. Ges. 74. Vers.
- 130.- Bläsher, S. (1980) Verh. Anat. Ges. 75. Vers.
- 131.- Porter, J.C., Mical, R.S., Ben-Jonathan, N. and Ondo, J.G. (1973) Recent. Progr. Horm. Res., 29: 161.
- 132.- Rumsfield, H.W. and Porter, J.C. (1959) Arch. Biochem. Biophys. 82: 473.
- 133.- Fink, G., Smith, J.R. and Tibbals, J. (1971) Nature. 230: 467.
- 134.- Porter, J.C. and Jones, J.C. (1956) Endocrinology.
- 135.- Porter, J.C., Goldman, B.D. and Wilber, J.F. (1970). En: "hypophysiotropic Hormones of the Hypothalamus: Assay and Chemistry." Meites, J. (Ed). Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, pp: 282.
- 136.- Page, R.B., Munger, B.L. and Bergland R.M. (1976) Am. J. Anat.,

146:273.

- 137.- Oliver, C., Mical, R.S. and Porter, J.C. (1977). *Endocrinology*, 101: 598.
- 138.- Kobayashi, H. and Matsui, T. (1969). En: "Frontiers in neuroendocrinology". Ganong, W.F. and Martin, L. (Eds). Oxford University Press, pp: 3.
- 139.- Millhouse, O.E. (1974). En: "Brain endocrine interaction. II The ventricular system." 2nd Int. Symposium, Shiznoka, Krager Basel, 1975, pp.:3
- 140.- Porter, J.C., Ben-Jonathan, N and Oliver, C. (1975). En: "Brain endocrine interaction II. The ventricular system". 2nd. Int. Symposium Shiznoka. Krager Basel, 1975, pp: 295.
- 141.- De Wied, D. (1969). En: "Frontiers in neuroendocrinology". Ganong W.F. and Martini, L. (Eds). Oxford University Press, pp:97.
- 142.- Greidanus, Tj., Van Wimersma, B., Dogerton, J. and De Wied, D. (1975) *Life Sci.* 16:637.
- 143.- Oksche, A. and Farner, D.S. (1974) *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol* 48/4: 1.
- 144.- Scharrer, B. (1980). En: "Das peptiderge neuron symposium in memoriam Wolfgang Bargman". *Verh. Anat. Ges.*, 75, Vers.
- 145.- Calas, A. (1974). "L'innervation peptidergique et monoaminergique de l'eminence médiane. Etude cytophysiologique chez les oiseaux." Thèse, Académie de Montpellier.
- 146.- Leonhardt, H. (1980). En: "Hb d. Mikroskop. Anat. d. Menschen". A. Oksche and L. Vole Rath (Eds). Springer, Berlin, Heidelberg and New York, Vol. IV/10: 177.
- 147.- Vemura, H. and Kobayashi, H. (1977) *Cell Tiss. Res.*, 178: 143.
- 148.- Nozaki, M. (1975) *Cell Tiss. Res.*, 163: 433.
- 149.- Schally, A.V. and Bowers C.Y. (1964). *Metabolism*, 13: 1190.
- 150.- Schally, A.V., Arimura, A., Bowers, C.Y., Kastin, A.J., Sawano, S.

- and Redding, T.W. (1968). Recent, Prog. Horm. Res., 24: 497.
- 151.- McCann, S.M. and Porter, J.C. (1969). Physiol. Rev., 49:240.
- 152.- Schally, A.V., Arimura, A., Bowers, C.Y., Kastin, A.J. (1973). Science, 179: 341.
- 153.- Porter, J.C., Mical, R.S., Ben-Jonathan, N. and Ondo, I.G. (1973). Recent. Progr. Horm. Res., 29: 161.
- 154.- Vale, W., Vaughan, I., Smith, M., Yamamoto, G., Rivier, J. and Rivier, C. (1983). Endocrinology, 113 N°3: 1121.
- 155.- Martini, L., Fraschini, F. and Motta, M. (1968). Recent Progr. Horm. Res., 24: 439.
- 156.- Jones, M.T., Hillhouse, E. and Burden, J. (1976). en: "Frontiers in neuroendocrinology". Martini, L. and Ganong, W.F. (Eds). Raven Press, New York, 4: 195.
- 157.- Raymond, V., Lépine, J., Giguère, V., Lissitzky, J.C., Coté, J. and Labrie, F. (1981). Molecular and Cellular Endocrinology, 22: 295.
- 158.- McCann, S.M. and Brobeck, J.R. (1954). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 87: 318.
- 159.- Hedge, G.A., Yates, M.B., Marcus, R. and Yates, F.E. (1966). Endocrinology, 79: 328.
- 160.- Hedge, G.A. and Smelick, P.G. (1969). Neuroendocrinology, 4:242.
- 161.- Burgus, R. and Guillemin, R. (1970). Annu. Rev. Biochem., 39: 499.
- 162.- Guillemin, R. and Rosenberg, B. (1955). Endocrinology, 57: 599.
- 163.- Saffran, M. and Schally, A.V. (1955) Canad. J. Biochem. Physiol., 33: 408.
- 164.- Gillies, G. Linton, E.A. and Lowry, P.J. (1982) Nature (London), 299: 4355.
- 165.- Gillies, G. and Lowry, P.J. (1979) Nature (London), 278: 463.
- 166.- Gaillard, R.C., Grossman, A., Gillies, G., Rees, L.H. and Besser, G.M. (1981). Clin. Endocrinol., 15: 573.

- 167.- Spinedi, E. and Negro-Vilar, A. (1983). *Neuroendocrinology*, 37: 446.
- 168.- Leeman, S.E., Glenister, D.W. and Yates, F.E. (1962). *Endocrinology*, 70: 249.
- 169.- Guillemin, R. (1964) *Recent. Progr. Horm. Res.*, 20: 89.
- 170.- De Wied, D., Witter, A., Versteeg, D.H. and Mulder, A. (1969) *Endocrinology*, 85:561.
- 171.- Chan, L.T., de Wied, D. and Saffran, M. (1969) *Endocrinology*, 84:967.
- 172.- McCann, S.M. (1957) *Endocrinology*, 60:664.
- 173.- De Wied, D. (1961) *Acta Endocrinol.*, 37: 288.
- 174.- Porter, J.C., Chariwal, A.P.S. and McCann, S.M. (1967). *Endocrinology*, 80: 679.
- 175.- Chan, L.T., Schaal, S.M. and Saffran, M. (1969) *Endocrinology*, 85:644.
- 176.- Vernikos-Danellis, J. (1964) *Endocrinology*, 75: 514.
- 177.- Arimura, A., Saito, T. and Schally, A.V. (1967) *Endocrinology*, 81:235.
- 178.- Martini, L. (1966). En:"The pituitary gland". Harris, W.G. and Donovan, B.T. (Eds). London, Butterworths, 3: 535.
- 179.- Dahriwall, A.P.S., Russell, S.M., McCann, S.M. and Yates, F.E. (1969). *Endocrinology*, 84: 544.
- 180.- Hiroshige, T., Kunita, H. and Yoshimura, J. (1968) *Jpn. J. Physiol* 18: 179.
- 181.- Grinbeland, R.E., Wherry, F.E. and Anderson, E. (1962) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 110: 377.
- 182.- Anderson, E. (1966). *Science*, 152: 379.
- 183.- Sirett, N.E. and Porves, H.D. (1972) *Neuroendocrinology*, 10: 83.
- 184.- Seiden, G. and Brodish, A. (1971). *Neuroendocrinology*, 8: 145.

- 185.- Pearl Mutter, A.F., Radini, E. and Saffran, M. (1974). Neuroendocrinology, 15:106.
- 186.- Chayen J., Loveridge, N. and Daly, J.R. (1972). Clinical Endocrinology, 1: 219.
- 187.- Portanova, R., Smith, D.K. and Sawyers, G. (1970). Proc. Soc. Exp. Biol., 133: 573.
- 188.- Portanova, R. (1972). Proc. Soc. Exp. Biol Med., 140: 825.
- 189.- Swallow, R.L. and Sayers, G. (1969). Proc. Soc. Biol. Med., 131: 1.
- 190.- Portanova, R. and Sayers, G. (1973). Neuroendocrinology, 12: 236.
- 191.- Mulder, G.H. (1975). En: "Release of ACTH by rat pituitary cells", Ph.D. Thesis, Vrije, University of Amsterdam.
- 192.- Lowry, P.J. (1979). J. Endocrinol., 62: 163.
- 193.- Fehm, Hol., Voight, K.H. and Lang, R. (1975) Acta Endocrinol. (Suppl), 193: 129.
- 194.- Takebe, K., Yasuda, N. and Greer, M.A. (1975). Endocrinology, 97: 1248.
- 195.- Gillies, G. and Lowry, P.J. (1978). Endocrinology, 103: 521.
- 196.- Donaldson, E.M., Holmes, W.N. and Stachenko, J. (1965). Gen. Comp. Endocrinol., 5: 542.
- 197.- Guillemin, R., Hearn, W.R., Cheek, W.R. and Householder, D.E. (1957). Endocrinology, 60: 488.
- 198.- Porter, J.C. and Rumsfield, H.W. (1959). Endocrinology, 64: 948.
- 199.- Royce, P.C. and Sayers, G. (1960) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 103: 447.
- 200.- Schally, A.V. and Guillemin, R. (1963). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112: 1014.
- 201.- Vale, W. and Rivier, C. (1977) Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 36: 8.

- 202.- Schally, A.V., Arimura, A., Redding, K., Chiara, K., Gordin, A., Huang, W.Y. and Saffran, M. (1977) Amer. Endocrine Soc. 59th Annual Meeting, N^o 77 (ABS).
- 203.- Pearlmutter, A.F., Rapino, E. and Saffran, M. (1975). Endocrinology, 97: 1336.
- 204.- Fortier, C. and Selye (1949) Am. J. Physiol., 159: 433.
- 205.- Schally, A.V., Carter, W.C., Hearn, I.C. and Bowers, C.Y. (1965) Am. J. Physiol., 209: 1169.
- 206.- Dhariwall, A.P.S., Antunes-Rodríguez, J. Reeser, F., Choners, J. and McCann, S.M. (1966). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121: 8.
- 207.- Gillham, B., Jones, M.T., Hillhouse, E.W. and Burden, J. (1975). J. Endocrinol., 65: 12P-13P.
- 208.- Gillham, B, Hillhouse, E.W. and Jones, M.T. (1976) J. Endocrinol 71: 60P-61P.
- 209.- Sayers, G. (1977). En: "Abstracts of the International Symposium on the endocrine function of the human adrenal cortex". Florenci
- 210.- Rivier, C., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J. and Vale, W. (1982). Endocrinology, Vol. 110, n^o 1: 272.
- 211.- Gibbs, D.M. and Vale, W. (1982) Endocrinology, 111: 1418.
- 212.- Bloom, F.G., Battenberg, E.L.F., Rivier, J. and Vale, W. (1982) Regul. Peptides, 4: 43.
- 213.- Swanson, L.W., Swachenko, P.E., Rivier, J. and Vale, W. (1983). Neuroendocrinology, 36: 165.
- 214.- Bugnon, C., Fellman, D., Gouget, A. and Cardot, J. (1982). Nature 298: 159.
- 215.- Paull, W., Scholer, J., Arimura, A., Meyers, C., Chang, J., Chang D., Shimizu, J. (1983). Peptides, 1: 183.
- 216.- Fleisher, N. and Vale, W. (1968). Endocrinology, 83: 1232.
- 217.- Sayers, G. and Portanova, R. (1974). Endocrinology, 94: 1723.
- 218.- Vale, W. and Rivier, C. (1977) Fed. Proc., 36: 2094.

- 219.- Buckingham, C. (1980) *Pharmacol, Rev.*, 31: 253.
- 220.- Ganong, W.F. (1980). *Federation Proc.*, 39: 2923.
- 221.- Rose, J.C. and Ganong, W.F. (1976). En: "Current developments in psycopharmacology". Essman, W.F. and Valzelli, L. (Eds), pp: 87.
- 222.- Mueller, G.P., Twohy, C.P., Chen, H.T., Avis, J.P. and Meites, J. (1976) *Life Sci.*, 18: 715.
- 223.- Vale, W., Rivier, C., Yang, L., Minick, S. and Guillemin, R. (1978). *Endocrinology*, 103: 1910.
- 224.- Fuxe, K., Hökfelt, T. Jonsson, G. and Lofstrom, M.A. (1973). En: "Frontiers in catecholamine research." Usdin, E. and Snyder, S. (Eds) Pergamon, Oxford, pp: 787.
- 225.- Palkovits, M., Brownstein, M., Saavedra, J.M. and Alxerod, J. (1974) *Brain Res.*, 77: 137.
- 226.- Saavedra, J.M., Brownstein, M., Palkovits, M., Kizer, J.S. and Alxerod, J. (1974) *J. Neurochem.*, 23: 869.
- 227.- Bjorklund, A., Moore, R.Y., Nobin, A. and Stenevi, U. (1973) *Brain Res.*, 51: 171.
- 228.- MacLeod, R.M. and Lehmeyer, J.E. (1974). *Endocrinology*, 94: 1077
- 229.- Labrie, F., Brouin, J., Ferland, L. Lagacé, L., Beulieu, M., De Lean, A., Kelly, P.A., Caron, M.G. and Raymond, V. (1978). En: "Recent Progress in Hormone Research". Greep, R.O. (Ed) Academic Press, New York, 34: 25.
- 230.- Daniel, P.M. and Pritchard, M.M.L. (1956) *Q.J. Exp. Physiol.*, 41: 215.
- 231.- Palkovits, M. and Mezey, E. (1981) *Front. Horm. Res. (Basel)*, 8: 122.
- 232.- Goos, H.J. and Terlouw, M. (1977) *Front. Horm. Res. (Basel)*, 4: 51
- 233.- Wingstrand, K.G. (1966) En: "The pituitary gland". Harris, W.G. and Donovan, B.T. (Eds) Butterworths, London, 2: 1.

- 234.- Iturriza, F.C. (1964) Gen. Comp. Endocrinol., 4: 492.
- 235.- Enemar, A. and Falk, B. (1965). Gen. Comp. Endocrinol., 5: 577.
- 236.- Iturriza, F.C. (1966) Gen. Comp. Endocrinol., 6: 19.
- 237.- Björklund, A. (1968). Z. Zellforsch, 89: 573.
- 238.- Baumgarten, H.G., Björklund, A., Holstein, A.F. and Nobin, A. (1972) Z. Zellforsch, 126: 483.
- 239.- Björklund, A. and Falk, B. (1969) Z. Zellforsch, 93: 254.
- 240.- Saavedra, J.M., Palkovits, M., Kizer, J.S., Brownstein, M. and Zivin, J.A. (1975) J. Neurochem., 25: 257.
- 241.- Björklund, A., Moore, R.Y., Nobin, A. and Stenevi, U. (1973) Brain Res., 51: 171.
- 242.- Vincent, D.S. and Kumar, T.C.A. (1969) Z. Zellforsch, 99: 185.
- 243.- Whitaker, S. and La Bella, F.S. (1973). Z. Zellforsch, 142: 69.
- 244.- Bargman, W., Lindner, E, and Andres, K.H. (1967) Z. Zellforsch, 77: 282.
- 245.- Doerr-Schott, J. and Follenius, E. (1970) Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 106: 99.
- 246.- Dierickx, K. and Vandesande, F. (1976) Cell Tiss, Res., 174: 25.
- 247.- Stoekel, M.E., Schmidt, G. and Porte, A. (1981). En: " Peptides of the pars intermedia". CIBA Foundation Symposium. Pitman Medical, London, pp: 101.
- 248.- Etkin, W. (1962) Gen. Comp. Endocrinol., 2: 161.
- 249.- Cameron, E,. and Foster, C.L. (1971) J. Endocrinol., 49: 479.
- 250.- Iturriza, F.C., Sosa, H.C. and Howe, A. (1984) Comunicaciones Biológicas, 3: 7.
- 251.- Jorgensen, C.B. and Larsen, L.O. (1963). Gen. Comp. Endocrinol., 3: 468.
- 252.- Iturriza, F.C. (1967) Neuroendocrinology, 2: 11.

- 253.- Iturriza, F.C. (1969) Gen. Comp. Endocrinol., 12: 417.
- 254.- Iturriza, F.C and Kasal-Iturriza, M. (1972) Gen. Comp. Endocrinol., 3: 108.
- 255.- Howe, A. and Thody, A.J. (1969) J.Physiol., 203: 159.
- 256.- Daniel, P.M. and Pritchard, M.M.L. (1958) Am. J. Pathol., 34: 433
- 257.- Holmes, R.L. (1962). J. Endocrinol., 24: 53.
- 258.- Holmes, R.L. (1961). J. Endocrinol., 22: 7.
- 259.- Tilders, F.J.H. and Smelick, P.G. (1978) Neuroendocrinology, 25: 275.
- 260.- Penny, R.J., Tilders, F.J.H. and Thody, A.J. (1979) J.Physiol. (London), 292, 59.
- 261.- Howe, A. and Thody, A.J. (1969) J.Physiol., 203: 159.
- 262.- Tilders, F.J.H., van der Woude, H.A., Swaab, D.F. and Mulder, A. H. (1979) Brain Res., 171: 425.
- 263.- Stoppani, A.O.M. (1942) Endocrinology, 30: 782.
- 264.- Burgers, A.C.J., Leemreis, W., Dominiczak, T. and von Oordt, G.J. (1958) Acta Endocrinol., 29: 191.
- 265.- Iturriza, F.C. (1965) Acta Endocrinol., 48: 322.
- 266.- Levitin, H.P. (1980) Gen. Comp. Endocrinol., 41: 279.
- 267.- Scott, G.T. and Nadding, L.K. (1961) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106: 88.
- 268.- Wilson, J.F. and Dodd, J.M. (1973) Gen. Comp. Endocrinol., 20: 556.
- 269.- Kastin, A.J., Schally, A.V. and Viosca, S. (1971) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 137: 1437.
- 270.- Peaslee, M.H. and Milburn S.E. (1971) J. Endocrinol., 51: 253.
- 271.- Scott, G.T. and Stillings, W.A. (1972) Endocrinology, 90: 545.
- 272.- Kastin, A.J., Schally, A.V., Viosca, S. and Miller, C.M. (1969) Endocrinology, 84: 20.

- 273.- Thody, A.J., Penny, R.J., Clark, D. and Taylor, C. (1975) J. Endocrinol., 67: 385.
- 274.- Usategui, R., Oliver, C., Vaudry, H., Lombard, G., Rozenberg, I. and Mourre, A.M. (1976) Endocrinology, 98: 189.
- 275.- Penny, R.J. and Thody, A.J. (1978) Neuroendocrinology, 25: 193.
- 276.- Smelik, P.G. and Tilders, F.J.H. (1979). En: "Interaction within the brain-pituitary-adrenocortical system". Jones, M.T., Gilham, B., Dallman, M.F. and Chattopadhyay, S. (Eds) Academic Press, London, pp: 29.
- 277.- Berkenbosch, F., I., Vermes, I., Binnebake, R. and Tilders, F.J.H. (1981) Life Sci., 29: 2249.
- 278.- Smelik, P.G. (1981) Front. Horm. Res. (Basel) 8: 1.
- 279.- Berkenbosch, F., Tilders, F.J.H. and Vermes, I. (1983). Nature, 305: 237.
- 280.- Côté, T., Munemura, M., Eskay, P.L. and Kebabian, J.W. (1980) Endocrinology, 107: 108.
- 281.- Munemura, M., Eskay, P.L. and Kebabian, J.W. (1980). Endocrinology, 106: 1795.
- 282.- Bower, A., Hadley, M.E. and Hruby, V.J. (1974) Science, 184: 70.
- 283.- Tilders, F.J.H., Mulder, A.H. and Smelick, P.G. (1975) Neuroendocrinology, 18: 125.
- 284.- Tilders, F.J.H., Post, M., Jackson, S. Lowry, P.J. and Smelick, P.G. (1981) Acta Endocrinol., 97: 343.
- 285.- Jackson, S. and Lowry, P.J. (1983) Neuroendocrinology, 37: 248.
- 286.- Hadley, M.E., Hruby, V.J. and Bower, A. (1975) Gen Comp. Endocrinol., 26: 24.
- 287.- Briaud, B., Koch, B., Lutz-Bucher, B. and Miahle, C. (1979). Neuroendocrinology, 28: 377.
- 288.- Voight, K.H., Weber, E., Breitig, D. and Martin, R. (1978) Acta Endocrinol. (suppl) Copenh., 87: 17.

- 289.- Fischer, J.L. and Morituary, (1977) *Endocrinology*, 100: 1047.
- 290.- Schally, A.V. and Kastin, A.J. (1966) *Endocrinology*, 79: 768.
- 291.- Kastin, A.J. and Schally, A.V. (1966) *Gen Comp. Endocrinol.*, 7: 452.
- 292.- Nair, R.M.G., Kastin, A.J. and Schally, A.V. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 1376.
- 293.- Nair, R.M.G., Kastin, A.J. and Schally, A.V. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47: 1420.
- 294.- Celis, M.E., Taleisnik, S. and Walter, R. (1971) *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 45: 564.
- 295.- Taleisnik, S. and Orias, R. (1965) *Am. J. Physiol.*, 208: 293.
- 296.- Celis, M.E., Hase, S. and Walter, R. (1972) *Experientia*, 27: 1481.
- 297.- Celis, M.E. (1977) *Front. Horm. Res. (Basel)* 4: 69.
- 298.- Taleisnik, S. and Tomatis, S.E. (1967) *Endocrinology*, 81: 819.
- 299.- Taleisnik, S., Orias, P. and de Olmas, J. (1966) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122: 325.
- 300.- Celis, M.E. and Taleisnik, S. (1973) *Life Sci.*, 13: 493.
- 301.- Taleisnik, S., Tomatis, M.E. and Celis, M.E. (1972). *Neuroendocrinology*, 10: 325.
- 302.- Taleisnik, S., Tomatis, M.E. and Celis, M.E. (1974), *Neuroendocrinology*, 13: 327.
- 303.- Grant, N.H., Clark, D.E. and Rosanoff, E.I. (1973) *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 51: 100.
- 304.- Vale, W., Grant, G. and Guillemin, R. (1973) En: "Frontiers in neuroendocrinology". Ganong, W.F. and Martini, L. (Eds) Oxford Univ. Press, N.Y., pp: 375.
- 305.- Wilson, J.F. and Dodd, J.M. (1973) *Gen. Comp. Endocrinol.*, 20: 556.
- 306.- Terlouw, M., Goos, H.J. and van Oordt, P.G.W. (1974) *Fortschr. Zool.* 22: 117.

- 307.- Hadley, M.E., Bower, A, and Hruby, V.J. (1973) Yale J. Biol. Med., 46: 602.
- 308.- Barnawell, E.P., La Pointe, J. and Adams, H. (1974). Amer. Zool., 14: 1270.
- 309.- Thornton, V.F. and Geschwind, I.I. (1975). Gen. Comp. Endocrinol., 26: 346.
- 310.- Vivas, A. and Celis, M.E. (1975) En: " Peptides: chemistry, esturc-
ture, biology". Walter, R. and Meinhofer, J. (Eds) Ann. Arbor Scie
ce Publ., Ann. Arbor, Mich., pp: 777.
- 311.- Kastin, A.J., Viosca, S., Nair, R.M.G., Schally, A.V., Miller,
M.C. (1972) Endocrinology, 91: 1323.
- 312.- Bower, A., Hadley, M.E. and Hruby, V.J. (1971) Biochem. Biophys.
Res. Commun., 45: 1185.
- 313.- Hruby, V.J., Smith, C.W., Bower, A. and Hadley, M.E. (1972) Scien-
ce, 176: 1331.
- 314.- Tonon, M.C., Leroux, P., Leboulenger, F., Delarue, C., Yegou, S.
and Vaudry, H. (1980) Life Sci., 26: 869.
- 315.- Kraicer, J. (1977) Neuroendocrinology, 24: 226.
- 316.- Kraicer, J., Gajewski, C.T. and Moor, B.C. (1985) Neuroendocrino-
logy, 41: 363.
- 317.- Proulx-Ferland, L., Labrie, F. Dumont, D., Côté, J., Coy, D.H.
and Sueiraf, J. (1982) Science, 217: 62.
- 318.- Saavedra, J.M., Rougeot, C., Culman, J. Israel, A., Niwa, M.,
Tonon, M.C. and Vaudry, H. (1984) Neuroendocrinology, 39: 93.
- 319.- Tilders, F.J.H. (1979) J. Endocrinol., 80: 89.
- 320.- Vermes, I., Mulder, G.H., Smelick, P.G. and Tilders, F.I.G.
(1980) Life Sci., 27: 1761.
- 321.- Kraicer, J. and Morris, A.R. (1976) Neuroendocrinology, 21: 175.
- 322.- Tilders, F.J.H., Berkenbosch, F. and Smelick, P.G. (1980). En:
"Catecholamines and stress". Usdin, E., Kvetnansky, R. and Kopin,

- I.J. (Eds).Elsevier, Amsterdam, pp: 215.
- 323.- Randle, J.C.R., Moor, B.C. and Kraicer, J.A. (1977) *Neuroendocrinology*, 37: 141.
- 324.- Hadley, M.E., Duff Davis, M. and Morgan, C.M. (1977) *Front. Horm. Res. (Basel)*, 4: 94.
- 325.- Schmitt, G., Briaud, B., Miahle, C. and Stutinsky, F. (1979) *Neuroendocrinology*, 18: 297.
- 326.- Bower, A. and Hadley, M.E. (1972) *Gen. Comp. Endocrinol.*, 19: 147.
- 327.- Baker, B.I. (1974) *J. Endocrinol.*, 63: 533.
- 328.- Briaud, B., Koch, B., Lutz-Bucher, B. and Miahle, C. (1980) *Neuroendocrinology*, 30: 262.
- 329.- Briaud, B., Koch, B., Lutz-Bucher, B. and Miahle, C. (1978). *Neuroendocrinology*, 25: 47.
- 330.- Przewlock, R., Holtt, V., Voight, K.H. and Herz, A. (1979) *Life Sci.*, 24: 1601.
- 331.- Howe, A. and Kishore, S.R. (1984) *J. Physiol. Pharmacol.*, 28, N^o 4 283.
- 332.- Thody, A.J., Lever de Vries, C.H. and Tilders, F.C.J. (1980) *Acta Endocrinol.*, 93: 300.
- 333.- White, F.W. (1953) *J. Am. Chem. Soc.*, 75: 503.
- 334.- Allen, B.M. (1916) *Science*, 44: 755.
- 335.- Lerner, A.B. and Lee, H.T. (1955) *J. Amer. Chem. Soc.*, 77: 1066.
- 336.- Li, H.C. (1964) *Nature*, 201: 924.
- 337.- Chrétien, M. and Li, H.C. (1967) *Can. J. Biochem.*, 45: 1163.
- 338.- Moritziary, G.C. and Moritziary, C.M. (1973) *Anat. Rec.*, 175: 393.
- 339.- Dubois, M.P. (1972) *Z. Zellforsch*, 125: 200.
- 340.- Scott, A.P., Lowry, P.J., Ratcliffe, J.G., Rees. L.H. and Landon, J. (1974) *J. Endocrinol.*, 61: 355.
- 341.- Yalow, B.S. and Berson, S.A. (1971) *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 44: 439.

- 342.- Eipper, B.A. and Mains, R.E. (1975). *Biochemistry*, 14: 3836.
- 343.- Lox, B.M., Opheim, K.E., Teschemacher, H. and Goldstein, A. (1975). *Life Sci.*, 16: 1777.
- 344.- Li, C.H. and Chung, D. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73: 1145.
- 345.- Bradbury, A.F., Smyth, D.G. and Snell, C.R. (1976). En: " Polypeptide Hormones: Molecular and cellular aspects". Porter, R. and Fitzsimons, D.W. (Eds) Elsevier: Excerpta Medica. Amsterdam, pp: 61.
- 346.- Roberts, J.L. and Herbert, E. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5300.
- 347.- Mains, R.E. and Eipper, B.A. (1978) *J. Biol. Chem.*, 3: 651.
- 348.- Chretien, M., Benjannet,, Gossard, F., Gianoulakis, C., Crine, P., Lis, M. and Seidah, N.G. (1979) *Can. J. Biochem.*, 57: 1111.
- 349.- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.I., Cohen, S.N. and Numa, S. (1979). *Nature, London*, 278: 423.
- 350.- Hook, V.Y.H. and Loh, P.Y. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2776.
- 351.- Smyth, D.G., Massey, D.E., Zakarians, S. and Finnie, M. (1979) *Nature, London*, 279: 252.
- 352.- Seidah, N.G., Gossard, F., Crine, P., Gianoulakis, C., Routhier, R. and Chrétien, M. (1980) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 343: 443.
- 353.- Gossard, F., Seidah, N.G., Crine, P., Routhier, R. and Chrétien, M. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 1042.
- 354.- Crine, P., Gianoulakis, C., Seidah, N.G., Gossard, F., Pezalla, P.D., Lis, M. and Chrétien, M. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 4719.
- 355.- Crine, P., Gossard, F., Seidah, N.G., Blanchette, L., Lis, M. and Chrétien, M. (1979) *Proc. Natl. Acad. sci. USA*, 76: 5085.
- 356.- Crine, P., Seidah, N.G., Jeanotte, L. and Chretien, M. (1980) *Can. J. Biochem.*, 58: 1318.

- 357.- Estivariz, F.E., Hope, J., Mc Lean, C. and Lowry, P.J. (1980) Biochem. J., 191: 125.
- 358.- Loh, P.Y., Gritsch, A.H. and Chang, T.L. (1982) Peptides, 3: 397.
- 359.- Czichi, U. and Lennarz, W.J. (1977). J. Biol. Chem, 252: 7901.
- 360.- Weber, E., Evans, J.C. and Barachas, J.D. (1981) Biochem Biophys. Res. Commu, 103: 982.
- 361.- Zakarian, S. and Smith, D.G. (1982) Nature, 296: 250.
- 362.- Estivariz, F.E., Gillies, G. (1981) Pharmacol Ther., 13: 61.
- 363.- Vissier, M. and Swaab, D.F. (1979) J. Develop. Physiol., 1: 161.
- 364.- Silman, R.E., Chard, T., Lowry, P.J., Smith, I. and Young, I.M. (1976) Nature, London, 260: 716.
- 365.- Jackson, S. and Lowry, P.J. (1980) J. Endocrinol., 86: 205.
- 366.- Hope, J. and Lowry, P.J. (1981) Front. Horm. Res. (Basel) 8: 44.
- 367.- Hope, J., Estivariz, F.E., Ratter, S., McLoughlin, L., Rees, H.L. and Lowry, P.J. (1980) Hormone Res., 13: 325.
- 368.- Jackson, S. , Salacinski, P., Hope, J. and Lowry, P.J. (1983) Peptides, 4: 431.
- 369.- Vissier, M. and Swaab, D.F. (1977). En:"Melanocyte stimulating hormone: control, chemistry and effects". Tilders, F.J.H., Swaab, D.F. and Wimersma Greidanus, T.B. (Eds) Karger, Basel, pp: 42.
- 370.- Coates, P.J.,Doniach, I., Hale, A. and Rees, L. (1985) J. Endocrinol., 107: 63 (Res.)
- 371.- Lamberts, S.W.J., de Lange, S.A. and Stefanko, S.Z. (1982) J.Clin. Endocrinol. Metab., 54, N^o 2: 286.
- 372.- Lowry, P.J., McMartin, C. and Peters, J. (1973) J. Endocrinol. 59: 43.
- 373.- Silber, R.H., Busch, R.D. and Oslapas, R. (1958) Clin. Chem., 4: 278.
- 374.- Mulder, G.B. and Smelick, P.J. (1977) Endocrinology, 100: 1143.

- 375.- Sternberger, L.A. (1974) En:"Immunocytochemistry".Prentice-Hall, Englewood/Cliffs, N.J. (Ed.)
- 376.- Lowry, D.H., Resenbrough, N.J., Farr. A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol.Chem., 193: 265.
- 377.- Rees,L.H., Cook, D.M., Kendall, J.W., Allen, O.F., Kramer, R.M., Ratcliffe, J.C. and Knight, R.A. (1971) Endocrinology, 89: 254.
- 378.- Ratcliffe, J.C., Knight, R.A., Besser, G.M., Landon, J. and Stansfeld, A.G. (1972) Clin. Endocrin., 1: 27.
- 379.- Carleton, H.M. and Drury, R.A.B. (1957) En:"Histological Technique". Third Edition. Oxford University Press, London.
- 380.- Nakane,, P.K. (1968) J. Histochem. Cytochem., 16: 557.
- 381.- Bargmann, W. and Scharrer, E. (1951). Amer. Scientist, 39: 255.
- 382.- Lison, L. (1976). En:" Estadística aplicada a la biología experimental". Editorial Universitaria de Buenos Aires, 1ª edición.
- 383.- Sokal, R.R.Rohlf, F.J. (1979) Biometría. Editorial Blume, H. Madrid.
- 384.- Sayers, G., Portanova, R., Swallow, R.L. and Malamed, S. (1971) En:"In vitro methods in reproductive cell biology". Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology.
- 385.- Estivariz, F.E. (1977) En:" Estudios sobre ACTH hipofisaria en diversas especies de vertebrados". Tesis.Fac. Cs. Exactas,UNLP.
- 386.- Yasuda, N. and Greer, M.A. (1976) Endocrinology, 98: 936.
- 387.- Loh, P.Y., Li, A., Girtsch, H. and Eskay, L. (1981) Life Sciences, 29: 1599.
- 388.- Douglas, W.W. (1968) Br. J. Pharmacol., 34: 451.
- 389.- Schwizer, R., Schiller, P., Seelings, S. and Sayers, G. (1971) FEBS Lett., 19: 229.
- 390.- Sayers, G. Seelings, S, and Kumar, S. (1975) Steroid. Biochem., 6 371.
- 391.- Mikami, S. (1984) J. Steroid. Biochem. 20: 6B-1563.
-

- 392.- Bläscher, S. (1984) J. Physiol., 59: 423.
- 393.- Starke, K. and Dogherty, J.R. (1980) J. Cardiovasc. Pharmacol., 2: 269.
- 394.- Leclerc, G., Rouot, B., Velly, J. and Schwartz, J. (1981) Trends in Pharmacol. Sci., 1: 18.
- 395.- Hartwig, H.G. (1975). En: "Neurobiologisch Studien an Photoneuroendocrinen Systemen". HABIL. Diss., Justus Liebig Universität Giessen.
- 396.- Hartwig, H.G. and Reinhold, C.H. (1980) Verh. Anat. Ges. 75: Vers.
- 397.- Jones, M.T. and Hillhouse, E.W. (1977) En: "ACTH and related peptides: structure, regulation and action". Krieger, D.T. and Ganong, W.F. (Eds), 297: 536.
- 398.- Hall, R.T. and Chadwich, A. (1984) J. Endocr., 103: 63.
- 399.- Kastin, A.J., Viosca, S. and Schally, A.V. (1974) En: "Handbook of Physiology". American Physiological Society,, Washington, Endocrinology IV, 2: 551.
- 400.- Nicoll, C.S., Fiorindo, R.P., McKenncce, C.T. and Parsons, J.A. (1970) En: "Hypophysiotropic hormones of the hypothalamus: assay and chemistry". Meites, J. (Ed). Williamns and Walkins, Baltimore, pp: 115.
- 401.- Chadwick, A. and Hall, T.R. (1983) En: "Progress in non-mammalian brain research". Nistico, G. and Bolis, L. (Eds) Boca Raton: CRC Press, 3: 79.
- 402.- Scharrer, E. (1959) En: "Comparative Endocrinology". A. Gorbman (Ed) Wiley, New York, pp: 233.
- 403.- Ortmann, R. (1960) En: "Handbook of physiology". Sec. 1, Neurophysiology, American Physiological Society, Washington, D.C., 2:1038.
- 404.- Carsia, R.V., Weber, H., King, D.B. and Scanes, C.G. (1985) Endocrinology, 117, N^o 3: 928.
- 405.- Ghosh, A. (1980) En: "Avian Endocrinology". Epple, A. and Stetson, M. H. (Eds). Academic Press, New York, pp: 271.