

18.886



\* 5 3 0 9 5 5 8 5 6 7 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

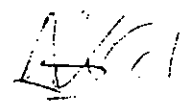
**RESPUESTA DE LAS GONADOTROPINAS AL  
ESTRES: PAPEL DE LAS CATECOLAMINAS  
LA CRH Y LOS OPIOIDES ENDOGENOS**

Tesis presentada por  
Ana Isabel Martín Velasco  
para optar al grado de Doctor

Universidad Complutense de Madrid  
1993

  
Ana Isabel Martín Velasco

V<sup>o</sup>B<sup>a</sup> La Directora,

  
Asunción López-Calderón

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Asunción López-Calderón, directora del presente trabajo, por su gran profesionalidad, por su apreciable ayuda e interés, por su apoyo constante sin el cual no podría haber llevado a cabo este trabajo, así como por iniciarme en la investigación.

A las Dras. M<sup>a</sup> Ignacia González-Quijano, Carmen Ariznavarreta, a Susana Millán y a Lourdes Soto por haber compartido conmigo estos años de trabajo haciéndolos muy agradables, por su amistad y ánimo en todo momento y por su cooperación en la elaboración final de este trabajo.

Al Dr. Jesús Fernández-Tresguerres por sus inestimables sugerencias.

A las Dras. Concha Alvarez y Pilar Rodríguez a Blanca Granados, a Llanos Moreno y a todos mis compañeros del departamento de Fisiología por su amistad y por su colaboración.

A las Dras. Elena Vara y Cruz García por su colaboración al enseñarme la técnica de perfusión, sin la cual no podría haberse llevado a cabo parte de este trabajo.

Al Dr. Javier Fernández, del Departamento de Bioquímica de esta Facultad, por su ayuda en la cuantificación de catecolaminas por HPLC.

A la Dra. Adelina Gamallo de la Facultad de Ciencias Biológicas, por haber desempeñado con tanta amabilidad e interés su papel de tutora.

A Lucila Krauss por su valiosa ayuda técnica.

A la Comunidad de Madrid por la concesión de una beca para la formación de profesional investigador.

A mis padres y hermanos

A Emilio

<b>1.-INTRODUCCION</b> .....	<b>3</b>
<b>1.- EVOLUCION DEL CONCEPTO DE ESTRES</b> .....	<b>3</b>
<b>2.- EFECTOS DEL ESTRES SOBRE EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-ADRENAL.</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.- Respuesta del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal al estrés.</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2.- Factores mediadores de la respuesta del eje adrenal durante el estrés.</b> .....	<b>6</b>
<b>3.- INFLUENCIA DEL ESTRES SOBRE LA REPRODUCCION.</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1.- Estrés agudo.</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2.- Estrés crónico.</b> .....	<b>16</b>
<b>II.- OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>III.- MATERIAL Y METODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>1.- ANIMALES</b> .....	<b>27</b>
<b>1.1.- Condiciones generales.</b> .....	<b>27</b>
<b>1.2.- Procedimiento de estrés.</b> .....	<b>27</b>
<b>1.3.- Obtención de las muestras.</b> .....	<b>28</b>
<b>2.- SOLUCIONES Y DROGAS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.- METODOS ANALÍTICOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1.- Cuantificación de hormonas polipeptídicas por radioinmunoanálisis (RIA) en suero o en tejido hipotalámico.</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2.- Cuantificación de catecolaminas por cromatografía líquida de alta presión (H.P.L.C.).</b> .....	<b>45</b>
<b>4.- DISEÑOS EXPERIMENTALES</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1.- Papel de las catecolaminas en la respuesta de gonadotropinas al estrés agudo.</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2.- Papel de la CRH y opiáceos en la inhibición de la función gonadotropa durante el estrés crónico.</b> ..	<b>50</b>
<b>5.- PERIFUSIONES</b> .....	<b>51</b>
<b>5.1.- Efecto de la CRH y la naloxona sobre la secreción hipotalámica de LHRH <i>in vitro</i>.</b> .....	<b>52</b>
<b>6.- TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
<b>IV.- RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
<b>1.- PAPEL DE LAS CATECOLAMINAS EN LA RESPUESTA DE LAS GONADOTROPINAS AL ESTRES AGUDO.</b> .....	<b>57</b>

1.1.- Efecto de la administración de $\alpha$ -m-p-tyr y DDC. . . . .	57
<b>2.- PAPEL DE LA CRH Y LOS OPIOIDES ENDOGENOS EN LA INHIBICION DE LA FUNCION GONADOTROPA DURANTE EL ESTRES CRONICO. . . . .</b>	<b>70</b>
2.1.- Efecto de la administración central de anticuerpo anti-CRH sobre la respuesta de gonadotropinas y prolactina al estrés crónico. . . . .	70
2.2.- Efecto de la administración de naltrexona. . . . .	81
2.3.- Efecto de la CRH y de la naloxona sobre la secreción hipotalámica de LHRH <i>in vitro</i> . . . . .	91
<b>V.- DISCUSION . . . . .</b>	<b>99</b>
<b>1.- PAPEL DE LAS CATECOLAMINAS EN LA RESPUESTA AL ESTRES AGUDO. . . . .</b>	<b>99</b>
1.1.- Gonadotropinas. . . . .	99
1.2.- Prolactina. . . . .	103
1.3.- Corticosterona . . . . .	106
<b>2.- PAPEL DE LA CRH Y LOS OPIOIDES ENDOGENOS EN LA RESPUESTA AL ESTRES CRÓNICO. . . . .</b>	<b>110</b>
2.1.- Efecto de la administración intracerebroventricular de un antisuero anti-CRH. . . . .	110
2.2.- Efecto de la naltrexona en la respuesta de gonadotropinas al estrés crónico. . . . .	117
2.3. Efecto de la CRH y/o naloxona sobre la secreción hipotalámica de LHRH <i>in vitro</i> . . . . .	121
<b>VI.- CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>129</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFIA . . . . .</b>	<b>133</b>

# ***INTRODUCCION***



## **1.-EVOLUCION DEL CONCEPTO DE ESTRES**

Selye en 1936 intentó sistematizar los conocimientos sobre cómo el organismo responde a las demandas ambientales y a las situaciones a las que no está acostumbrado y que le ponen en situación de "esfuerzo compensatorio". Definió entonces el "síndrome de estrés" en respuesta a una gran diversidad de agentes nocivos que causaban la hipertrofia de la corteza adrenal. Selye denominó estresantes a los estímulos responsables de dicha respuesta. Posteriormente, dicho síndrome se conoció con el nombre de "síndrome general de adaptación" (GAS), caracterizado por las siguientes fases:

- Una reacción de alarma
- Una etapa de adaptación
- Por último una tercera fase de agotamiento, consecuencia

inexorable de una situación de estrés prolongada.

El concepto de GAS desarrollado por Selye implica una respuesta del organismo al estrés estereotipada e inespecífica, independiente del estímulo estresante que lo provoca. Esta simplificación de la respuesta, junto con el descubrimiento de las acciones antiinflamatorias de los glucocorticoides dieron lugar a que el GAS y las enfermedades consecuencia de éste fueran criticadas y olvidadas durante largos años.

Actualmente está establecido claramente que existe una gran variedad de estímulos estresantes, entre los que se incluyen tanto los cambios del medio interno (lesión tisular, hipoglucemia, hemorragia, infección, etc.), como del medio externo (frío, calor, agresión, etc.), alteraciones psicológicas (miedo, rabia, ansiedad, sorpresa, etc) o la combinación de varios estímulos (Seggie y Brown 1982; Murison e Isaksen 1982).

La respuesta hormonal más característica ante cualquier estímulo estresante es la activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal y del sistema simpato-adrenomedular. La respuesta inmediata al estrés se encuentra mediada por el hipotálamo y el sistema nervioso autónomo y como consecuencia de ésta

### *Estrés y gonadotropinas*

se produce un aumento de la frecuencia y de la fuerza de contracción cardíacas, un aumento del flujo sanguíneo en el músculo esquelético, contracción esplácnica con aumento del número de eritrocitos circulantes, aumento de la capacidad respiratoria y dilatación bronquial. Todos estos cambios aseguran la perfusión sanguínea de órganos vitales como el corazón y el cerebro, así como al pulmón y músculo esquelético. Si el estímulo persiste, se ponen en marcha otros sistemas de respuesta a más largo plazo, entre los que destaca el aumento de secreción de glucocorticoides. Estos refuerzan las acciones del sistema nervioso simpático sobre el sistema circulatorio y contribuyen a mantener los niveles de glucosa en sangre ante una situación de emergencia.

En las situaciones de estrés crónico, en las que es de importancia vital la activación adrenal, se produce una disminución de otras funciones tales como el crecimiento somático, la inmunidad y la función reproductora. Por tanto, los procesos fisiológicos que no suponen un beneficio a corto plazo se inhiben. Cuando la intensidad o la duración del estímulo estresante excede ciertos límites, se pueden llegar a producir cambios patológicos como hipertensión, úlceras gástricas y alteraciones neurológicas.

## **2.- EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-ADRENAL.**

### **2.1.-Respuesta del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal al estrés.**

La corteza adrenal libera glucocorticoides en respuesta a una variedad de estímulos estresantes. Este es el último paso de una cascada neuroendocrina que comienza con la percepción por el sistema nervioso central del estímulo estresante y con la activación de la liberación hipotalámica de CRH y otros secretagogos de ACTH. A su vez, éstos estimulan la síntesis de la proopiomelanocortina (POMC) y liberación de ACTH por la hipófisis anterior, a su vez la ACTH estimula la liberación de glucocorticoides por la adrenal (Keller-Wood y Dallman 1984). Son muchas las situaciones estresantes que producen una activación del eje suprarrenal, que se traduce en un incremento en la expresión del mRNA de la CRH en el núcleo paraventricular, en el mRNA de la

POMC en la hipófisis anterior, y en un incremento de las concentraciones circulantes de ACTH y corticosterona (Holt y cols 1986; Shiomi y cols 1986; Lightman y Young 1988; Harbuz y Lightman 1989). Esta activación se superpone a las demás regulaciones del eje, es decir, al ritmo circadiano e incluso a la retroalimentación negativa ejercida por los glucocorticoides (Dallman y Jones 1973). A este respecto se ha observado que tanto en animales adrenalectomizados, como en aquellos tratados crónicamente con glucocorticoides, el estrés agudo es capaz de evocar un aumento del mRNA de la CRH (Lightman y Young 1989; Harbuz y cols 1990).

El estrés físico, ya sea inducido por la inhalación de éter (Fenske y cols 1980; Wilkinson y cols 1981), por la inyección de formol (Linton y cols 1985), por la aplicación de calor (Weindenfeld y cols 1980; Bruni y cols 1982) o por la cirugía (Engeland y cols 1977; Fujieda y Hiroshige 1978) produce un aumento de las concentraciones plasmáticas de glucocorticoides y ACTH. Igualmente las situaciones de estrés emocional como la inmovilización (Taché y cols 1976; Tapp y cols 1981; Gibson y Krieger 1981; Armario y Castellanos 1984; Kant y cols 1986), choques eléctricos (Wade 1984; Przelop y cols 1985), encierro (Kalin y cols 1985a) o la exposición a una situación desconocida (File y Peet 1980), tienen también como resultado un incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona y ACTH.

Los estímulos emocionales, como pueden ser la ansiedad experimentada por los soldados durante la simulación de un combate (Rose y Sachar 1981), o por los pacientes durante los preparativos preoperatorios (Parker y cols 1985), o la ansiedad experimentada por los estudiantes durante los exámenes (Frankenhauser y cols 1978) producen también una activación del eje suprarrenal. Aunque el grado de ansiedad o malestar experimentado es muy dependiente de la propia personalidad del individuo, se ha observado una buena correlación entre el grado de ansiedad y el aumento de cortisol plasmático. La novedad y lo imprevisible de la situación es un factor muy importante en el grado de la respuesta.

Las ratas expuestas crónicamente a un estrés, en algunas

## *Estrés y gonadotropinas*

ocasiones responden a la imposición de otro estímulo estresante diferente con un incremento mayor de los niveles plasmáticos de ACTH que aquellos detectados durante el primer tipo de estrés. La exposición repetida durante cortos períodos de tiempo al mismo estímulo estresante a menudo resulta en un aumento de la respuesta hipofisaria a lo largo del tiempo (Le Mevel y cols 1979; Vernikos y cols 1982). Estos resultados parecen sugerir que la respuesta a un segundo estímulo podría estar facilitada por la exposición previa a otro estímulo estresante, lo cual sugiere que el eje adrenal de estos animales está en pleno funcionamiento o incluso hiperactivo.

### **2.2.-Factores mediadores de la respuesta del eje adrenal durante el estrés.**

La activación del sistema hipotálamo-hipófiso-adrenal parece estar mediada fundamentalmente por la activación de neuronas hipotalámicas que contienen CRH y vasopresina en la región del núcleo paraventricular (Makara 1985). Desde el aislamiento y caracterización por Vale y cols de la CRH han sido muchos los estudios que han demostrado que este péptido es el principal regulador fisiológico de la liberación de ACTH (Vale y cols 1981; Gibbs y Vale 1982; Vale y cols 1983b, Plotsky y Vale 1984). La administración intraventricular de CRH induce una serie de cambios comportamentales, viscerales y neuroendocrinos que mimetizan la reacción del organismo ante una situación de estrés (Brown y cols 1982, Sutton y cols 1982; Tache y cols 1983; Vale y cols 1983a). Se ha propuesto por lo tanto, que este péptido podría jugar un papel importante como integrador en el sistema nervioso central de la respuesta al estrés (Rivier y Vale 1985b).

La inmunoneutralización de la CRH bloquea la respuesta de cortisol y ACTH a la inmovilización y a la hipoglucemia insulínica (Guillaume y cols 1992), así como la inyección de formol (Linton y cols 1985) y atenúa la respuesta de ACTH al éter (Rivier y Vale 1983). Dado que el bloqueo de la respuesta no es siempre completo, estos autores sugieren que además de la CRH, deben existir otros factores implicados en la hipersecreción de ACTH que tiene lugar durante el estrés.

Gillies y Lowry (1979) reintrodujeron la idea de que la vasopresina era un importante factor controlador de la secreción adrenal, e incluso sugirieron que la CRH era la vasopresina, cuya acción era modulada por otros factores hipotalámicos. Con la disponibilidad de la CRH quedó claro que en la mayor parte de las situaciones experimentales ambas se potencian (Antoni, Holmes y Jones 1983), pero que son dos péptidos distintos. Tanto la CRH como la vasopresina están en el sistema porta hipofisario en una concentración efectiva (Gibbs y Vale 1982) y la utilización simultánea de un antagonista de la vasopresina y un anticuerpo anti-CRH abole la liberación de ACTH inducida por el estrés por éter (Rivier y Vale 1983). En la oveja, al contrario de lo que ocurre en la rata, la CRH es menos efectiva que la vasopresina en la estimulación de la ACTH aunque, administradas conjuntamente, potencia el efecto estimulante de la vasopresina (Familiari y cols 1989). A este respecto Guillaume y cols (1992) postulan que en la oveja la inmunoneutralización crónica de la CRH endógena produce una reducción significativa de los receptores hipofisarios de la vasopresina, lo que sugiere que la CRH posiblemente lo que haga sea regular el número de receptores hipofisarios a esta hormona (Shen y cols 1990).

Igualmente se ha sugerido un papel a la oxitocina en la respuesta del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal al estrés. La oxitocina parece ser un agonista de los receptores de vasopresina hipofisarios de la rata, pero es aproximadamente diez veces menos efectiva que ésta (Antoni, Holmes y Jones 1983). La inmunoneutralización de oxitocina atenúa la respuesta de ACTH al estrés producida al manejar los animales por la cola, lo cual puede sugerir que esta hormona juega un papel fisiológico en el control de la secreción de ACTH (Gibbs 1984). Durante el estrés por hemorragia (Plotsky, Bruhn, Vale 1985) y por hipotermia (Gibbs 1986), los niveles plasmáticos portales de oxitocina cambian paralelamente con los niveles plasmáticos de ACTH (Plotsky, Bruhn y Vale 1985b). Los niveles plasmáticos de oxitocina periféricos están a su vez incrementados en una gran variedad de situaciones estresantes incluyendo la inmovilización (Lang y cols 1983, Gibbs 1984), la natación (Lang y cols 1983), y el éter (Gibbs 1984).

## *Estrés y gonadotropinas*

Los datos referentes al papel de las catecolaminas en la respuesta de ACTH y corticosterona al estrés no son del todo claros. Una gran variedad de situaciones estresantes causan un aumento de la actividad del sistema nervioso simpático y la médula adrenal. Este aumento de la actividad resulta en una descarga de adrenalina y noradrenalina al torrente sanguíneo, junto con cambios en la actividad de enzimas implicadas en la síntesis de catecolaminas y en las concentraciones de noradrenalina y adrenalina en el cerebro.

Durante el estrés se produce un incremento de las concentraciones plasmáticas de catecolaminas. La clorisondamina, un bloqueante ganglionar, ha sido empleada para prevenir la liberación de catecolaminas durante el estrés. Su administración junto con la de anti-CRH o la ablación del sistema hipotálamo-infundibular, puede suprimir la respuesta de ACTH y corticosterona al estrés (Rivier y Vale 1983; Bruhn y cols 1984). Sin embargo otros autores sugieren que en condiciones normales las catecolaminas plasmáticas endógenas no contribuyen apreciablemente a la respuesta del eje adrenal a la inmovilización (Makara y cols 1986; Ariznavarreta y cols 1989).

Como principales inhibidores de la respuesta adrenal al estrés nos encontramos con los glucocorticoides, puesto que ejercen una retroinhibición negativa sobre la secreción de ACTH y CRH. A este respecto se ha descrito que la dexametasona previene el incremento de CRH en el sistema porta hipofisario inducido por la hemorragia (Plotsky y Vale 1984). El efecto supresor de los glucocorticoides en la hipófisis durante el estrés prolongado ha sido demostrado también en experimentos en los que se practicó una segunda laparotomía a ratas adrenalectomizadas, al día siguiente al primer estrés quirúrgico, y tuvieron un aumento de los niveles plasmáticos de ACTH mayor que el de los animales con la operación simulada (Keller-Wood y Dallman 1984). Igualmente, la respuesta de ACTH a la inyección de CRH, tras la aplicación durante varias horas de choques eléctricos, es de mayor magnitud en animales adrenalectomizados que en intactos (Rivier y Vale 1987). Sin embargo, la ausencia de glucocorticoides no previene la disminución de ACTH que tiene lugar tras una larga exposición a choques eléctricos (Rivier y Vale 1984) ni la disminución del mRNA de la CRH en el núcleo paraventricular, ni la liberación

de CRH al sistema porta hipofisario que se produce en respuesta a la artritis crónica (Harbuz y cols 1992). Estos últimos resultados indicarían que la retroinhibición de los esteroides adrenales no es el único factor responsable de este fenómeno.

### **3.- INFLUENCIA DEL ESTRES SOBRE LA REPRODUCCION.**

Ya Selye en 1936 propuso que el estrés, además de estimular el sistema adrenocortical, inhibe la función reproductora. El estrés crónico causa atrofia gonadal y reduce la actividad sexual, tanto en hembras como en machos, en la mayor parte de las especies investigadas (Madan y Johnson 1973; Selye 1976; Eberhart y cols 1980; Sapolsky 1988).

El estrés puede afectar al eje gonadal en cualquier período de la vida. Durante la etapa fetal se ha podido observar que los fetos macho de ratas estresadas durante la última semana de su gestación, carecen del pico de testosterona que se produce en los días 8 y 19 postconcepción (Ward y Weisz, 1980). Esto se traduce en que dichos animales cuando son adultos presentan anomalías en el comportamiento copulador y una tendencia aumentada a exhibir un comportamiento de lordosis femenino, lo cual parece ser debido a alteraciones en la masculinización del sistema nervioso (Ward 1972; Rhees y Fleming 1981). Igualmente la exposición prenatal de fetos hembras a ambientes estresantes en el día 14 de gestación produce un alargamiento de la etapa estro-metaestro en los animales adultos lo cual resulta en una alteración del ciclo estral (Herrenkohl, Politeh 1978).

No es sorprendente que los distintos tipos de estrés puedan interferir en el delicado y complejo balance de factores hormonales y no hormonales que se producen durante la pubertad. En general, el estrés durante esta etapa de la vida produce un retraso de la pubertad y reducción de la fertilidad en el animal adulto (Paris, Ramaley 1974; Sieck y Ramaley 1975).

### *Estrés y gonadotropinas*

En la edad adulta se ha observado que el aumento de la densidad de población en los roedores (Christian y cols 1965; Nowell 1980) tienen un efecto deletéreo en la función gonadal produciendo un descenso del peso de los testículos y órganos sexuales accesorios. En las hembras los efectos sobre el ciclo y la atrofia ovárica son muy evidentes en todas las especies estudiadas. Por ejemplo, es frecuente observar amenorrea secundaria en bailarinas de ballet expuestas a ejercicio intenso y a una gran pérdida de peso (Frisch, Wyshak y Vinault 1980; Warren 1980).

La secreción de LH se modifica tanto por el estrés agudo como por el estrés crónico. El estrés crónico o repetido tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de LH (Gray y cols 1978; Tache y cols 1978). Por el contrario, los estudios sobre el estrés agudo en las ratas han producido una mayor diversidad de respuestas de LH, desde un efecto inhibitorio (Blake 1975), estimulador (Ajika y cols 1972; Euker, Meites y Riegle 1975) o bifásico (Collu, Tache y Ducharme 1979; Krulich y cols 1974) e incluso ningún cambio (Collu, DuRuisseau y Tache 1979b; Tache, Brown y Collu 1979). Estas discrepancias parecen deberse al hecho de haber utilizado animales intactos en unos casos y en otros gonadectomizados, ya que la castración bloquea el efecto estimulante del estrés agudo sobre la secreción de LH (López-Calderón y cols 1992).

Los efectos del estrés sobre la secreción de FSH son menos marcados. Durante el estrés agudo algunos autores han observado elevaciones de los niveles plasmáticos de FSH, si bien menores que las elevaciones de los niveles plasmáticos de LH (Krulich y cols 1974), además de producirse más lentamente. Asimismo durante el estrés crónico, la respuesta de FSH es menos notable que la de LH, aunque también se ha observado un descenso de los niveles de dicha hormona en ratas inmovilizadas intermitentemente durante cuatro días (López-Calderón y cols 1987) o tras dos días de ayuno (Howland y cols 1974).

Al igual que ocurre con las gonadotropinas, la testosterona tiene una respuesta bifásica al estrés. Tras varias formas de estrés agudo se produce un aumento de los niveles de esta hormona (Coe y cols 1978; Armario y

Castellanos 1984), mientras que se produce una disminución marcada de sus niveles como consecuencia de alguna formas de estrés crónico, físico como la cirugía (Gray y cols 1978), la inanición (Dyer y cols 1985), o el estrés emocional (Tache y cols 1980). Esta respuesta bifásica podría correlacionarse con las distintas fases del GAS descrito por Selye. El aumento de testosterona se produciría durante la reacción de alarma y sería el responsable de un aumento de la agresividad que se produce ante lo desconocido. La fase de adaptación llevaría consigo una disminución de los niveles de esta hormona, para posteriormente producirse una etapa de agotamiento consecuencia de la prolongación excesiva del período de estrés. En relación con el papel de la testosterona en la agresividad Rose, Bernstein y Gordon en 1975 observaron que existe diferencia en la respuesta de esta hormona en los babuinos salvajes. Los machos dominantes muestran un aumento en los niveles de testosterona ante situaciones estresantes y los subordinados en cambio una reducción de los niveles de la misma.

El aumento de la secreción de testosterona durante el estrés agudo está precedido por un aumento de la secreción hipofisaria de LH y un descenso del contenido hipotalámico de LHRH, existiendo una correlación inversa entre los niveles plasmáticos de LH y el contenido hipotalámico de LHRH (López-Calderón y cols 1990). El estrés crónico inhibe la secreción de testosterona, descenso que se acompaña de una disminución de la secreción de LH (Gray y cols 1978). El descenso de la secreción hipofisaria de gonadotropinas durante el estrés crónico no parece deberse a una alteración a nivel hipofisario, puesto que los animales estresados crónicamente responden igual o incluso más que los controles a la estimulación con LHRH exógena (Collu, Tache y Ducharme 1979; Tache y cols 1980; López-Calderón y cols 1990). Todos estos datos nos indican que la alteración de la función gonadal inducida por el estrés es secundaria a modificaciones en la secreción hipotalámica de LHRH.

¿Qué factores están implicados en dichas modificaciones?. Puesto que la respuesta de gonadotropinas y de testosterona al estrés es bifásica, parece lógico pensar que durante la primera etapa de aumento intervengan una

### *Estrés y gonadotropinas*

serie de factores nerviosos y endocrinos que pasan a ser relevados por otros inhibidores, cuando la situación de estrés se prolonga y se inhibe la función gonadal.

Vamos a analizar también la respuesta de prolactina al estrés por tratarse de una hormona muy relacionada con la función reproductora. Tanto el estrés de tipo físico como psicológico es capaz de influir en la secreción de prolactina en el ser humano (Cohen y cols 1980; Shangold y cols 1981; Arnetz y cols 1984) y en otros animales de experimentación (Neill 1970; Seggie y Brown 1975; Matt y cols 1984).

Al igual que ocurre con las gonadotropinas la respuesta al estrés de esta hormona es bifásica, aumenta durante los primeros minutos de estrés, para disminuir significativamente cuando dicha situación se prolonga (Reigle y Meites 1976; Kawakami, Higuchi y Matsuura 1979; López-Calderón y cols 1989).

#### **3.1- Estrés agudo.**

Dentro de los factores implicados en el aumento de la secreción de gonadotropinas durante estrés agudo se han sugerido las catecolaminas centrales. No solo las catecolaminas liberadas al torrente sanguíneo se modifican en respuesta al estrés, si no que también se alteran las centrales. Los terminales noradrenérgicos están ampliamente distribuidos en muchas zonas del cerebro incluyendo el córtex cerebral y el sistema límbico. Proceden de agrupamientos de neuronas situados en el tallo cerebral y proyectan sus axones al prosencéfalo, así como a las fibras caudales de la médula espinal (Everitt, Herbert y Keverne 1983). Se sabe que el estrés incrementa la actividad intracerebral del sistema noradrenérgico (Weiss y cols 1979; Plotsky, Cunningham y Widmaier 1989). Las catecolaminas centrales parecen incrementar también la respuesta agresiva ante el enfrentamiento con otro sujeto (Wislow y Miczek 1983).

La ansiedad y la depresión están asociadas con una hiperactividad del sistema noradrenérgico central (Charney y Redmond 1983). La yohimbina, droga que incrementa la actividad adrenérgica central induce ansiedad en el hombre (Charney, Heninger y Redmond 1983). La activación experimental del locus coeruleus, grupo de neuronas noradrenérgicas que inervan la corteza, pueden reproducir muchos de los signos comportamentales y somáticos de ansiedad. Una de las consecuencias de la amplia distribución de la noradrenalina en el cerebro es que puede afectar la actividad de muchas estructuras cerebrales, incluido el hipotálamo, modificando así la secreción de la hipófisis (Lightman y Everitt 1986).

Diversos tipos de estrés producen una activación del sistema noradrenérgico central. Tal es el caso de la inmovilización (Corrodi, Fuxe y Hökfelt 1968; Kvetnansky y cols 1977; Saavedra, Kvetnansky y Kopin 1979; Tanaka y cols 1981), los choque eléctricos (Bliss, Ailion y Zwanzinger 1968; Korf, Aghajanian y Roth 1973), la inhalación de éter (Hedge, Van Ree y Versteeg 1976; Johnston, Spinedi y Negro-Vilar 1985; Mermet y Ganon 1988) y la hipoglucemia insulínica (Sauter y cols 1983; Smythe y cols 1984). Hay que tener en cuenta que el hipotálamo contiene una concentración alta de norepinefrina y dopamina (Palkovits y cols 1974). Las neuronas dopaminérgicas se localizan en el hipotálamo mediobasal, en el núcleo arcuato y en el núcleo paraventricular inervando la eminencia media y otros núcleos hipotalámicos (Fuxe 1965, Jonsson y cols 1972; Björklund y Nobin 1973).

Las catecolaminas se encuentran en el tallo cerebral en las neuronas que se proyectan rostralmente a nivel hipotalámico, en las aferencias terminales del núcleo paraventricular, arcuato e hipotálamo posterolateral (Mancia 1985). Debido a esta amplia distribución parece lógico pensar que no todas las neuronas catecolaminérgicas se activen en respuesta al estrés si no sólo algunas de estas estructuras. En este sentido Palkovits y cols en 1975 ya describieron para tres procedimientos distintos de estrés (inmovilización, exposición al frío e inyección de formalina) la reducción en el contenido hipotalámico de noradrenalina y dopamina, reflejo de un aumento de su liberación, en el núcleo arcuato pero no en otros núcleos hipotalámicos, en la

### *Estrés y gonadotropinas*

corteza cerebral, en el núcleo caudal o en la sustancia nigra. Al igual que se produce una activación sólo de algunas estructuras, esta activación es secuencial en el tiempo (Tanaka y cols 1982, Lachuer y cols 1991).

Algunos autores (Stone y McCarty 1983, Glavin 1985) han observado que el estrés crónico produce un incremento compensador en la síntesis de noradrenalina también en algunas zonas del cerebro. Este incremento en los niveles de este neurotransmisor puede ser un proceso adaptativo encaminado a prevenir la deplección de este neurotransmisor como resultado de su alta utilización tras la exposición a estímulos estresantes.

Las primeras observaciones que indicaban que las catecolaminas podían modificar la secreción de gonadotropinas fueron publicadas por Sawyer y cols en 1952. Desde entonces, numerosos estudios han confirmado este hecho en roedores (Ramirez, Feder y Sawyer 1984; Kalra 1985) y en primates (Bhattacharya y cols 1972; Kaufman y cols 1985).

La inyección de noradrenalina en el tercer ventrículo en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos y progesterona incrementa la secreción de LH de una forma dosis-dependiente (Krieg y Sawyer 1976; Vijayan y McCann 1978). La manipulación de forma aguda de los receptores adrenérgicos en el área preóptica influye en la actividad de las neuronas LHRHérgicas que controlan las concentraciones plasmáticas de LH (Jarry y cols 1990; Leipheimer y Gallo 1985). También en los machos la noradrenalina parece jugar un papel estimulador. La inhibición de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa bloquea el incremento de LH que se produce tras la castración en ratas adultas (Ojeda y McCann 1973) y en ratas inmaduras (Cocchi y cols 1974).

Existen menos estudios sobre el papel de la noradrenalina en la regulación de la LH en los primates. La administración sistémica de clonidina, agonista  $\alpha$ -adrenérgico, no parece tener ningún efecto sobre la secreción de LH en humanos (Lal y cols 1975). Por otro lado, el aislamiento quirúrgico del hipotálamo mediobasal en monos no bloquea la liberación episódica de LH (Knobil 1974), si este procedimiento en monos interrumpe los axones de la

mayoría de las neuronas noradrenérgicas al igual que produce en la rata, estos resultados indican que no es necesaria la presencia noradrenérgica para inducir la liberación episódica de LH. La regulación de la secreción de LH por tanto, parece ser diferente en primates, donde existen pocas evidencias de que la noradrenalina juegue un papel en el pico preovulatorio de LH.

Mientras que la inervación adrenérgica parece ser estimuladora de la liberación de LH y presumiblemente de LHRH, el papel de la dopamina en el control de la secreción de LH está menos claro. Algunos agonistas dopaminérgicos se han descrito tanto como inhibidores de la liberación de LH (Judd, Rigg y Yen 1979; Kletzky y Shangold 1986) como estimuladores (Vijayan y McCann 1978; Kaufman y cols 1985).

### **3.2.- Estrés crónico.**

La hipótesis de una interacción entre el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal y el gonadal surgió para explicar la relación antagónica existente entre la hiperfunción adrenal y la capacidad reproductora. Ya Selye en 1946, sugirió que las ratas estresadas crónicamente presentaban una activación de la secreción de la corteza adrenal consecuencia de un aumento de la secreción hipofisaria de ACTH, a expensas de la disminución de otras hormonas, entre ellas las gonadotropinas.

En los animales estresados crónicamente se observa una correlación positiva entre la hipertrofia adrenal y el grado de afectación testicular. Además, la administración crónica de ACTH tiene efectos similares al estrés crónico sobre el testículo (Christian, Lloyd y Davis 1965). El hipercortisolismo va acompañado de una disfunción reproductora en humanos, y se ha observado una disminución de la respuesta a la LHRH exógena en mujeres aquejadas de la enfermedad de Cushing (Boccuzzi y cols 1975) y en mujeres tratadas clínicamente con glucocorticoides (Sakakura, Tekebe y Nakagawa 1975).

El mecanismo concreto por el que esta hiperactividad del eje

## *Estrés y gonadotropinas*

hipotálamo-hipófiso-adrenal inhibe el proceso reproductor ha sido motivo de muchos estudios. Se plantean varias posibilidades para explicar este hecho: que los glucocorticoides inhiban la secreción de gonadotropinas, que lo haga la ACTH o bien que otras hormonas liberadas durante el estrés, CRH o los opioides endógenos inhiban a nivel central la secreción de LHRH.

### 3.2.1. Efecto de la ACTH y los glucocorticoides sobre la función gonadal.

La administración crónica de ACTH produce un descenso de la testosterona plasmática (Beitins y cols 1973; Johnson, Welsh y Juniewicz 1982; Mann y cols 1987), efecto que requiere la presencia de la adrenal intacta, lo que indica que la acción inhibidora de la ACTH en los animales intactos no se debe a la ACTH *per se*, sino que está mediada por algún esteroide adrenal (Weber y cols 1983; Vreeburg y cols 1984; Mann y cols 1987). Además, en estudios *in vitro* se ha visto que la ACTH no modifica la secreción de testosterona en cultivos de células de Leydig (Aznar y cols 1978).

Los glucocorticoides disminuyen tanto la secreción basal de testosterona, como la respuesta de esta hormona a la estimulación con hCG exógena (Bambino y Hsueh 1981). La acción inhibidora de los glucocorticoides sobre la secreción de testosterona se ha podido comprobar también *in vitro* (Welsh, Bambino y Hsueh 1982; Hales y Payne 1989), lo que confirma su acción a nivel testicular. En el testículo los glucocorticoides actúan sobre receptores específicos en la célula de Leydig (Welsh, Bambino y Hsueh 1982). Los glucocorticoides parecen inhibir la síntesis de testosterona actuando tanto a nivel anterior como posterior a la generación de AMP-c, haciendo a las células de Leydig refractarias a la estimulación de las gonadotropinas y bloqueando la estereidogénesis (Charpenet y cols 1982, Hales y Payne 1989).

Los datos existentes en la literatura acerca de las acciones de los glucocorticoides sobre la secreción de gonadotropinas no son del todo concluyentes, pues se han descrito desde acciones inhibidoras hasta claramente estimulantes (Ringstron y Schwartz 1985; Suter y Orosz 1989). Además

algunos autores no han encontrado ninguna modificación de la secreción basal de LH, ni en la respuesta a LHRH, tanto tras la administración de glucocorticoides como en pacientes afectados de síndrome de Cushing (Charro y cols 1979). En contrapartida a estos resultados varios autores han observado que los glucocorticoides disminuyen la respuesta de LH a la LHRH en machos de varias especies (Chantaraprateep y Thibier 1979; Malak y Thibier 1982). Sin embargo también se ha visto que la administración aguda de cortisol puede aumentar la respuesta de LH a la LHRH en (Liptrap y Raeside 1983). El cortisol incrementa la liberación de LH y FSH en incubaciones de hipófisis (Suter y Orosz 1989) y los glucocorticoides parecen estimular también la secreción de FSH *in vivo* (López-Calderón y Tresguerres 1982).

Aunque la administración exógena de glucocorticoides no tenga una acción muy clara sobre la secreción basal de LH en el macho adulto, cabría la posibilidad de que el aumento de glucocorticoides endógenos de manera crónica sí fuera capaz de ejercer un efecto inhibitor sobre la secreción hipofisaria de gonadotropinas. Sin embargo, la supresión de los niveles endógenos de glucocorticoides mediante adrenalectomía (Gray y cols 1978, Tache y cols 1980) o químicamente mediante la administración de metopirona, no sólo no bloquea el efecto inhibitor del estrés sobre la secreción de LH y FSH sino que parece potenciar dicho efecto (López-Calderón y cols 1987). Tampoco en primates la metopirona modifica el descenso de LH producido por el estrés psicológico (Sapolsky y Krey 1988).

Otra posibilidad sería que los glucocorticoides actuarán a nivel suprahipofisario, ya que los implantes de dexametasona a nivel del área preóptica medial son tan eficaces como las inyecciones sistémicas de dicha droga para bloquear la ovulación en ratas (Hagino, Watanabe y Goldzieher 1969). Los implantes de cortisol en el hipotálamo-medio basal en ratas inmaduras retrasa la maduración sexual e impide la ovulación (Smith y cols 1971).

En cuanto al papel de la glándula adrenal sobre la inhibición de la secreción de PRL se ha observado que la adrenalectomía bloquea totalmente el

### *Estrés y gonadotropinas*

efecto inhibitor del estrés crónico sobre la secreción de PRL, siendo este efecto dependiente de la corteza adrenal, puesto que la eliminación selectiva de la médula adrenal no bloquea el efecto del estrés crónico (López-Calderón y cols 1989). Además el tratamiento de ratas adrenalectomizadas con dexametasona revierte el efecto del estrés crónico sobre la secreción de PRL (López-Calderón y cols 1989). Los glucocorticoides inhiben la secreción basal de PRL tanto *in vivo* como *in vitro* (Leung y cols 1980. López-Calderón, Esquifino, y Tresguerres 1984). Este efecto parece ser debido a que los glucocorticoides, actuando a nivel de receptores específicos en las células lactotropas, inhiben la expresión del gen que codifica para la PRL (Sakai y cols 1988).

El hecho de que la adrenalectomía y la metopirona potencien el efecto inhibitor del estrés, nos lleva a pensar que la disminución de gonadotropinas durante el estrés crónico se debe a factores hipotalámicos o hipofisarios implicados en el control del eje adrenal. En este sentido la administración de dexametasona, revierte totalmente el efecto inhibitor del estrés crónico sobre la secreción hipofisaria de LH y FSH (López-Calderón y cols 1992), lo cual indica que el efecto inhibitor del estrés sobre la secreción de gonadotropinas reside en un componente del eje adrenal superior, y puesto que como hemos mencionado no se trata de la ACTH, estudiaremos en más detalle el papel de la CRH hipotalámica y la  $\beta$ -endorfina.

#### 3.2.2. Acción de la CRH sobre el eje gonadal.

El tratamiento crónico, por vía subcutánea, con CRH, a la vez que estimula la producción de ACTH y corticosterona, inhibe la secreción de LH, efecto que se bloquea por la adrenalectomía (Rivier y Vale 1985a). Sin embargo la CRH puede tener intrínsecamente una acción inhibitor de la secreción de gonadotropinas, independientemente de su efecto estimulante sobre el eje adrenal. La administración intracerebroventricular de dicho péptido inhibe la secreción de LH (Rivier y Vale 1984; Ono y cols 1984; McCann 1986), bloquea la ovulación y altera el embarazo, efectos que no se inhiben por la adrenalectomía (Rivier y Vale 1984).

El testículo de varias especies animales sintetiza CRH (Thompson, Seasholtz y Herbert 1987) y algunos autores han observado que ejerce en él un papel antirreproductor, actuando de un modo autocrino (Ulisse, Fabbri y Dufau 1989; Fabbri, Tinajero y Dufau 1990; Ulisse y cols 1990). Es poco probable que sea éste el mecanismo mediante el cual se inhiba la función gonadal durante el estrés sino que posiblemente se trate de un mecanismo de control autocrino de la función testicular.

Se ha sugerido que la CRH podría inhibir la secreción de LH actuando directamente a nivel hipofisario, puesto que la CRH es capaz de reducir la liberación basal de LH en cultivos de células hipofisarias (Blank y cols 1986). Sin embargo, todos los demás datos existentes en la literatura indican que la CRH actúa a nivel hipotalámico disminuyendo la liberación de LHRH. La microinyección de CRH en la sustancia central gris del mesencéfalo inhibe el comportamiento de lordosis mediado por la LHRH (Sirinathsinghji y cols 1983; Sirinathsinghji 1985), y la inyección de CRH en el tercer ventrículo produce una marcada reducción en la concentración de LHRH en la sangre portal (Petraglia y cols 1987).

La CRH podría actuar a nivel hipotalámico, inhibiendo la liberación de LHRH desde las terminales axónicas de la eminencia media, puesto que en esta región no sólo hay una concentración alta de CRH, sino existen también receptores para ella (Swanson y cols 1983; De Souza y cols 1984). Esta hipótesis ha sido confirmada utilizando fragmentos de eminencia media, en los que se observó que la CRH inhibe tanto la liberación basal de LHRH como su respuesta al potasio, efecto que se revierte por un antagonista de la CRH (Gambacciani y cols 1986, Yen y Rasmussen 1986).

El hecho de que la CRH inhiba la acción estimulante del potasio y de que la CRH actúe principalmente como excitador de la actividad neuronal en el cerebro (Siggins y cols 1985), ha llevado a postular a Almeida, Nikolarakis y Herz (1988), que el efecto de la CRH sobre la LHRH está mediado vía otros neurotransmisores inhibidores.

### *Estrés y gonadotropinas*

En el hipotálamo perfundido, la CRH estimula la liberación de  $\beta$ -endorfina y dinorfina mientras que disminuye la de LHRH (Nikolarakis y cols 1986a y 1986b) y la administración de un antagonista de la CRH tiene el efecto contrario, aumenta la secreción de LHRH mientras que disminuye la de  $\beta$ -endorfina, dinorfina y met-enkefalina hipotalámicas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Nikolarakis y cols 1988). Igualmente se ha descrito que ciertos agonistas opiáceos pueden bloquear el efecto inhibitorio de la CRH sobre la secreción de LH (Barbarino y cols 1989, Petraglia y cols 1987, Olster y Ferin 1987).

#### 3.2.3. Acciones de los opioides endógenos sobre el eje reproductor.

Las endorfinas ( $\beta$ -endorfina,  $\alpha$ -endorfina y las enkefalinas) son fragmentos de la  $\beta$ -lipotropina (Lehmann, Vascivan Nair, Kline 1979, Adler 1980). Esta hormona polipeptídica hipofisaria forma parte a su vez de la POMC que contiene también en su secuencia la ACTH (Mains, Eipper, Ling 1977). La  $\beta$ -endorfina y la ACTH están en los mismos gránulos secretorios en el lóbulo anterior, en el lóbulo intermedio, siendo la  $\beta$ -endorfina liberada en este lóbulo es acetilada (Smyth y Zacarian 1980; Seizinger y Holt 1980; Weber, Evans y Barchas 1981) y en el cerebro (Civelli, Birnberg y Herbert 1982; Gee y cols 1983). Ambos polipéptidos se liberan simultáneamente desde la hipófisis y aumentan sus concentraciones plasmáticas en respuesta a varios tipos de estrés (Guillemin y cols 1977; Baizman y cols 1979). Las enkefalinas se liberan también en el cerebro en respuesta al estrés (Maden y cols 1977). Las endorfinas ejercen potentes efectos en el sistema nervioso central y parecen jugar un papel importante en la regulación de multitud de procesos, incluyendo la percepción del dolor y la analgesia, el control hipofisario de la función reproductora, las reacciones afectivas a diferentes agentes estresantes como los choques eléctricos, inmovilización, ruido, frío, daño físico, aislamiento y agresión (Amir, Brown y Amit 1980; DeWied y Jolles 1982; McQueen 1983; Gindoff y Ferin 1987a).

En cuanto a los niveles plasmáticos de  $\beta$ -endorfina durante el estrés crónico, parecen estar aumentados durante distintas situaciones de

estrés prolongado. La inmovilización durante 4 días produce un aumento de las concentraciones séricas de  $\beta$ -endorfina (López-Calderón, Ariznavarreta y Chen 1991). Otros autores han descrito igualmente que la aplicación crónica, intermitente de choques eléctricos provoca una gran elevación de las formas acetiladas y no acetiladas de  $\beta$ -endorfina (Akil, Shiomi y Matthews 1985).

En lo que se refiere a la respuesta de  $\beta$ -endorfina hipofisaria al estrés crónico hay que distinguir entre el lóbulo anterior y el neurointermedio. El estrés crónico inducido por natación durante 30 minutos 14 días produce un aumento en los niveles de  $\beta$ -endorfina acetilada (Young 1990). Igualmente, Akil, Shiomi y Matthews (1985) utilizando choques eléctricos como agente estresante observan un incremento de la secreción de  $\beta$ -endorfina por el lóbulo neurointermedio. Otros tipos de estrés, por ejemplo, el ayuno y la anorexia inducida por la administración crónica de fenfluramina, evocan cambios similares a los producidos por los choques eléctricos (Majeed y cols 1986; Przewlocki y cols 1983). Curiosamente, los niveles del mRNA de la POMC aumentan ligeramente en el lóbulo anterior y no en el neurointermedio tras repetidas sesiones de choques eléctricos (Höllt y cols 1986; Shiomi y Akil 1982), lo cual indica que existe una activación selectiva de la síntesis de la POMC en el lóbulo anterior.

Con algunas excepciones (Piva y cols 1987), la mayor parte de los estudios realizados indican que el sistema opioide inhibe la secreción hipofisaria de gonadotropinas. La morfina disminuye la secreción de LH, mientras que la administración de naloxona u otros antagonistas opiáceos provoca un aumento de la LH plasmático (Bruni y cols 1977; Cicero y cols 1979; Limonta y cols 1985). Esto explica las alteraciones en la función testicular observadas en los drogadictos (Fraiooli y cols 1982). El efecto estimulante de los antagonistas opiáceos sobre la secreción de LH se debe a un aumento tanto de la frecuencia como de la amplitud de los pulsos de LH (Ropert, Quigley y Yen 1981; Ellingboe y cols 1982).

La secreción de LH se hallaría sometida a un control tónico inhibitor por parte de los opioides endógenos (Van Vugt y cols 1982). Dichos

### *Estrés y gonadotropinas*

péptidos participan, además, como mediadores en la retroalimentación negativa de los esteroides gonadales sobre la secreción de gonadotropinas (Sylvester, Aylsworth y Meites 1981; Bhanot y Wilkinson 1983a y b; Bicknell 1985).

La acción de los opioides endógenos sobre la secreción de gonadotropinas tiene lugar a nivel hipotalámico, puesto que ni la morfina ni la naloxona alteran la respuesta hipofisaria de la LH a la LHRH (Fraiooli y cols 1982; Franz y cols 1982), mientras que sí se ha observado una disminución de la concentración de LHRH en sangre portal al administrar dosis altas de morfina o  $\beta$ -endorfina (Ching 1982; Adler y Crowley 1984; Kalra y cols 1987). Por otra parte, los antagonistas de la LHRH bloquean el efecto estimulante de la naloxona sobre la secreción de LH (Blank y Roberts 1982; Cicero y cols 1985).

Dentro de los distintos péptidos opioides que ejercen estas influencias en las neuronas de LHRH parece ser que la  $\beta$ -endorfina del núcleo arcuato es la más implicada. Así, la microinyección dentro del núcleo arcuato de antisueros anti  $\beta$ -endorfina aumenta los niveles plasmáticos de LH en ratas hembras, mientras que antisueros anti-metil-enkefalinas, no producen dicho aumento (Schulz y cols 1981).

Norman y Smith (1992) sugieren que la inhibición de la liberación de LH y testosterona que se produce tras someter a macacos adultos está mediada por opioides, puesto que la naloxona bloquea parcialmente el efecto del estrés.

# ***OBJETIVOS***



La respuesta de gonadotropinas al estrés es bifásica. El estrés agudo provoca un aumento de la secreción de gonadotropinas y prolactina, mientras que el estrés prolongado crónico provoca un descenso de los niveles plasmáticos de dichas hormonas. Parece lógico pensar que esta respuesta hormonal ante la diferente intensidad del estrés esté mediada por distintos mecanismos.

Actualmente está bien establecida la relación antagónica que existe entre el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal y el gonadal. Trabajos previos de nuestro grupo apoyan la hipótesis de que la disminución de gonadotropinas que se produce durante el estrés crónico puede deberse a la activación de factores hipotalámicos-hipofisarios implicados en la regulación del eje adrenal. Tanto la CRH como los opiáceos inhiben la secreción de gonadotropinas. Sin embargo, no está claro si el efecto inhibitor de la CRH sobre la LHRH es el responsable de los cambios en la función reproductora que se producen durante el estrés y si dicho efecto está mediado por la activación de una vía opiácea.

Por otro lado, se ha observado que durante el estrés agudo se produce un aumento en el turnover de catecolaminas centrales que podría ser el responsable del aumento de la secreción de gonadotropinas que tiene lugar durante el estrés.

Para intentar clarificar estos puntos se han planteado los siguientes objetivos:

- 1) Evaluar el papel de las catecolaminas en la respuesta de las gonadotropinas al estrés agudo.
- 2) Analizar la posible implicación de la CRH y/o los opiáceos centrales en los efectos inhibidores del estrés crónico sobre la función gonadotropa, para lo cual llevaremos a cabo experimentos tanto *in vivo* e *in vitro*.

***MATERIAL***  
***Y***  
***METODOS***

## **1.- ANIMALES**

### **1.1) Condiciones generales.**

Se utilizan ratas macho de raza Wistar de 300-400 g de peso, suministradas por Panlab. Los animales se mantienen en jaulas de metacrilato de 42 x 23 x 14 cm, en número de cuatro por jaula, en el animalario del departamento de Fisiología. La luz del ratario es artificial, mediante lámparas fluorescentes, con control automático de ciclos de 12 horas de luz (7:30 - 19:30) y 12 de oscuridad. La ventilación se realiza mediante extracción continua y la temperatura se mantiene constante entre 20-22°C. La bebida y comida (piensos compuestos suministrados por Panlab, Barcelona) se administran "ad libitum".

En el experimento en que se administra intracerebroventricularmente anticuerpo de CRH se utilizan ratas macho adultas de raza Sprague-Dawley del mismo peso que las anteriores suministradas, por Zivic-Miller. Dichas ratas se adquieren canuladas en el tercer ventrículo y en la yugular y se mantienen 10 días en nuestro estabulario antes de su utilización. Con el fin de confirmar la correcta colocación de la cánula intracerebroventricular los animales son sometidos a un "test de ingesta de agua" que consiste en inyectar a través de la cánula 50 ng de angiotensina II en 5µl de líquido cefalorraquídeo artificial. Se descartan aquellos animales que no beben agua en un período de 10 minutos desde la inyección, tan solo 2 animales de los 57 suministrados tuvieron que ser descartados. Para mantener el buen estado y el funcionamiento de la cánula de la yugular inyectamos a través de la misma una solución heparinizada de polivinilpirrolidona facilitada por Zivic-Miller.

### **1.2. Procedimiento de estrés.**

-Estrés crónico: Utilizamos la inmovilización crónica intermitente. Los animales se introducen en mallas metálicas cilíndricas, con una elasticidad que permite adaptarlas al tamaño del animal, mediante unas pinzas. Se les inmoviliza

seis horas diarias (desde las 10 hasta las 16 horas) durante cuatro días consecutivos.

Los animales no estresados (grupo control) permanecen libremente en sus jaulas y se les priva de agua y comida durante las horas correspondientes al período de inmovilización. De este modo, se pretende eliminar cualquier efecto resultado de la incapacidad de los animales estresados para comer y beber.

Tras el último período de inmovilización, se decapitan todos los animales en una habitación contigua, mediante el uso de una guillotina. El tiempo transcurrido entre el momento de coger al animal y la decapitación es inferior a 30 segundos.

-Estrés agudo: El procedimiento de estrés es el descrito anteriormente salvo la duración del mismo. Los animales se estresan un día durante un período de 30 minutos (a partir de las 10 de la mañana).

### **1.3.Obtención de las muestras.**

-Plasma: Tras decapitar a los animales, se recoge la sangre troncular en tubos de polipropileno heparinizados, enfriados con hielo. Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se mantiene congelado a -18° C hasta el momento del análisis.

-Hipotálamo medio-basal: Tras abrir el cráneo, se extrae el cerebro en bloque. La disección del hipotálamo se realiza atendiendo a los siguientes límites: límite anterior; borde posterior del quiasma óptico, límite posterior; borde anterior de los tubérculos mamilares, límites laterales; surcos hipotalámicos laterales. Con una profundidad de aproximadamente 2 mm.

El tejido se congela en 1 ml de HCl 0,1 N con nieve carbónica y se conserva hasta su posterior análisis a -18°C o -80°C para la cuantificación

de LHRH o catecolaminas.

## 2.- SOLUCIONES Y DROGAS

En las perfusiones se utiliza como medio de perfusión Krebs Ringer bicarbonato (KRB) con la siguiente composición:

- NaCl 118mM
- KCl 4,72 mM
- CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 2,5 mM
- Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 1,18 mM
- KPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 1,18 mM
- NaHCO<sub>3</sub> 24 mM

Cuando se quiere aumentar la concentración de potasio en el medio se disminuye la proporción de NaCl a 68 mM, aumentándose la de KCl a 54,7 mM.

En los experimentos en los que se elimina el calcio, el CaCl<sub>2</sub> se sustituyó por MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM. El EDTA 1 mM (Sigma) se disuelve directamente en el medio.

-La CRH de las perfusiones (Península o Bachem) se prepara a una concentración de 10<sup>-4</sup> M, disuelto en ClH 0,1 N, con objeto de no prepararlo diariamente. El día de la perfusión se diluye en KRB hasta alcanzar la concentración 10<sup>-7</sup> M deseada.

-La naloxona (Sigma) se disuelve cada día, directamente en el medio de perfusión. La naltrexona se disuelve en solución salina en los experimentos en que se inyecta de forma subcutánea.

-La morfina se disuelve también en solución salina antes de su administración.

-La  $\alpha$ -m-p-tiroxina ( $\alpha$ -m-p-tyr) y el dietilditiocarbamato (DDC),

ambos proporcionados por Sigma, se disuelven en solución salina antes de la inyección.

-La yohimbina, el prazosín, y el propranolol (Sigma) también se disuelven diariamente en solución salina antes de su administración.

-El anticuerpo anti-CRH fue obtenido en nuestro laboratorio por los Dres. Ariznavarreta y Tresguerres mediante la inoculación de conejos con la CRH unida a hemocianina, utilizando el método de la carbodiimida. Dicho anticuerpo presenta una reacción cruzada del 0,2% con la galanina e inferior al 0,2% con la calcitonina, la urotensina, la GH, la somatostatina y la sauvagina.

### **3.- METODOS ANALÍTICOS**

#### **3.1) Cuantificación de hormonas polipeptídicas por radioinmunoanálisis (RIA) en suero o en tejido hipotalámico.**

##### **3.1.1. Fundamento teórico.**

Se basa en una reacción competitiva entre la hormona presente en la muestra (hormona fría) y una cantidad constante de esa misma hormona marcada con  $^{125}\text{I}$  (hormona radiactiva), para unirse a un anticuerpo específico a ella.

La afinidad por el anticuerpo que se añade en una cantidad constante a todos los tubos, de ambas hormonas es la misma por lo que la cantidad de hormona radiactiva que se pueda ligar al anticuerpo dependerá de la hormona sin marcar presente en la muestra. Es decir, a mayor concentración de hormona sin marcar menor oportunidad tendrá la hormona radiactiva de unirse con el anticuerpo.

Se utiliza una curva patrón para calcular las concentraciones de la hormona en las muestras problema. En esta curva se representan cantidades conocidas de hormona sin marcar frente a la hormona radiactiva unida al

anticuerpo.

Cada punto de la curva se valora por tetraplicado como mínimo. La unión se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{B-N}{B_0-N} \times 100$$

Donde  $B_0$  representa la hormona radiactiva ligada por el anticuerpo en ausencia de hormona sin marcar y N representa la unión inespecífica como consecuencia de uniones con la pared del tubo en el que se realiza el análisis, como es lógico estos tubos no llevan ni anticuerpo ni hormona fría.

Para representar la curva patrón utilizamos un papel semilogarítmico de 4 períodos con el eje de ordenadas en divisiones lineales y el de abscisas en logarítmicas. En el primero representamos el porcentaje de unión y en el segundo la cantidad de hormona sin marcar añadida a cada punto. Uniendo todos los puntos obtenemos un trazo sinusoidal. Interpolando el % de unión obtenido por las muestras, tendremos la cantidad de hormona presente en la muestra.

### 3.1.2. Inmunorreactivos y soluciones tampón.

Todos los inmunorreactivos utilizados para el radioinmunoanálisis de hormonas polipeptídicas a excepción de la LHRH fueron suministrados por el "National Hormone and Pituitary Program" del National Institute for Diabetes and Digestive and Kidney (NIDDK). La reconstitución y conservación se realiza según las instrucciones que acompañan a cada inmunorreactivo.

-Soluciones y suspensiones:

-Tampón I: Tampón fosfato 0,5 M, pH = 7,6. Se utiliza para el marcaje y para preparar el tampón II y el V.

-Tampón II: Tampón fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,6. Se emplea para eluir la columna del marcaje, para preparar los tampones III y IV y

### *Estrés y gonadotropinas*

para diluir el 2º anticuerpo.

-Tampón III: Tampón fosfato 0,01M, NaCl 0,15 M con 0,1% de BSA, pH = 7,6. Se emplea para las diluciones de la curva estándar, para completar las alícuotas del RIA y diluir la hormona marcada.

-Tampón IV: Tampón fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,025 M y tritiplex 0,025 M, pH = 7,6, se emplea para diluir el primer anticuerpo.

Según de que hormona sea el radioinmunoensayo, se le añade:

a) FSH y PRL se añade 0,25% de suero de conejo.

b) LH se añade 0,25% de suero de conejo y 1% de tritón.

-Tampón V: Tampón fosfato 0,05 M, pH = 7,6 se utiliza para la cuantificación de la corticosterona y para preparar la suspensión de carbón-dextrano.

-Para la valoración de LHRH se utiliza como tampón una mezcla del tampón III y IV al 50%

-Suspensión de carbón-dextrano: Carbón 1%, dextrano 0,5% en tampón V. Una misma suspensión se puede utilizar durante un mes. Se debe mantener en agitación continua a 4°C, durante al menos 60 minutos antes de su uso. Se utiliza para separar la hormona libre de la ligada en la cuantificación de corticosterona.

-Suspensión de segundo anticuerpo: Se prepara polietilenglicol al 10% en tampón II y se añaden 10 µl/tubo de antigammaglobulina de conejo, obtenida en ovejas en nuestro propio laboratorio por los Dres. Ariznavarreta y Tresguerres. Esta suspensión de la que se añaden 500 µl/tubo se utiliza para separar la hormona libre de la hormona ligada en los RIAs de LH, PRL y FSH. Se prepara el mismo día en que se va a utilizar y se mantiene en agitación continua durante su uso.

#### 3.1.3. Cuantificación de la LH.

-**Radioyodación de la hormona:** El marcaje o radioyodación de las hormonas consiste en introducir el yodo en la misma, por medio de alguna reacción enzimática. Se pueden seguir varios métodos, nosotros hemos utilizado

el de la lactoperoxidasa, según técnica descrita por Thorell y Johansson (1971). En este caso la reacción enzimática citada consigue que el yoduro radiactivo pase a yodo atómico y este último sustituya a los átomos de hidrógeno que forman parte de la estructura molecular de las proteínas fundamentalmente en el núcleo fenólico de la tirosina.

Para ello, en un tubo eppendorf de 1,5 ml se pipetea en el orden siguiente:

- 2,5  $\mu\text{g}$  de NIDDK-rLH-I-7 en 25  $\mu\text{l}$  de tampón II o fosfato 0,01M
- 10  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 0,5 M
- 5  $\mu\text{l}$  (0,5 mCi) de  $^{125}\text{I}$  (Amersham)
- 10  $\mu\text{l}$  de dilución lactoperoxidasa (0,5  $\mu\text{g}$ )

Después de 4 minutos de reacción ésta se detiene añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de tampón III pH = 7,6.

**-Separación de la LH iodada y el  $^{125}\text{I}$  libre:** Para este fin se realiza una cromatografía en una columna de 20 x 1 cm empaquetada con Sephadex G-50. Como eluyente se utiliza tampón II fosfato 0,01M. Se obtienen dos picos de radiactividad, el primero de los cuales corresponde a la LH iodada y el 2º al yodo libre. Las fracciones correspondientes al pico de LH yodada se mezclan y se distribuyen en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$ , que se almacenan a  $-18^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

Antes del RIA, se purifica de nuevo la LH yodada, mediante cromatografía en Sephadex G-100, con objeto de separar la fracción de hormona deteriorada, así como el yodo que se haya liberado desde el marcaje. Se utiliza una columna de 25 x 2 cm y el eluyente citado anteriormente.

**- Evaluación del marcaje:** Para conocer el rendimiento de la radioyodación, o porcentaje de  $^{125}\text{I}$  incorporado a la hormona, utilizamos el método inespecífico de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA). Una vez diluida una pequeña parte del producto de marcaje, se toman alícuotas de 50  $\mu\text{l}$ , se les añade a la mitad de ellas 500  $\mu\text{l}$  de tampón III fosfato 0,01 M BSA 1% para aumentar el precipitado y 2 ml de TCA al 10%

### *Estrés y gonadotropinas*

agitándolas bien. Se incuban durante 15 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugan otros 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C y se aspira el sobrenadante. Se cuenta el precipitado 1 minuto en un contador de radiactividad. La actividad específica del marcaje se calcula multiplicando el rendimiento por la cantidad de yodo utilizada (0,5 mCi) y dividiendo el resultado por la masa de hormona que empleamos para el marcaje (2,5 µg). Se expresa en µCi/µg. La actividad específica de la LH iodada oscila entre 99 y 134 µCi/µg de hormona.

- **Realización del análisis:** 1) Se pipetea las muestras por duplicado, en alícuotas no superiores a 200 µl. Asimismo, se pipetea la LH patrón (NIDDK-rLH-RP-3 también disuelta en tampón II fosfato 0,01 M) en un rango de 10 a 2.500 pg diluida en 200 µl de tampón fosfato III BSA 1%. Se completan todos los tubos con este mismo tampón hasta un volumen de 300 µl. Además de esto se utilizan en todos los RIAs los siguientes puntos de referencia:

-N o controles de actividad inespecífica, que contienen 200 µl de tampón fosfato IV y 300 µl de tampón II.

-At o controles de radiactividad que sólo contendrán la hormona radiactiva en este caso la LH marcada.

En cada RIA se utilizan dos curvas patrón colocándose una al principio y otra al final de todas las muestras para controlar las variaciones debidas al tiempo de incubación entre los primeros y los últimos tubos. Para control interno en todos los RIAs valoramos los niveles de hormonas en un pool de plasmas o de hipotálamos en el caso de la LHRH.

2) Se añade a todos los tubos, salvo a los N y At, el anticuerpo (NIDDK-anti-rLH-S-9) diluido previamente 1/187,5 en tampón IV y congelado a -18° C. A partir de esta dilución 1/187,5 se hace una dilución final 1/28.000 y se añade suero de conejo al 0,25%. De esta dilución se pipetea 200 µl/tubo, alcanzando una dilución final del anticuerpo en el tubo 1/84.000.

3) Se preincuba 72 horas a 4°C con objeto de aumentar la sensibilidad del RIA.

4) Se añaden 15.000 - 20.000 cpm/tubo de LH iodada, disuelta

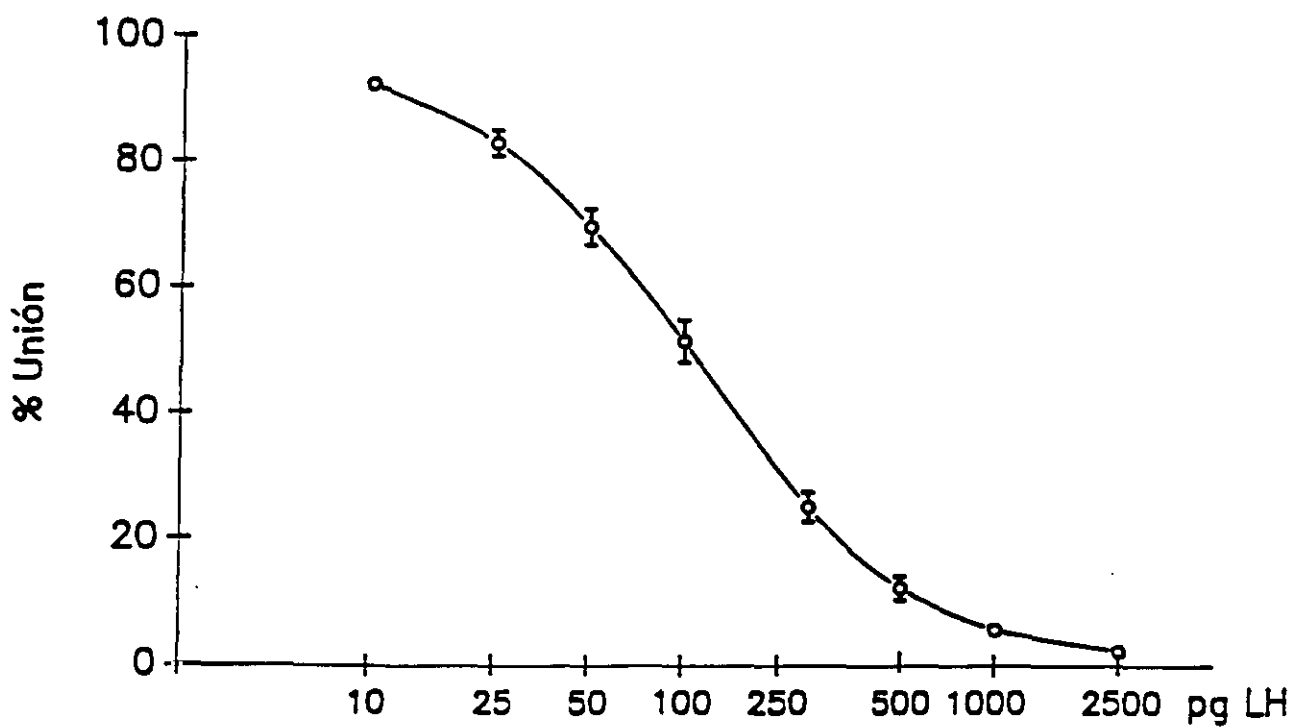


Figura 1: Curva patrón de LH. Los valores expresan la media  $\pm$  desviación estándar.

### *Estrés y gonadotropinas*

en 100  $\mu$ l de tampón III.

5) Se incuba 48 horas a 4°C.

La separación de las fracciones libre y ligada se realiza mediante la adición a cada tubo de 500  $\mu$ l de la suspensión de 2° anticuerpo ya mencionada anteriormente. Se incuba a 4°C durante 20 minutos y a continuación se centrifuga 15 minutos a 3.000 rpm, se aspira el sobrenadante y se mide a radiactividad del precipitado, que corresponde a la fracción de hormona ligada al anticuerpo.

- **Validación del método:** La sensibilidad es de 5 pg/tubo. El coeficiente de variación intraanálisis es de un 5% e interanálisis es de un 8%. En la Fig. 3 aparece representada una curva patrón media de esta hormona.

#### 3.1.4. Cuantificación de FSH.

- **Marcaje de la hormona:** Se realiza mediante un procedimiento similar al descrito para la LH. La FSH para yodar fue la NIDDK-rFSH-I-7. La actividad específica de la FSH yodada oscila entre 96 y 127  $\mu$ Ci/ $\mu$ g de hormona.

- **Separación de la FSH yodada y el yodo libre:** Tras el marcaje se realiza una purificación en Sephadex G-50 en la misma columna utilizada para la LH y siguiendo el mismo procedimiento. Se mezclan las fracciones correspondientes al primer pico de radiactividad que corresponden con la FSH marcada y se distribuyen en alícuotas que se conservan a -18°C. Al contrario de lo que ocurre con la LH, la purificación de la FSH yodada en Sephadex G-100 antes de la realización del RIA no mejora el porcentaje de unión de la hormona al anticuerpo.

- **Procedimiento del radioinmunoanálisis:** Es análogo al descrito para la LH, excepto en lo que respecta a las diluciones de las muestras y del anticuerpo. La cantidad de suero usado es de 150  $\mu$ l. La FSH estándar (NIDDK-

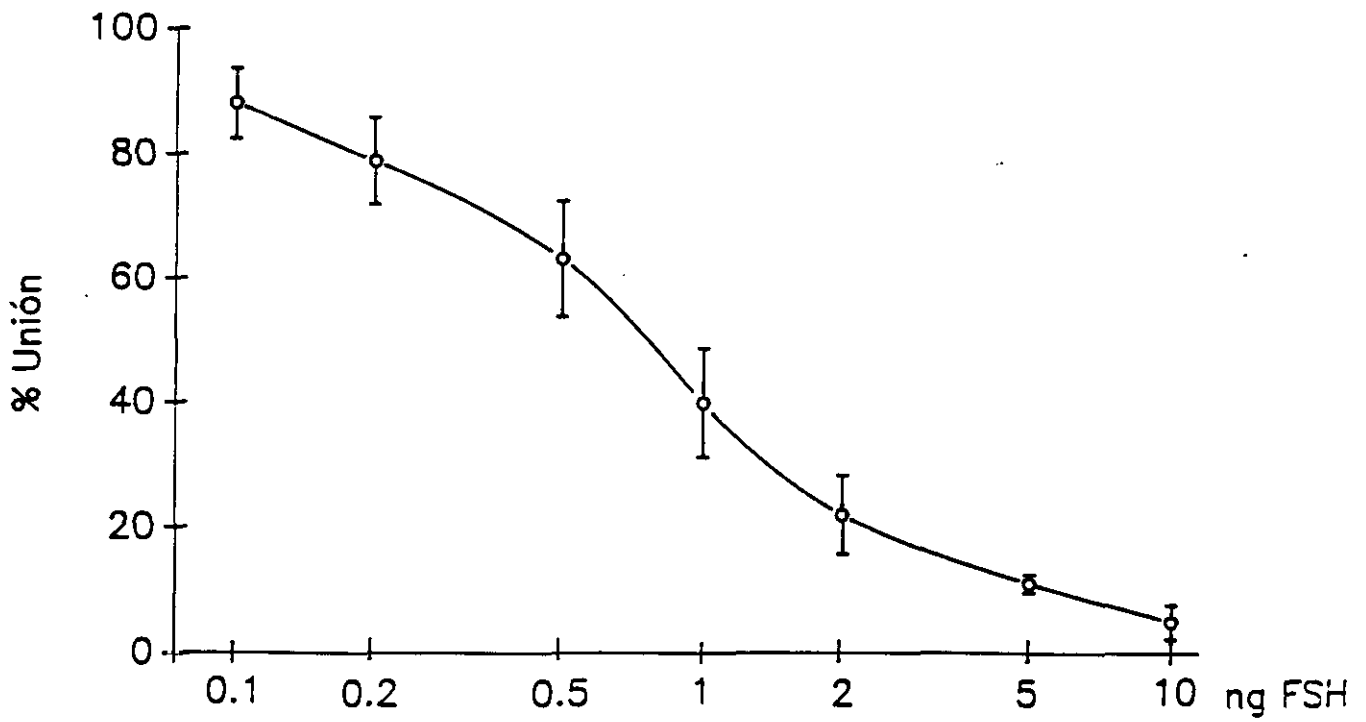


Figura 2: Curva patrón de FSH. Los valores expresan la media  $\pm$  desviación aritmética.

### *Estrés y gonadotropinas*

rFSH-RP-2, disuelta en tampón II 0,01 M) se diluye de modo que se obtenga un rango de concentraciones de 0,1 a 10 ng en 200  $\mu$ l.

El anticuerpo NIDDK-anti-rFSH-S-11 (diluido previamente 1/125 en tampón IV) se diluye 300 veces en tampón IV al que se añade suero de conejo al 0,25 %, y se pipetea 200  $\mu$ l/tubo alcanzando una dilución final en el tubo de RIA 1/112.500.

- **Validación del método:** La sensibilidad es de 0,1 ng/tubo. El coeficiente de variación intraanálisis es de un 6% y el interanálisis es de un 9%, existiendo una buena linearidad (Fig.4).

#### 3.1.5. Cuantificación de la prolactina.

- **Radioyodación de la hormona:** Se realiza mediante un procedimiento similar al descrito para las demás hormonas polipeptídicas en apartados anteriores. La prolactina para yodar es la NIDDK-rPRL-I6, que se reconstituye en tampón fosfato II. La actividad específica de la PRL yodada oscila entre 80 y 122  $\mu$ Ci/ $\mu$ g de hormona.

- **Separación de la PRL yodada y el yodo libre:** Tras el marcaje se purifica la hormona en Sephadex G-50. Se mezclan las fracciones correspondientes al primer pico de radiactividad (PRL yodada) y se distribuye en alícuotas que se conservan a -18°C hasta su utilización para el RIA.

En el mismo día en el que se añade al análisis la hormona yodada se descongela y se vuelve a purificar en una columna rellena con Sephadex G-100. En este caso el primer pico de radiactividad suele aparecer desdoblado, correspondiendo la primera elevación del mismo a hormona yodada deteriorada durante la radioyodación y el almacenamiento y que ha perdido por tanto la capacidad de ser reconocida por el anticuerpo específico. Las fracciones correspondientes a la segunda elevación del primer pico son las que contienen la hormona yodada inmunorreactiva que se utiliza posteriormente para la

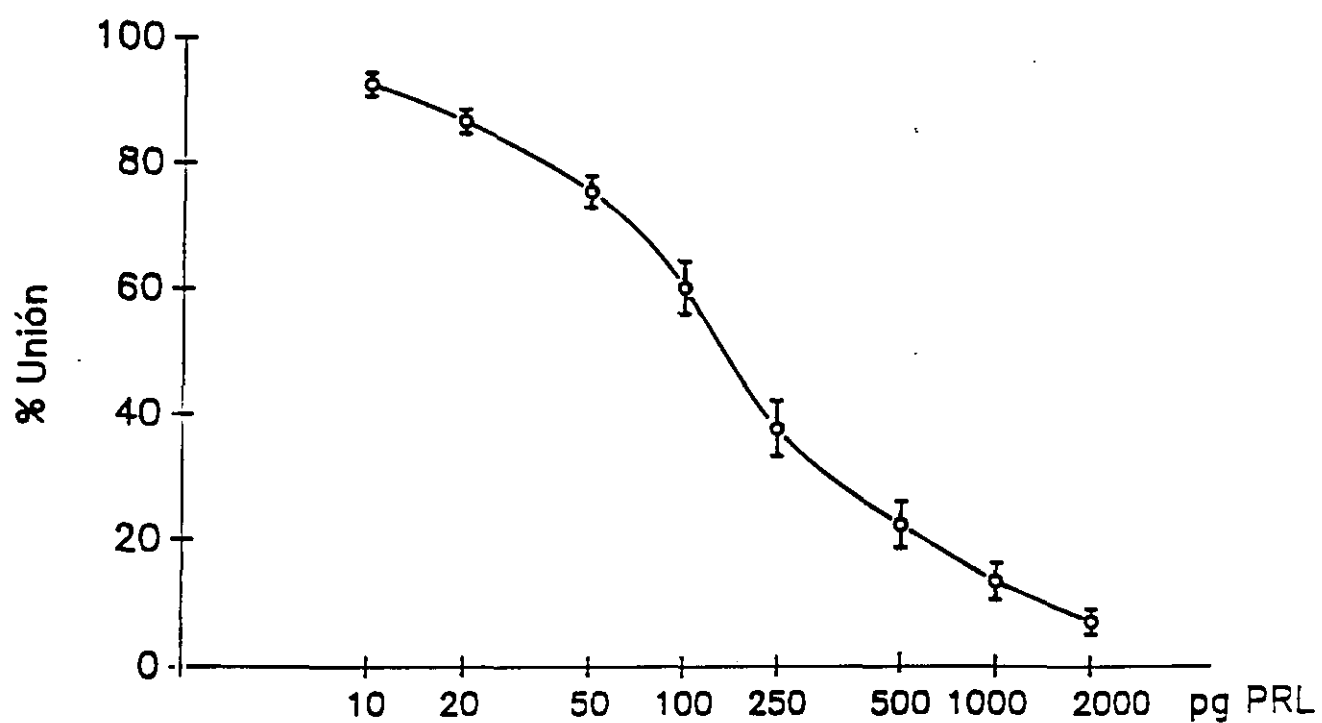


Figura 3: Curva patrón de PRL. Los valores expresan la media  $\pm$  desviación aritmética.

### *Estrés y gonadotropinas*

realización del análisis.

- **Procedimiento del radioinmunoanálisis:** Es análogo al descrito anteriormente para la LH y la FSH excepto en lo que respecta al período de preincubación, a las diluciones de las hormonas y del anticuerpo. Las cantidades de plasma empleadas para la cuantificación fueron 25  $\mu$ l y 50  $\mu$ l.

La PRL patrón (NIDDK-rPRL-RP-3, disuelta en tampón fosfato 0,01 M) se diluye de modo que se obtenga un rango de concentraciones de 10 a 2.000 pg, diluidos en 200  $\mu$ l de tampón III. El anticuerpo NIDDK-anti-rPRL-S-9 (diluido previamente 1/10 en tampón IV) se diluye 500 veces en tampón IV con suero de conejo 0,25%, se pipetea 200  $\mu$ l/tubo, alcanzando una dilución final en el tubo de RIA 1/15.000.

- **Validación del método:** La sensibilidad del radioinmunoanálisis es de 10 pg/tubo. El coeficiente de variación intraanálisis es de un 4,5%, el coeficiente de variación interanálisis es de un 18%. En la Fig. 5 hemos representado una curva patrón media correspondiente a esta hormona.

#### 3.1.6. Cuantificación de la LHRH.

Este método fue puesto a punto en nuestro laboratorio por la Dra. C. Alvarez y aparece extensamente validado en su tesis doctoral (1989).

-**Marcaje de la hormona:** Se realiza mediante el método de la lactoperoxidasa. La LHRH para yodar y la estándar de referencia se adquirieron a U.B.L (Universal Biological Limited) reconstituida en tampón fosfato 0,5 M pH=7,6. Una vez reconstituida la hormona se almacena congelada a -18°C hasta su uso, por un período de hasta 6 meses. En el caso de este péptido no se puede utilizar el método inespecífico de precipitación de proteínas con TCA para conocer el rendimiento aproximado del proceso de radioyodación.

-**Separación de la LHRH yodada y el iodo libre:** Con este fin se

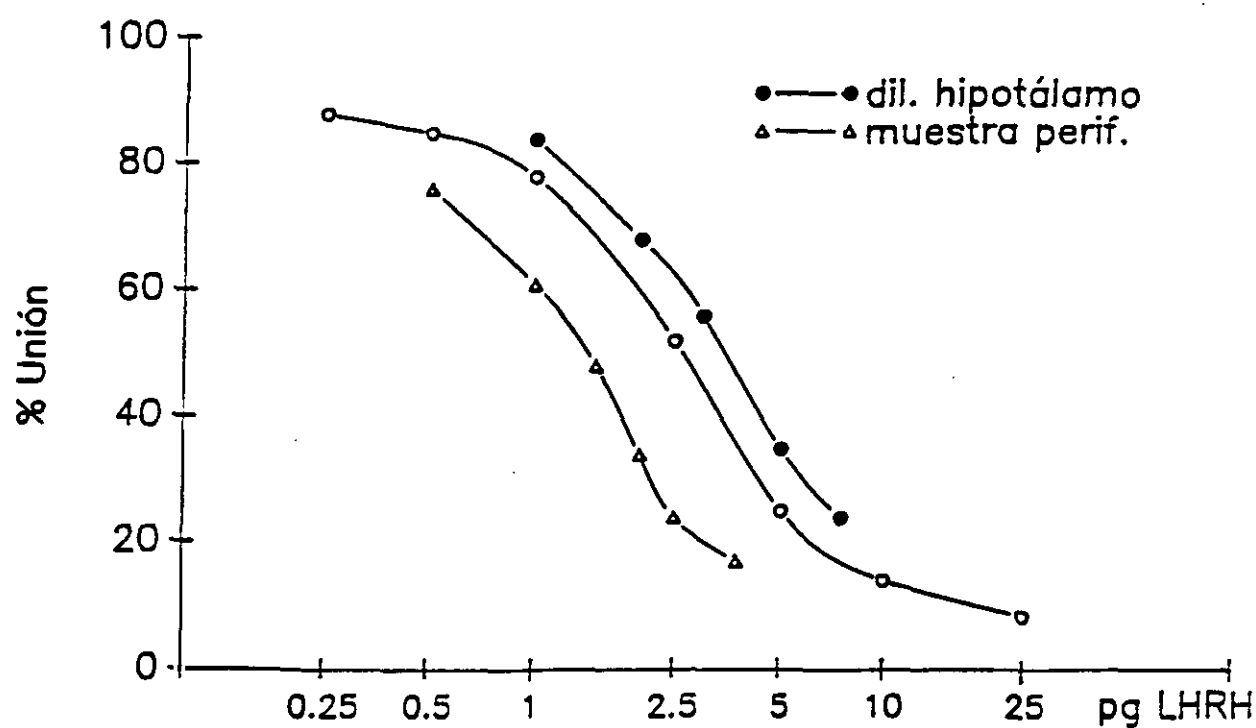


Figura 4: Curva patrón de LHRH y paralelismo de la misma con diluciones sucesivas de un extracto de hipotálamo o distintos volúmenes del medio de perfusión.

## *Estrés y gonadotropinas*

lleva a cabo una cromatografía de fase reversa, introduciendo el marcaje en una minicolumna C<sup>18</sup> desechable de 1 ml (Baker). El funcionamiento de esta cromatografía implica una fase estacionaria no polar y un eluyente o fase móvil polar. La fase estacionaria son cadenas hidrocarbonadas, en este caso octadecilos ligados químicamente a la superficie de partículas de sílice, que actúan como soporte inerte. La fase estacionaria presenta afinidad por la zona no polar de las moléculas en solución mientras que la fase móvil presenta mayor polaridad con lo que hace que se eluyan antes las sustancias polares y después las no polares.

Primero se pasa metanol por la columna, después ésta se lava con TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1%, se añade el marcaje y se eluye con TFA recogiendo 10 fracciones con 10 gotas cada fracción. Posteriormente se eluye con acetonitrilo al 50% en TFA al 0,1% al 50% y recogemos otras 30 fracciones de 10 gotas. En las 10 primeras fracciones se obtiene la radiactividad correspondiente al <sup>125</sup>I libre, mientras que en las 30 fracciones siguientes al cambiar el eluyente se recoge la hormona yodada. El almacenamiento de la hormona marcada a -18°C durante más de 30 días causa un deterioro de la misma cuando se sobrepasa un período de 30 días. Pasado este tiempo se puede volver a repurificar, de igual manera que se purifica el marcaje tras lo cual obtenemos una hormona con una buena capacidad de unión y de desplazamiento de la hormona fría.

**-Realización del radioinmunoanálisis:** Los hipotálamos problema se homogenizan en 1 ml de CIH 0,1 N, se centrifugan a 3.000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se diluye 100 veces en el tampón de RIA o tampón V, añadiéndose 200 µl de esta dilución por triplicado. Las muestras de perfusión se añaden directamente al RIA. Previamente se comprobó que el KRB no interfiere en el RIA, (Fig.5). Se pipetea el anticuerpo (Ferring reconstituido en tampón IV y almacenado a una dilución 1/20 a -18°C) en un volumen de 50 µl a una dilución final en el tubo de 1:120.000. Se preincuba de 24 a 48 horas a 4°C, y pasado este período se añade a todos los tubos 10.000 cpm de la hormona marcada en un volumen de 50 µL. Al final de este período de

incubación se separa la hormona unida al anticuerpo de la hormona libre, mediante la adición de 1,5 ml de etanol a 4°C. Se incuba durante 15 minutos y se centrifuga a 3.000 rpm durante 20 minutos, al final de los cuales se aspira el sobrenadante quedando un precipitado visible que corresponde al complejo hormona-anticuerpo.

**-Validación del método:** La sensibilidad es de 0,25 pg/tubo. El coeficiente de variación intraanálisis es de un 4% y el interanálisis del 18%.

### 3.1.7. Cuantificación de la corticosterona plasmática.

Se realiza mediante análisis por desplazamiento competitivo (CPB), según el método descrito por Mancheño y cols (1975), con algunas modificaciones.

**-Inmunorreactivos:** -Cortisol iodado: Suministrado por Amershan con una actividad específica de 2.000 Ci/mmol. Se completa a 1 ml con etanol absoluto y se conserva a 4°C durante aproximadamente un mes.

-Corticosterona no radiactiva: Se obtiene de Ikapharm (Israel). Se conserva diluida en etanol (10-80 ng/ml) a 4°C.

-Como fuente de transcortina (CBG) se utiliza plasma de mujeres en el tercer trimestre de gestación, que se diluye en glicerol v/v y se conserva a -18°C hasta el momento de su uso.

**-Procedimiento de extracción:** Se efectúa a partir de alícuotas de 25-100  $\mu$ l de plasma, que se disponen en tubos de cristal de boca esmerilada. Se añaden 0,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada y 4 ml de diclorometano. Los tubos se someten a rotación mecánica (30 rpm) durante 10 minutos. A continuación, se descarta la fase acuosa por aspiración y el extracto se somete al análisis por CPB.

**-Realización del análisis:** En tubos de vidrio se pipetea 2 ml del extracto y se evaporan a temperatura ambiente. Una vez evaporados se reconstituyen en 10 veces el volumen de suero extraído con tampón de RIA. A

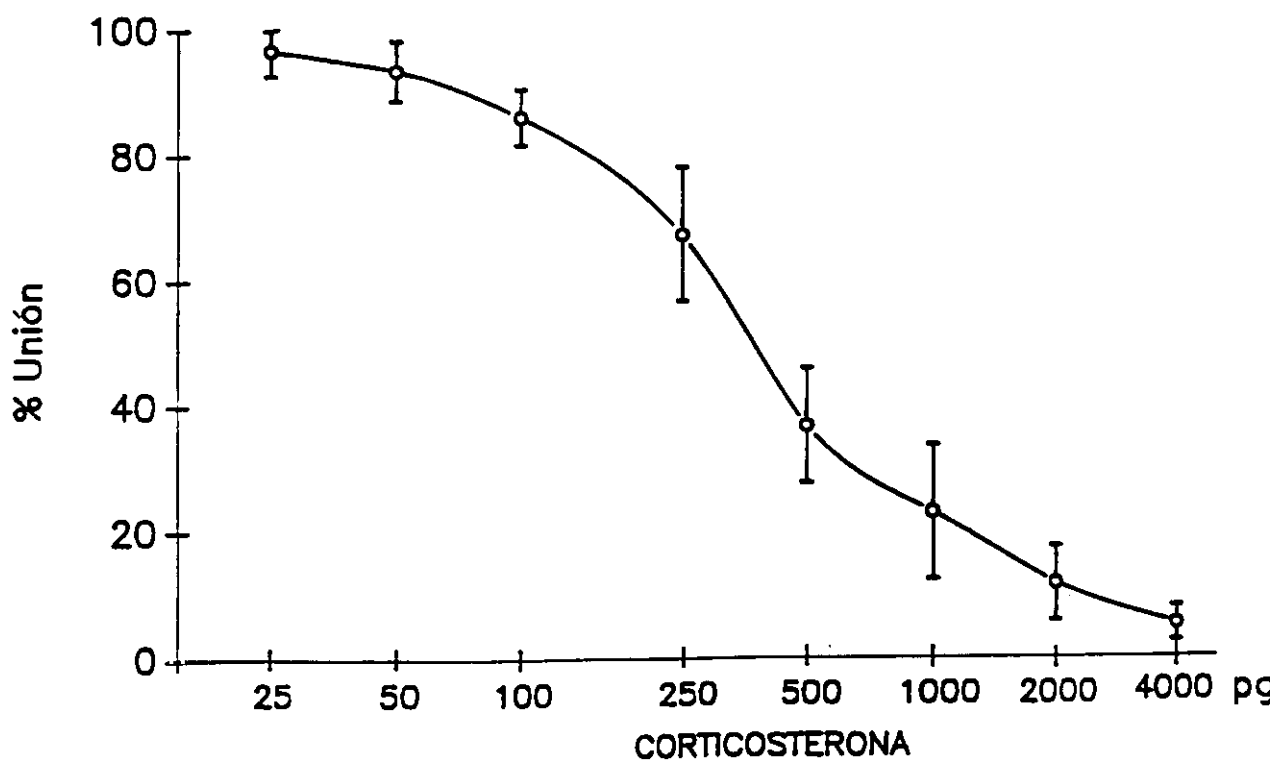


Figura 5: Curva patrón de corticosterona. Los valores expresan la media  $\pm$  desviación aritmética.

continuación se pipetea de 100 a 200  $\mu\text{l}$  del extracto reconstituido y se prepara una curva estándar de corticosterona en tampón VI fosfato 0,05 M desde 0 a 4 ng en un volumen de 100  $\mu\text{l}$ .

Se añaden a todos los tubos 4  $\mu\text{l}$ /tubo del plasma de gestante-glicerol diluido en un volumen de 100  $\mu\text{l}$ .

Inmediatamente después se añade 100  $\mu\text{l}$  de cortisol marcado con aproximadamente 10.000 cpm por tubo. Tras agitar, los tubos se incuban a 4°C, durante 30 minutos.

La separación de la corticosterona libre y la ligada se realiza añadiendo 200  $\mu\text{l}$ /tubo de la suspensión de carbón-dextrano ya mencionada anteriormente. Se agitan los tubos en el vórtex y se incuban a 4°C durante 10 minutos. Se centrifugan a 3.000 rpm durante otros 10 minutos y se aspira el sobrenadante que contiene en este caso la fracción ligada. Se mide la radiactividad del precipitado que corresponde a la fracción de hormona libre.

### **3.2.- Cuantificación de catecolaminas por cromatografía líquida de alta precisión (H.P.L.C.).**

#### **3.2.1. Fundamento teórico de la H.P.L.C. y la detección electroquímica.**

La técnica de H.P.L.C. utilizada para la separación de aminas biológicas y sus metabolitos es una cromatografía líquido-líquido de fase reversa, lo que implica el uso de una fase estacionaria constituida por cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud, siendo las más frecuente octilos, octadecilos y fenilos, ligadas químicamente a la superficie de partículas de sílice que actúan como soporte inerte. La composición de la fase móvil depende del tipo de aminas y metabolitos que se quieran separar.

## *Estrés y gonadotropinas*

La fase estacionaria presenta afinidad por la zona no polar de las moléculas en solución mientras que la fase móvil presenta mayor polaridad, lo que hace que se eluyan antes las sustancias polares que las no polares. Si a este método de separación se añade la presencia en el eluyente de un reactivo que dé lugar a asociaciones iónicas entre solutos y fase estacionaria, por ejemplo el sulfonato sódico de octano, se combinan las ventajas de la cromatografía de fase reversa-alta resolución y estabilidad de la columna con las de la cromatografía de intercambio iónico, obteniéndose una mejor separación de los solutos. A este método de separación se le denomina Cromatografía Líquida de Fase Reversa "Ion-pair", y es el que utilizaremos para la cuantificación de catecolaminas por H.P.L.C. (Krstulovic, 1982).

El eluido procedente de la columna analítica contiene una secuencia de zonas de soluto separadas entre sí. Este eluido es constreñido y convertido en una película muy delgada que pasa sobre un electrodo plano, mantenido durante todo el proceso a un potencial fijo, establecido frente a un electrodo de referencia. La detección electroquímica se basa en la capacidad de los solutos para oxidarse a su paso por el electrodo cuando el potencial es superior al requerido para su electrólisis. De esta forma, una carga medible pasa del compuesto al electrodo.

La corriente resultante es directamente proporcional a la concentración de soluto que pasa por la superficie del electrodo por unidad de tiempo. Esta corriente, una vez amplificada, es enviada a un registrador que proporciona un cromatograma en el cual se cuantifican los solutos según el área bajo cada pico. (Krstulovic, 1982).

### 3.2.2. Condiciones de trabajo.

A) Columna analítica: Brownlee Labs RP-18, de 10 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, constituida por partículas de sílice poroso de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro a las que se han unido químicamente cadenas octadecilo ( $\text{C}^{18}$ ).

B) Sistema de H.P.L.C.: bomba 8700XR, de Spectra-Physic, con

capacidad de inyección para una muestra de 10  $\mu$ l. Durante todos los análisis se mantuvo un flujo constante de la fase móvil de 1,2-1,3 ml/minuto.

C) Detector electroquímico amperométrico: de Metronm Bioanalytical System, equipado con un electrodo de trabajo de carbón-vidrio, y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Para la detección de dopamina en hipotálamo medio-basal se utilizó un potencial de 0,65 v a una sensibilidad de 10 nA.

D) Registrador: integrador 4290 de Spectr-Physic que calcula las concentraciones de soluto según el área bajo el pico. El papel se desplaza a una velocidad de 0,25 cm/minuto.

E) Fase móvil: para la determinación de dopamina se utilizó como fase móvil la descrita por Carlsson y col. (1986):

- Fosfato monosódico 0,15 M.
- Sulfonato sódico de octano 0,5 mM.
- EDTA 0,1 mM.
- Metanol 12%. pH = 3,8

Esta técnica ha sido puesta a punto y validada por el Dr. J.F.Fernández en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de esta Universidad, quien a llevado a cabo las determinaciones de catecolaminas expuestas en esta Tesis Doctoral.

### 3.2.3. Procesamiento de las muestras.

Una vez descongelado el tejido se homogeneiza , siempre en frío, en 100  $\mu$ l de una solución conservada en hielo de ácido perclórico 0,2 N, con bisulfito sódico 0,5 mM (antioxidante) y 40 ng/ml de DHBA, que se utilizará como estándar interno. El añadir el estándar interno a la solución de homogeneización tienen como finalidad el poder hacer correcciones si existen pérdidas durante el procesamiento y almacenamiento de las muestras (Krstulovi, 1982).

Una vez homogeneizado el tejido, se centrifuga durante 1 minuto

## *Estrés y gonadotropinas*

a 10.000 g y se almacena en nevera (4°C) durante 24 horas. La alícuota que se inyecta en el sistema de H.P.L.C., así como la que se utiliza para determinar la concentración de proteínas, se obtiene del sobrenadante.

### 3.2.4. Cálculo e interpretación de resultados.

La concentración de soluto en el eluido de la columna se determina según la dimensión del área bajo el correspondiente pico. Para el cálculo de resultados se utilizó como referencia un estándar externo constituido por 40 ng/ml de dopamina, noradrenalina y adrenalina en una solución de ácido perclórico 0,2 N con bisulfito sódico 0,5 mM.

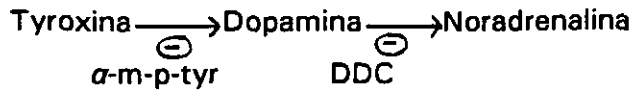
Tras la inyección de la muestra, el integrador reconoce el pico correspondiente a cada soluto según el tiempo de elución determinado con el estándar externo, y calcula la concentración de cada sustancia multiplicando el valor del área bajo de pico por el correspondiente factor de corrección, previamente establecido según el estándar externo, y refiriendo su concentración a la del estándar, con lo que se corrigen las posibles pérdidas de solutos originadas por el procesamiento y almacenamiento de las muestras.

## **4.- DISEÑOS EXPERIMENTALES**

### **4.1. Papel de las catecolaminas en la respuesta de gonadotropinas al estrés agudo.**

#### **4.1.1. Efecto de la administración de $\alpha$ -m-p-tyr, DDC, inhibidores de distintos pasos de la síntesis de catecolaminas.**

Para elucidar el papel de las distintas catecolaminas en el incremento de la secreción de gonadotropinas que tiene lugar durante el estrés agudo, se utilizan 2 inhibidores de la ruta biosintética de catecolaminas:



Se emplean 80 ratas que se dividen en 3 grupos experimentales:

- a) Inyectado intraperitonealmente con 300  $\mu\text{l}$  de solución salina.
- b) Inyectado con  $\alpha\text{-m-p-tyr}$  (250 mg/kg de peso corporal).
- c) Inyectado con DDC (500 mg/Kg de peso).

El tratamiento farmacológico se inicia a las 9:30, tres horas más tarde, a las 12:30, la mitad de los animales de cada grupo se estresa por inmovilización durante 30 minutos y la otra mitad permanece en sus jaulas como grupo control sin estresar. Al finalizar el estrés los animales se sacrifican por decapitación, se extrae rápidamente el hipotálamo, con hielo seco y se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de catecolaminas y LHRH. La sangre troncular se recoge y el suero resultante se almacenó a  $-18^{\circ}\text{C}$  para la determinar los niveles plasmáticos de LH, FSH, PRL y corticosterona.

#### 4.1.1. Efecto de la administración de distintos antagonistas de los receptores adrenérgicos.

Con objeto de averiguar qué tipo de receptor media el efecto de las catecolaminas sobre la secreción de gonadotropinas en respuesta al estrés agudo, se administran distintos antagonistas adrenérgicos. Prazosín antagonista de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, yohimbina antagonista de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y propranolol antagonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

Para ello se utilizan 80 ratas divididas en 4 grupos:

- a) Inyectado con 500  $\mu\text{l}$  de solución salina.
- b) Inyectado con 2 mg/kg de prazosín.
- c) Inyectado con 5 mg/Kg de yohimbina.
- d) Inyectado con 15 mg/Kg de propranolol.

A las 9:30, sesenta minutos antes de comenzar el estrés, se les

## *Estrés y gonadotropinas*

inyecta a los animales intraperitonealmente las distintas drogas y a las 10:30 se estresa por inmovilización a la mitad de los animales de cada grupo experimental. Trascorridos 30 minutos de estrés, los animales se decapitan y se determinan los niveles plasmáticos de LH, FSH, PRL, corticosterona, así como el contenido hipotalámico de LHRH.

### **4.2. Papel de la CRH y opiáceos en la inhibición de la función gonadotropa durante el estrés crónico.**

Con este objetivo se llevan a cabo experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* que intentan elucidar dicho papel.

#### **4.2.1. Efecto de la administración intracerebroventricular de anticuerpo contra CRH.**

Con objeto de elucidar el papel de la CRH hipotalámica en la respuesta de gonadotropinas al estrés crónico se utilizan 52 animales a 26 de los cuales se le inyecta intracerebroventricularmente un anticuerpo anti-CRH y a los otros 26 suero de conejo, a las 9:00. Una hora después, a las 10:00 la mitad de los animales de cada grupo se estresa por inmovilización desde las 10:00 hasta las 16:00, durante 4 días consecutivos. El último día, una vez finalizado el período de estrés se decapitan todos los animales y se determinan los niveles plasmáticos de LH, FSH, PRL, corticosterona y el contenido hipotalámico de LHRH.

#### **4.2.2. Efecto de la naltrexona.**

A fin de averiguar la participación específica de los péptidos opioides, se estudió la respuesta de las gonadotropinas al estrés en animales tratados con un antagonista opiáceo, de acción prolongada la naltrexona, administrado durante el período de inmovilización.

Se utilizan 60 ratas. La mitad de ellas recibe naltrexona

subcutáneamente (2 mg/Kg) ó 250  $\mu$ l de solución salina 3 veces al día (a las 9:30, a las 12:45 y a las 15:00 h) durante los 4 días del experimento. Para comprobar la efectividad del tratamiento de naltrexona bloqueando los receptores opiáceos, 30 minutos antes de finalizar el experimento (a las 15:30 h), la mitad de los animales no estresados tratados tanto con salino como con naltrexona recibieron subcutáneamente 10 mg/kg de morfina ó 250  $\mu$ l de salino. Al final del período de estrés se decapitan los animales y se determinan los niveles plasmáticos de LH, FSH y PRL junto con el contenido hipotalámico de LHRH.

## **5.- PERIFUSIONES**

El aparato de perfusión (Fig 6) consta de 3 reservorios que contienen KRB, KRB en el que se han disuelto las distintas sustancias a probar y KRB que además de dicha sustancia tiene la concentración de potasio de 56 mM. Dichos medios se gasean continuamente a una presión de 1,5 mm de Hg y están conectados con la cámara que contiene el tejido por medio de una llave Hamilton que controla la llegada al tejido de las distintas drogas disueltas en el medio. Todo el sistema está introducido en un baño a temperatura constante de 37° C.

Antes de realizar la perfusión el medio Krebs-Ringer bicarbonato se gasea durante 30 minutos, con C<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> (95%:5%). Una vez gaseado se añade BSA (albúmina de suero bovino) 0,1% con el fin de evitar que los péptidos se adhieran a las paredes de los viales, bacitracina 2x10<sup>-2</sup> mM para impedir la degradación por peptidasas, glucosa 10 mM y las diferentes sustancias a probar.

Las cámaras que contienen el tejido son de metacrilato especialmente diseñadas para el hipotálamo con una mínima cantidad de volumen muerto de 70  $\mu$ l. Dichas cámaras se conectan a través de un catéter de tygon con una bomba peristáltica (modelo LKB) con un flujo que se regula a 50  $\mu$ l/min. Se recogen fracciones cada 4 minutos con un colector de

fracciones.

**5.1.Efecto de la CRH y la naloxona sobre la secreción hipotalámica de LHRH *in vitro*.**

Para comprobar si el efecto inhibitor de la CRH sobre la secreción de LHRH es directo o está mediado por los opiáceos, llevamos a cabo perfusiones de hipotálamo medio basal con Krebs-Ringer , CRH  $10^{-7}$ M y/o naloxona a una dosis equimolecular.

Todos los hipotálamos se perfunden con KRB durante una hora para que alcancen una secreción basal de LHRH estable. A continuación se perfunden con el estímulo (CRH  $10^{-7}$  M y/o naloxona  $10^{-7}$  M) durante otra hora. Este período se sigue de otros 16 minutos de perfusión con KRB con KCl 56 mM y los distintos estímulos. Por último se mantiene el tejido otros 16 minutos con el medio del estímulo. El eluyente se recoge en tubos mantenidos en hielo y se conserva a  $-18^{\circ}$  C hasta su posterior análisis. Los hipotálamos se pesan y se recogen en un eppendorf con 1 ml de CIH 0,1 N y se mantienen a  $-18^{\circ}$  C hasta su posterior procesado.

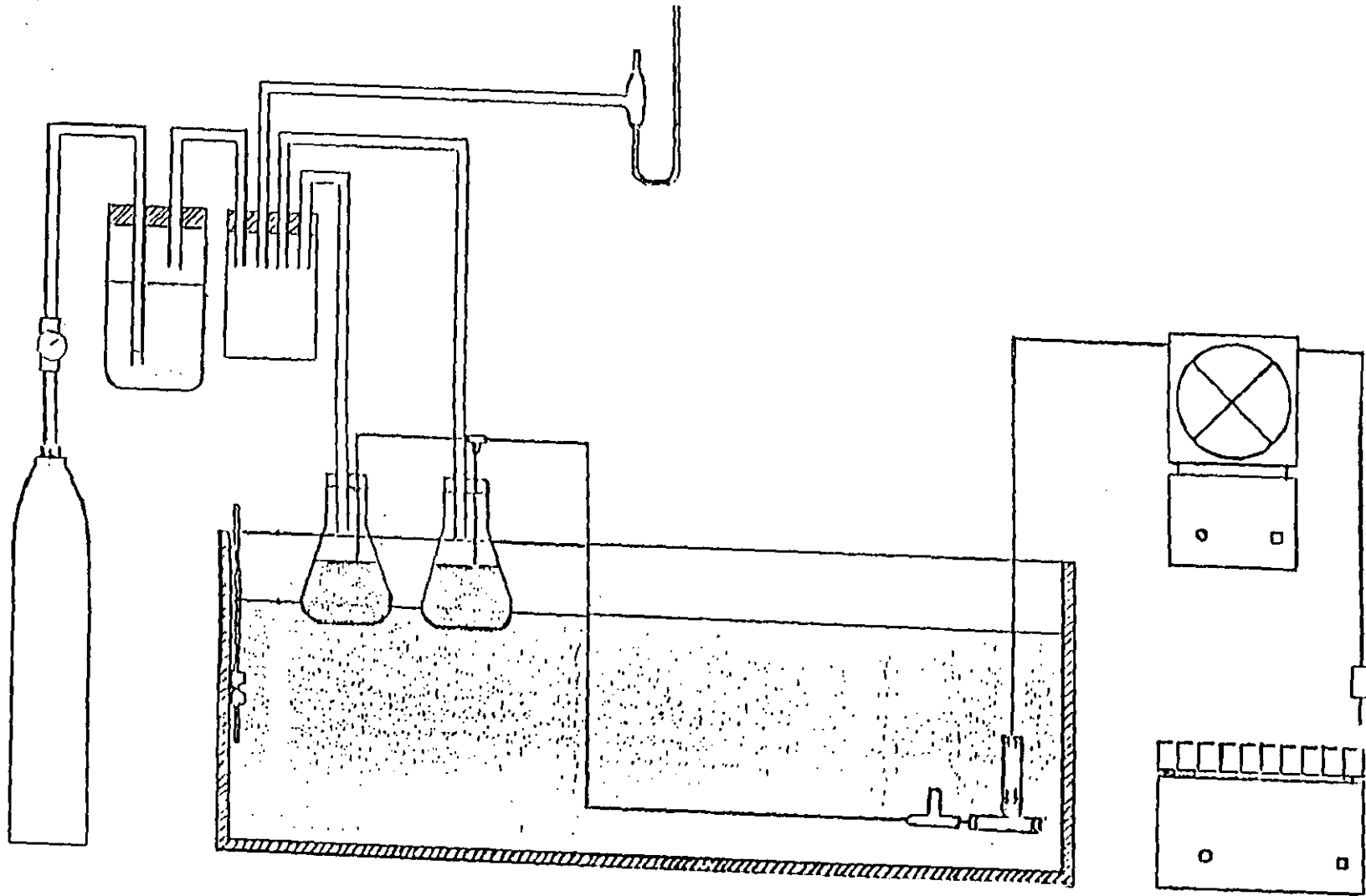


Figura 6: Representación del sistema de perfusión.

## **6.- TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS**

El valor de las variables estudiadas se expresa mediante un parámetro de centralización (media aritmética) y otro de dispersión (error estándar de la media, SEM).

La comparación de muestras respecto a una variable se realiza mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías. Con el fin de homogeneizar la varianza en aquellas variables que presentaban una gran dispersión de la misma se realizó el ANOVA del logaritmo de los valores de dicha variable. En la interpretación de dicho análisis cuando la interacción entre las dos variables estudiadas fue  $p < 0,1$  se aplicó posteriormente un test de Tukey de comparaciones múltiples, para discernir qué grupos eran diferentes entre sí. Cuando se trata de comparar dos grupos se utiliza el test de la "t" de Student, que es matemáticamente equivalente al análisis de la varianza cuando sólo existen 2 grupos. En el caso de las perfusiones se calcula la liberación en picogramos a lo largo de distintas etapas de la misma sumando lo liberado en varias fracciones de cada periodo (basal, con las distintas drogas a probar, o con potasio).

# ***RESULTADOS***



## 1.- PAPEL DE LAS CATECOLAMINAS EN LA RESPUESTA DE LAS GONADOTROPINAS AL ESTRÉS AGUDO.

### 1.1.Efecto de la administración de $\alpha$ -m-p-tyr y DDC.

a) **LH:** Los resultados se representan en la Fig. 7. Los niveles plasmáticos de LH aparecen significativamente disminuídos ( $F_{2,47} = 41,51$   $p < 0,01$ ) con los dos tratamientos empleados. El estrés agudo provocó un aumento significativo ( $F_{1,47} = 7,15$   $p < 0,01$ ) de los niveles plasmáticos de LH en los animales tratados con salino, aumento que fue bloqueado por la administración de las dos drogas utilizadas. Se observó una interacción entre el efecto estrés-tratamiento, ya que, el estrés no modificó la LH en los grupos tratados con  $\alpha$ -m-p-tyr y DDC.

b) **FSH:** Como muestra la Fig. 8, a diferencia de lo que ocurre con la LH, el estrés no modificó los niveles plasmáticos de FSH. El grupo tratado con  $\alpha$ -m-p-tyr presenta unos niveles plasmáticos de FSH significativamente inferiores a los observados en los animales tratados con salino ( $p < 0,01$ ) mientras que el tratamiento con DDC no modificó los niveles plasmáticos de esta hormona.

c) **PRL:** Los tratamientos empleados modificaron la secreción de PRL ( $F_{2,48} = 87,48$   $p < 0,01$ ), ya que, como se puede observar en la Fig.9 la inhibición de la síntesis de dopamina mediante el tratamiento con  $\alpha$ -m-p-tyr aumentó significativamente los niveles plasmáticos de PRL ( $p < 0,01$ ), mientras que por el contrario los animales tratados con DDC presentaron una disminución de la secreción de PRL ( $p < 0,01$ ). El estrés agudo por inmovilización provocó un aumento significativo ( $F_{1,48} = 43,6$   $p < 0,01$ ) de los niveles plasmáticos de PRL en todos los grupos estudiados, si bien dicha respuesta fue de diferente escala en cada grupo.

**d) Corticosterona:** La Fig. 10 muestra el efecto del tratamiento con  $\alpha$ -m-p-tyr y DDC sobre la respuesta de corticosterona al estrés. Como puede observarse el estrés aumentó significativamente ( $F_{1,49} = 39,35$   $p < 0,01$ ) los niveles de corticosterona en el suero. Las drogas utilizadas indujeron un aumento significativo de los niveles basales de corticosterona ( $F_{2,49} = 10,57$   $p < 0,01$ ). La interacción estrés-tratamiento fue significativa ( $F_{2,49} = 5,578$   $p < 0,01$ ), ya que, el tratamiento con DDC produjo un aumento de esta hormona de tal magnitud que los niveles de corticosterona en estos animales sin estresar fue casi similar al de las ratas estresadas.

**e) Contenido hipotalámico de LHRH:** Los niveles hipotalámicos de LHRH no se modificaron tras el estrés, ni tampoco con ninguno de los tratamientos empleados (Fig. 11).

**f) Contenido hipotalámico de dopamina:** Los resultados se representan en la Fig. 12. El estrés no modificó significativamente el contenido hipotalámico de dopamina. Sin embargo, como era de esperar el grupo de animales que fueron tratados con  $\alpha$ -m-p-tyr tanto estresados como controles presentaron unos niveles de dopamina significativamente inferiores a los demás grupos ( $p < 0,01$ ). Asimismo los niveles de este neurotransmisor en el grupo tratado con esta  $\alpha$ -m-p-tyr y estresado tienden a ser ligeramente inferiores a los de su respectivo grupo control sin estresar, si bien dicha diferencia no fue significativa.

**g) Contenido hipotalámico de noradrenalina:** Al igual que lo observado con la dopamina, la inmovilización durante 30 minutos no modificó el contenido hipotalámico de noradrenalina. Sin embargo, los tratamientos con  $\alpha$ -m-p-tyr y DDC produjeron tanto en los animales controles como estresados un descenso significativo ( $F_{2,46} = 9,086$   $p < 0,01$ ) del contenido hipotalámico de noradrenalina. Además como podemos observar en la Fig. 13 el estrés tiende a aumentar ligeramente el contenido hipotalámico de noradrenalina en los animales controles.

LH pg/ml

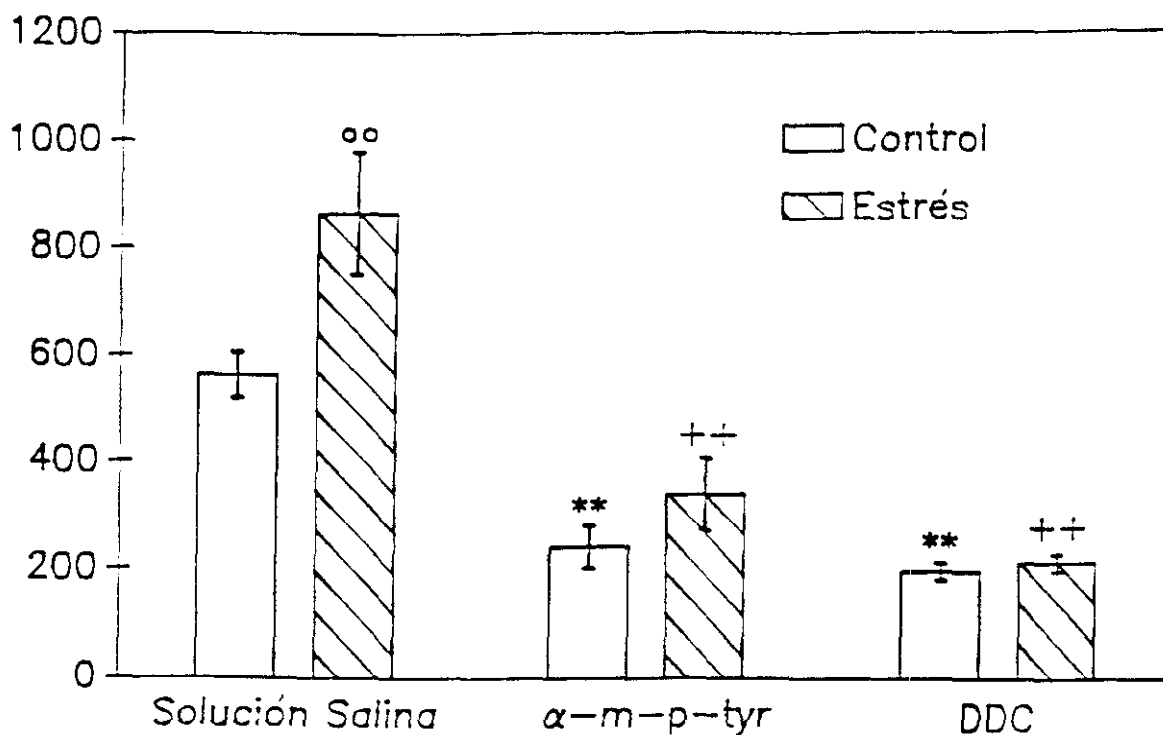


Figura 7: Valores séricos de LH en ratas controles o inmovilizadas durante 30 minutos tras la administración de  $\alpha$ -metil-para-tyroxina y dietildicarbamato. Existe interacción significativa  $p < 0.059$  entre el estrés y el tratamiento.

oo  $p < 0,01$  vs su respectivo control

\*\*  $p < 0,01$  vs solución salina control

++  $p < 0,01$  vs solución salina estrés

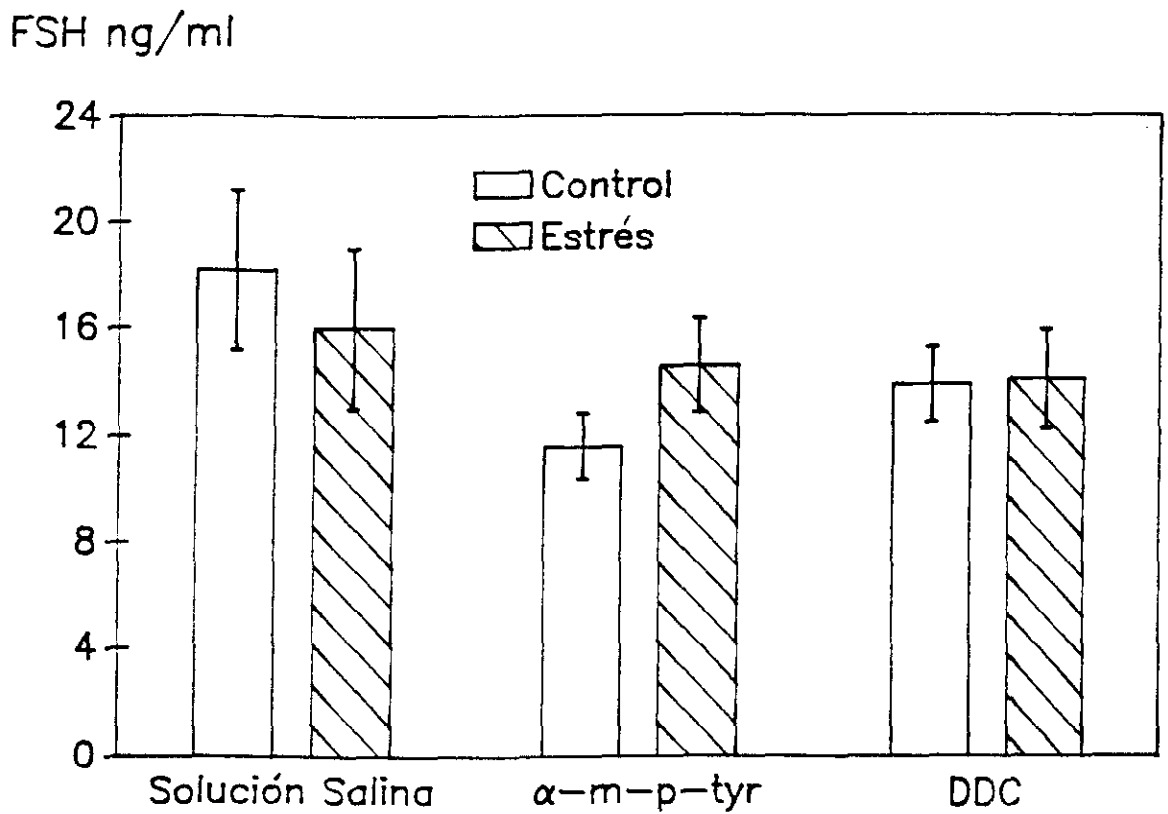
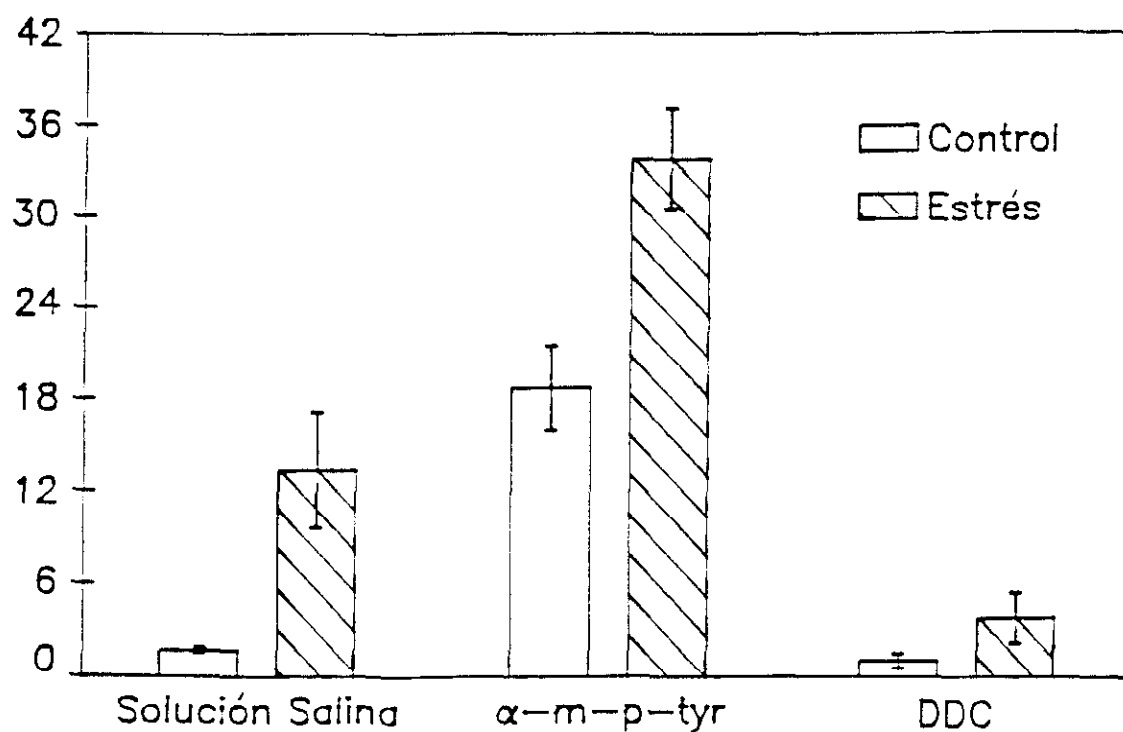


Figura 8: Efecto de la administración de  $\alpha$ -metil-para-tyroxina y dietildicarbamato sobre los niveles plasmáticos de FSH en ratas controles o inmovilizadas durante 30 minutos. Ni el estrés ni los tratamientos empleados modificaron significativamente la secreción de esta hormona.

PRL ng/ml



*Figura 9: Respuesta al estrés de la PRL sérica en ratas tratadas con varios inhibidores de la síntesis de catecolaminas. El estrés aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles de esta hormona. De los tratamientos empleados la  $\alpha$ -metil-para-tyroxina aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles de PRL, mientras que el DDC los disminuyó  $p < 0,01$ .*

Corticosterona  $\mu\text{g}/\text{dl}$

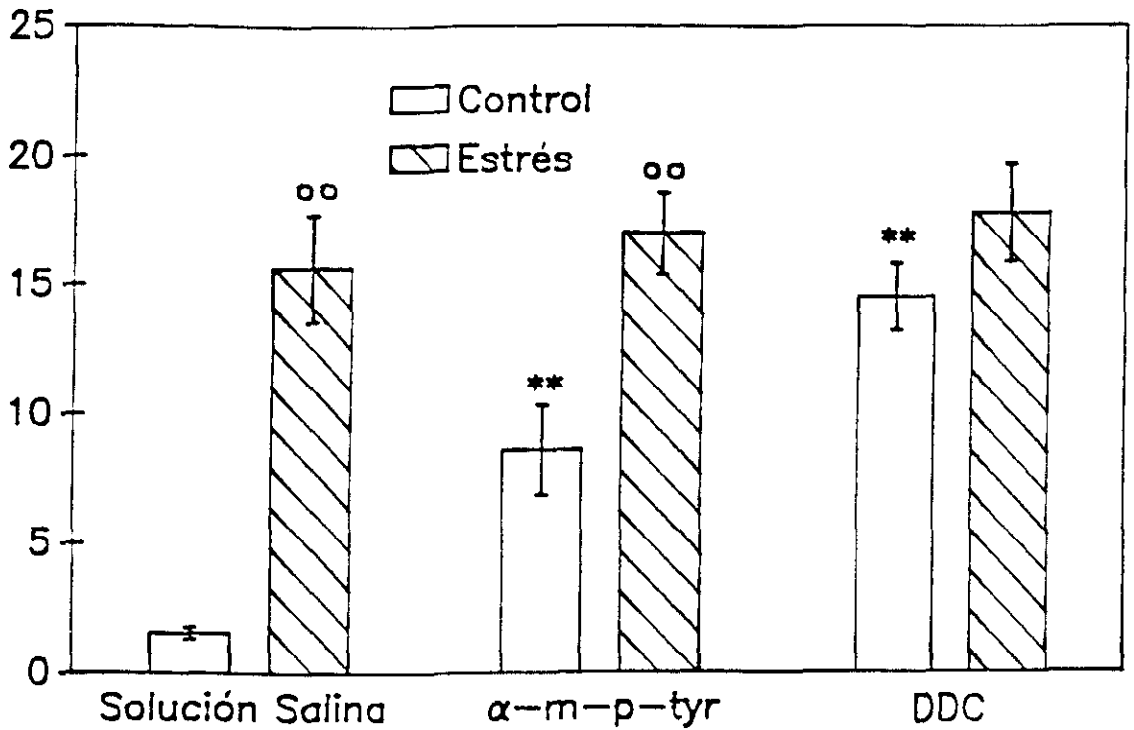
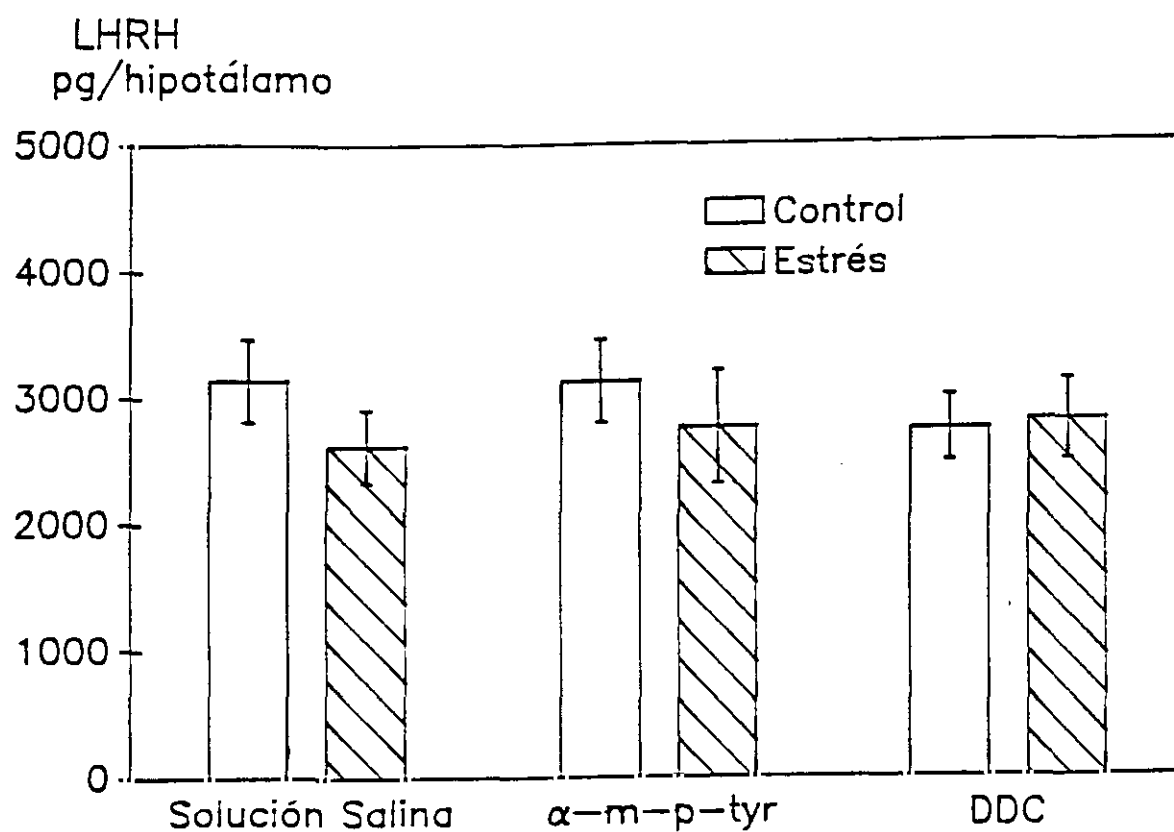


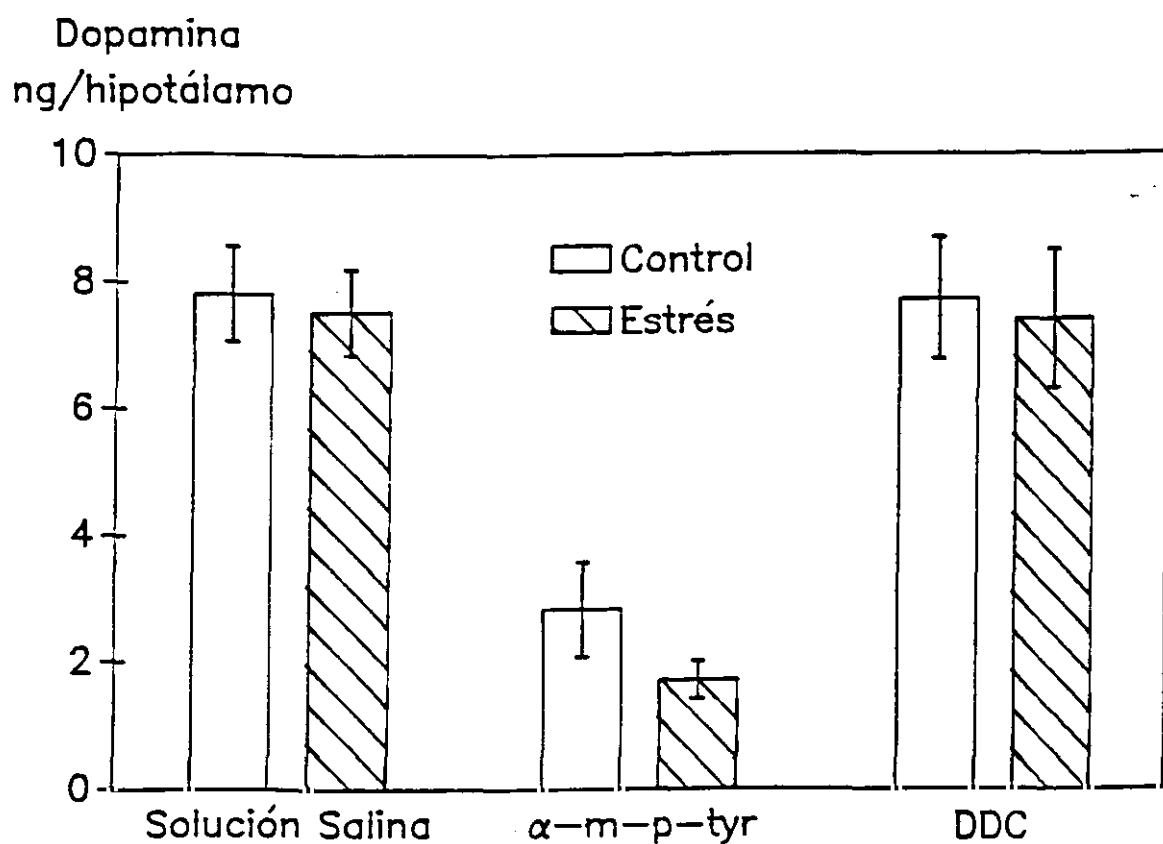
Figura 10: Niveles plasmáticos de corticosterona en ratas tratadas con  $\alpha$ -metil-para-tyroxina y dietildicarbamato en situación basal o tras 30 minutos de inmovilización. El estrés aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles plasmáticos de esta hormona y los tratamientos empleados también aumentaron significativamente  $p < 0,01$  los niveles de corticosterona, existiendo interacción significativa  $p < 0,01$  entre el tratamiento y el estrés.

$\circ\circ$   $p < 0,01$  vs su respectivo grupo control

$**$   $p < 0,01$  vs grupo de solución salina control

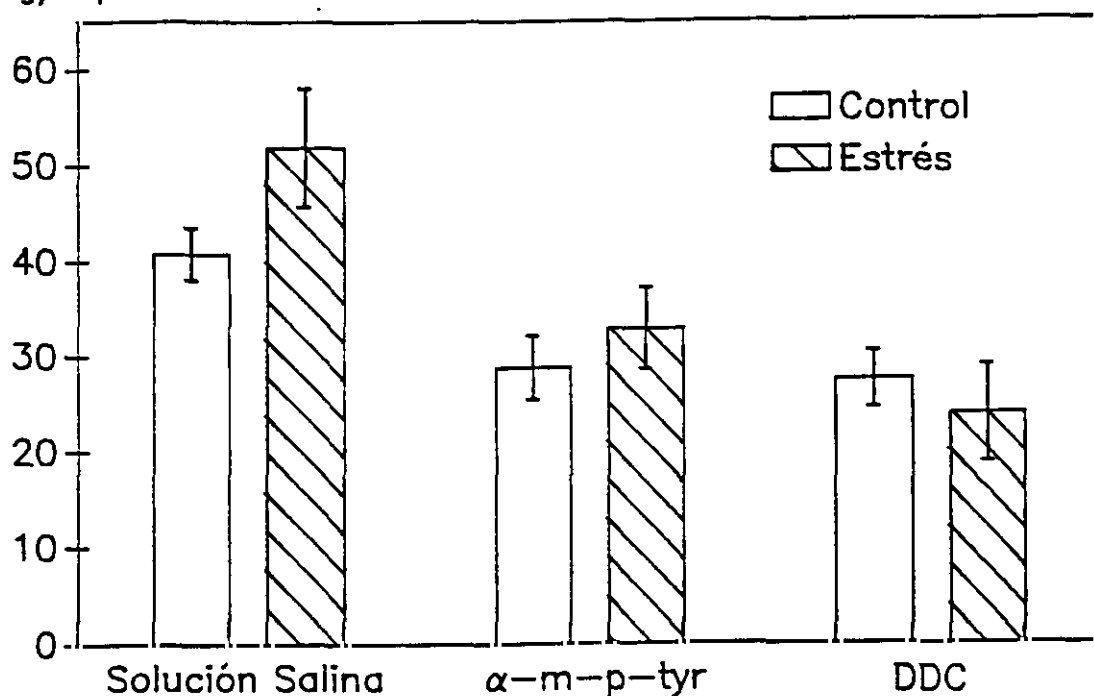


*Fig 11: Efecto del tratamiento con distintos inhibidores de la síntesis de catecolaminas sobre el contenido hipotalámico de LHRH en ratas controles e inmovilizadas durante 30 minutos. Ni el estrés ni los tratamientos empleados modificaron el contenido hipotalámico de LHRH.*



*Fig 12: Contenido hipotalámico de dopamina en ratas controles o inmovilizadas durante 30 minutos tratadas con  $\alpha$ -metil-para-tyroxina y dietildicarbamato. El estrés no modificó el contenido hipotalámico de dopamina pero el tratamiento con  $\alpha$ -metil-para-tyroxina disminuyó significativamente  $p < 0,01$  el contenido hipotalámico de dopamina.*

Noradrenalina  
ng/hipotálamo



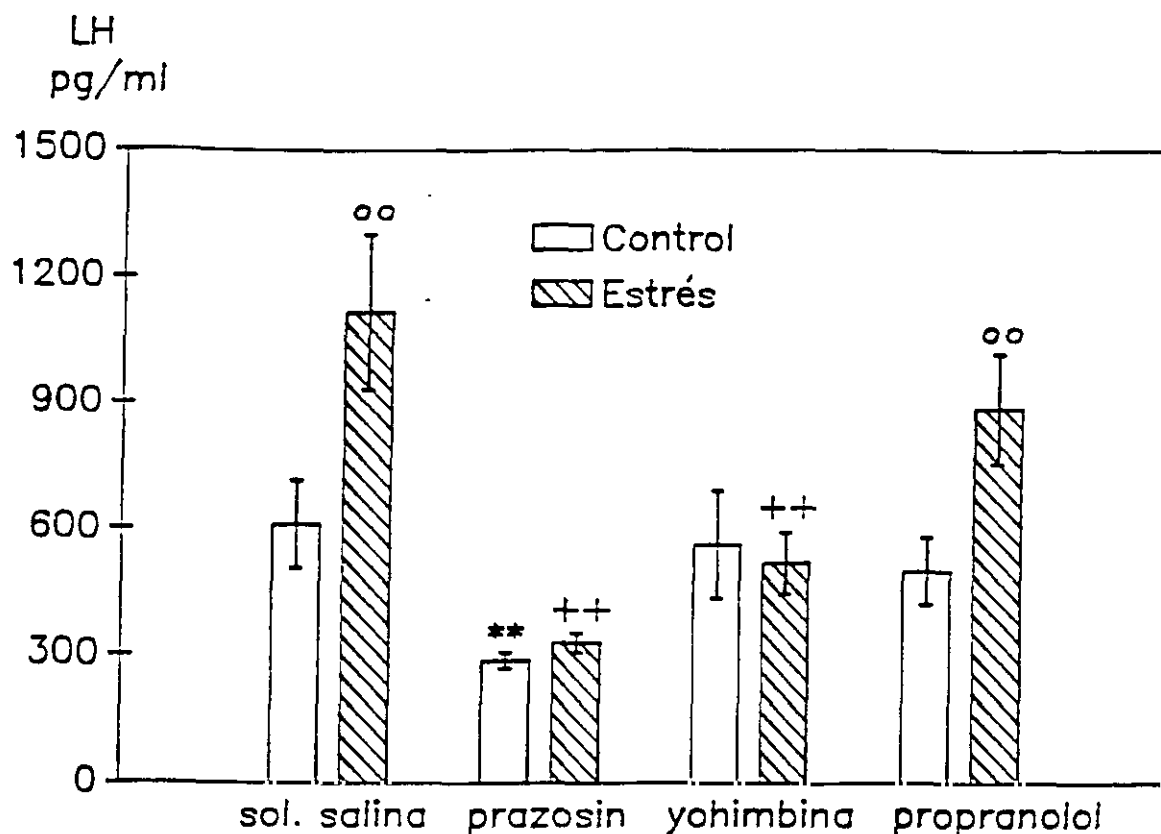
*Figura 13: Efecto de la administración de distintos inhibidores de la síntesis de catecolaminas sobre el contenido hipotalámico de noradrenalina en animales controles o inmobilizados durante 30 minutos. Tanto la α-metil-para-tyroxina como el dietildicarbamato disminuyeron significativamente  $p < 0,01$  el contenido hipotalámico de noradrenalina.*

**1.2. Efecto de la administración de yohimbina, prazosín y propranolol.**

a) **LH:** Los resultados se representan en la Fig. 14. Al igual que ocurría en el experimento anterior el estrés agudo por inmovilización produjo un aumento significativo ( $F_{1,63} = 8,29$   $p < 0,01$ ) de los niveles de LH. Los tratamientos empleados produjeron igualmente una disminución significativa de los niveles de esta hormona ( $F_{3,63} = 10,81$   $p < 0,01$ ) y se observó una interacción significativa de los efectos estrés-tratamientos ( $F_{3,63} = 3,15$   $p < 0,05$ ). dicha interacción puede deberse a que tanto el prazosín como la yohimbina bloquearon el incremento de los niveles plasmáticos de LH tras el estrés. En los animales sin estresar sólo el prazosín disminuyó los niveles plasmáticos de LH ( $p < 0,01$ ), mientras que ni la yohimina ni el propranolol modificaron significativamente la secreción basal de LH.

b) **PRL:** El estrés produjo, como ya habíamos descrito en el experimento anterior, un aumento significativo ( $F_{1,68} = 84,11$   $p < 0,01$ ) de los niveles plasmáticos de esta hormona. En lo referente al efecto de los antagonistas empleados, la administración de yohimbina produjo un aumento en los niveles plasmáticos de la misma ( $p < 0,01$ ), mientras que el prazosín tuvo el efecto contrario produciendo una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de los niveles plasmáticos de PRL. El propranolol no modificó significativamente la secreción de PRL. Ninguno de los tratamientos empleados bloqueó la respuesta de PRL al estrés (Fig. 15).

c) **Corticosterona:** El estrés provocó un gran aumento ( $F_{1,71} = 145,64$   $p < 0,01$ ) de los niveles plasmáticos de corticosterona. Los tratamientos empleados modificaron los niveles de esta hormona ( $F_{3,71} = 5,52$   $p < 0,01$ ) y hubo interacción estrés-tratamiento ( $F_{3,71} = 3,72$   $p < 0,05$ ) debido a que la yohimbina aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) los niveles de corticosterona hasta niveles próximos a los de los animales estresados. Ni el prazosín, ni el propranolol modificaron ni los niveles plasmáticos de corticosterona basales ni tras estrés (Fig. 16).

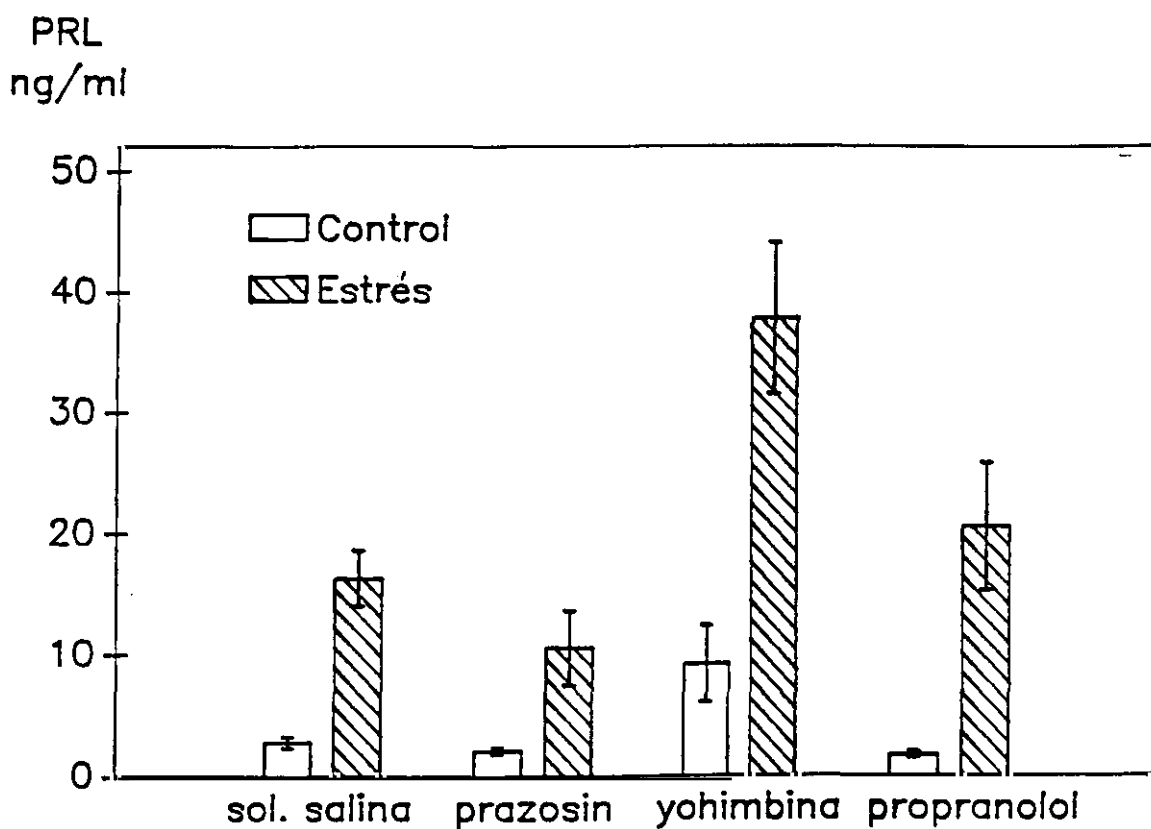


*Figura 14: Respuesta de la LH al estrés por inmovilización durante 30 minutos en ratas tratadas con distintos antagonistas adrenérgicos. El estrés aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles de esta hormona. Existe interacción significativa  $p < 0,05$  tratamiento-estrés.*

*oo  $p < 0,01$  vs su respectivo grupo control*

*\*\*  $p < 0,01$  vs grupo solución salina control*

*++  $p < 0,01$  vs grupo solución salina estrés*



*Figura 15: Niveles plasmáticos de PRL en animales controles e inmovilizados durante 30 minutos tras administración de distintos antagonistas adrenérgicos. El estrés aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles plasmáticos de esta hormona, mientras que el prazosín la disminuyó  $p < 0,05$  y la yohimbina los aumentó  $p < 0,01$ .*

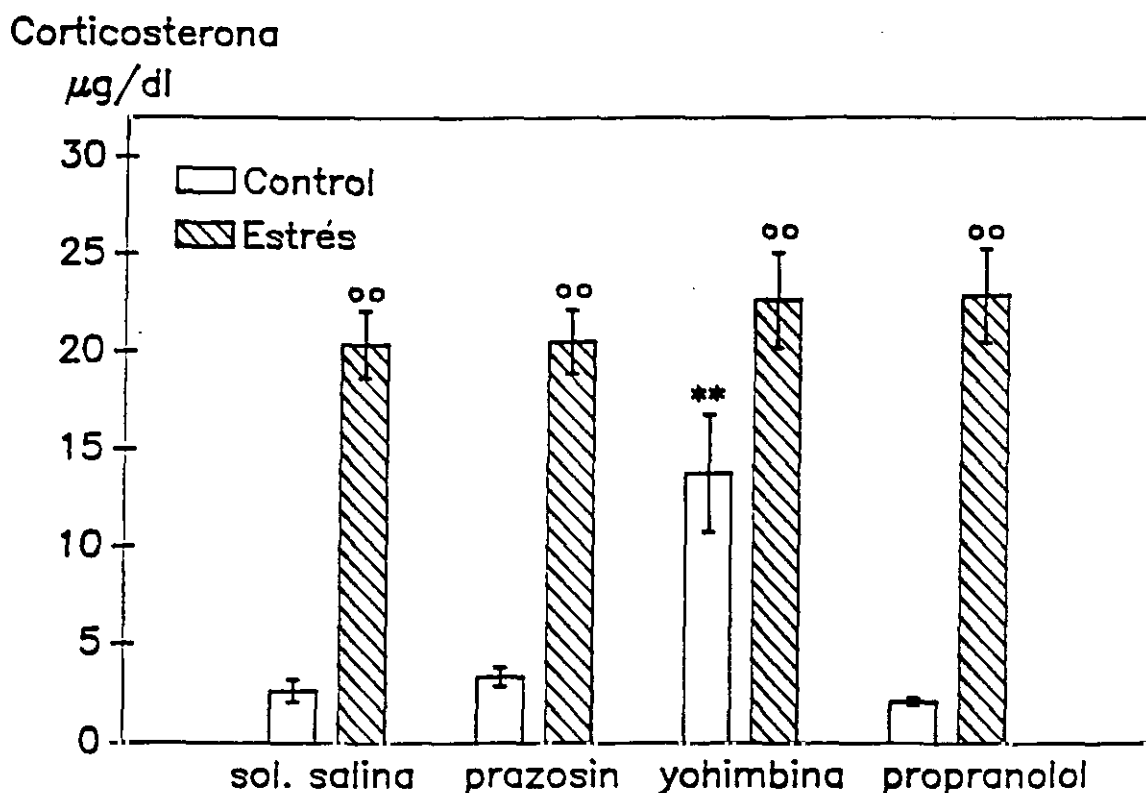


Figura 16: Efecto de la administración de distintos antagonistas adrenérgicos sobre la respuesta de corticosterona a la inmovilización durante 30 minutos. El estrés aumentó los niveles plasmáticos de corticosterona en todos los grupos estudiados  $p < 0,01$ , pero existe interacción significativa  $p < 0,05$  entre el efecto del estrés y el de los tratamientos.

oo  $p < 0,01$  vs su respectivo grupo control

\*\*  $p < 0,01$  vs grupo solución salina control

## **2.- PAPEL DE LA CRH Y LOS OPIOIDES ENDOGENOS EN LA INHIBICION DE LA FUNCION GONADOTROPA DURANTE EL ESTRES CRONICO.**

### **2.1.Efecto de la administración central de anticuerpo anti-CRH sobre la respuesta de gonadotropinas y prolactina al estrés crónico.**

a) **LH:** La administración de antisuero anti-CRH de forma aguda produjo un aumento significativo ( $F_{1,24} = 9,91$   $p < 0,01$ ) de los niveles basales de esta hormona (Fig. 17). En esta ocasión la inmovilización durante 30 minutos no provocó ningún aumento significativo de los niveles plasmáticos de LH ni en los animales tratados con suero normal ni en los tratados con anti-CRH.

El análisis de la varianza de los datos obtenidos durante el estrés crónico indicaron una interacción estrés-tratamiento, ya que al comparar las medias encontramos que el estrés disminuyó la LH sérica en los animales tratadas con suero ( $p < 0,01$ ), efecto que se bloqueó por el anticuerpo (Fig. 18).

b) **FSH:** Los resultados de la administración de anticuerpo anti-CRH sobre la secreción de FSH aparecen representados en la Fig. 19. La inmovilización durante cuatro días consecutivos produjo una disminución significativa ( $F_{1,37} = 6,21$   $p < 0,05$ ) de los niveles plasmáticos de esta hormona tanto en los animales tratados con suero de conejo como con antisuero anti-CRH. El tratamiento empleado no modificó la secreción basal de esta gonadotropina ni bloqueó su descenso en respuesta al estrés.

c) **PRL:** En la Fig. 20 está representado el efecto de la administración aguda de anticuerpo anti-CRH a animales tanto controles como inmovilizados durante 30 minutos. La inmunoneutralización de la CRH aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) los niveles plasmáticos de PRL en los animales sin

estresar. El estrés agudo produjo un aumento significativo de los niveles plasmáticos de PRL ( $F_{1,27} = 44,867$   $p < 0,01$ ). La interacción estrés-tratamiento fue significativa ( $F_{1,27} = 4,82$   $p < 0,05$ ), esto se debe a que el anticuerpo aumenta la secreción de PRL en situación basal ( $p < 0,01$ ), y no en los estresados.

Como podemos observar en la Fig. 21, el estrés crónico provocó una disminución significativa ( $F_{1,37} = 28,37$   $p < 0,01$ ) de los niveles plasmáticos de esta hormona. Los animales a los que se administró intracerebroventricularmente anticuerpo anti-CRH presentaron una disminución de los niveles de PRL tras el estrés de igual magnitud que la del grupo control.

**d) Corticosterona:** El estrés agudo causó un aumento significativo ( $F_{1,23} = 23,5$   $p < 0,01$ ) en los niveles plasmáticos de corticosterona. La administración del antisuero redujo la secreción de corticosterona tanto en el grupo control como en el estresado ( $F_{2,3} = 4,82$   $p < 0,05$ ) (Fig. 22).

Como era de esperar el estrés crónico produjo un aumento significativo ( $F_{1,35} = 40,479$   $p < 0,01$ ) de los niveles plasmáticos de corticosterona. La administración central del anticuerpo anti-CRH produjo una disminución significativa ( $F_{1,35} = 12,36$   $p < 0,01$ ) de los niveles plasmáticos basales de corticosterona, y existe interacción significativa ( $F_{1,35} = 8,43$   $p < 0,01$ ) estrés-tratamiento ya que a pesar de que el tratamiento modifica la secreción basal no bloquea la respuesta al estrés (Fig. 23).

**e) Contenido hipotalámico de LHRH:** En la Fig. 24 se muestra el contenido hipotalámico de LHRH tras cuatro días de estrés en los distintos grupos estudiados. El estrés crónico disminuyó significativamente ( $F_{1,25} = 4,94$   $p < 0,05$ ) el contenido hipotalámico de LHRH. Aunque ni la interacción estrés-tratamiento ni el tratamiento fueron significativos, el descenso por el estrés en el grupo de suero fue hasta un 47,5% y en el tratado con el antisuero descendió sólo hasta un 71%.

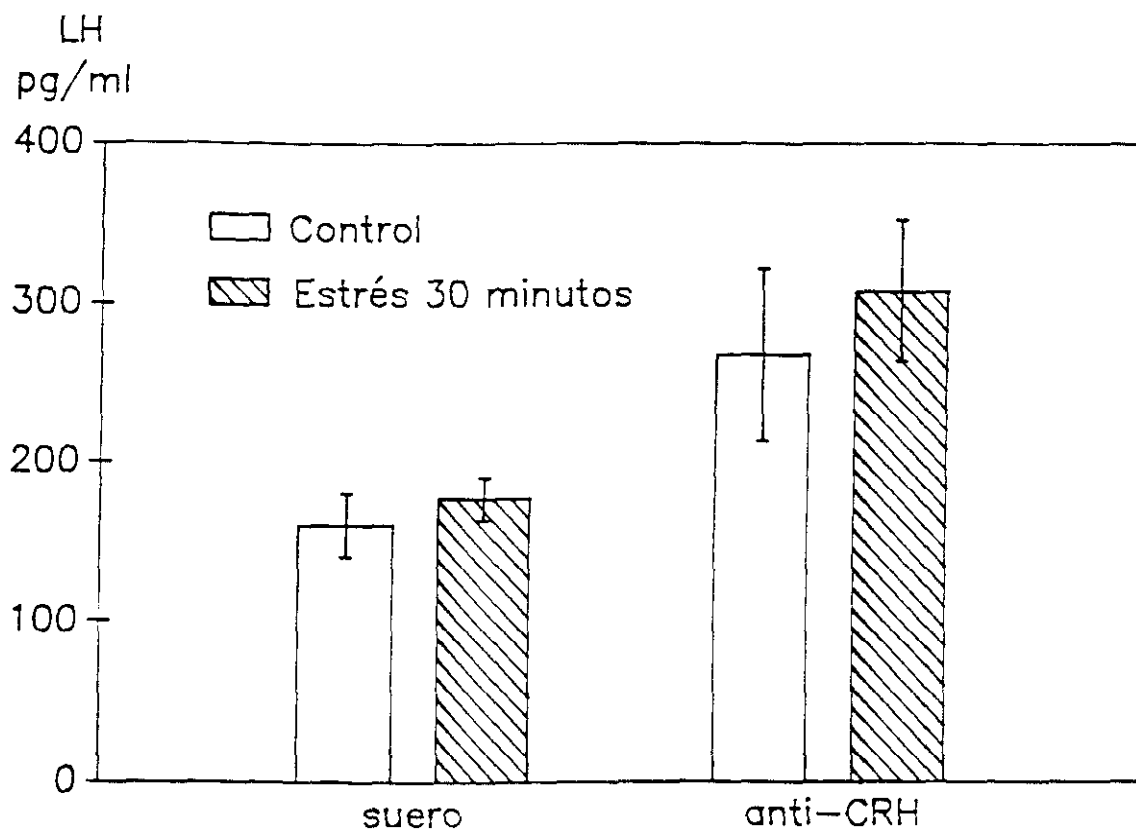


Figura 17: Niveles plasmáticos de LH en ratas tratadas con antisuero anti-CRH y sometidas a inmovilización durante 30 minutos. El antisuero aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles de esta hormona.

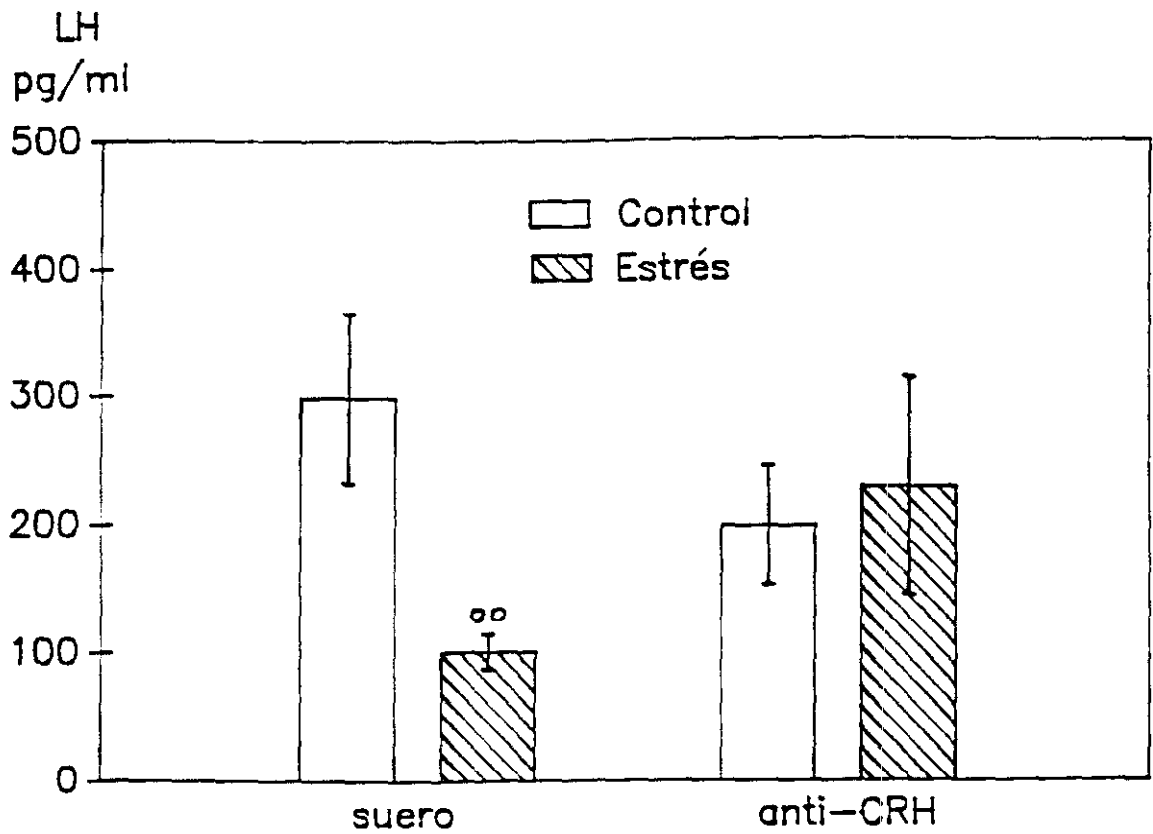
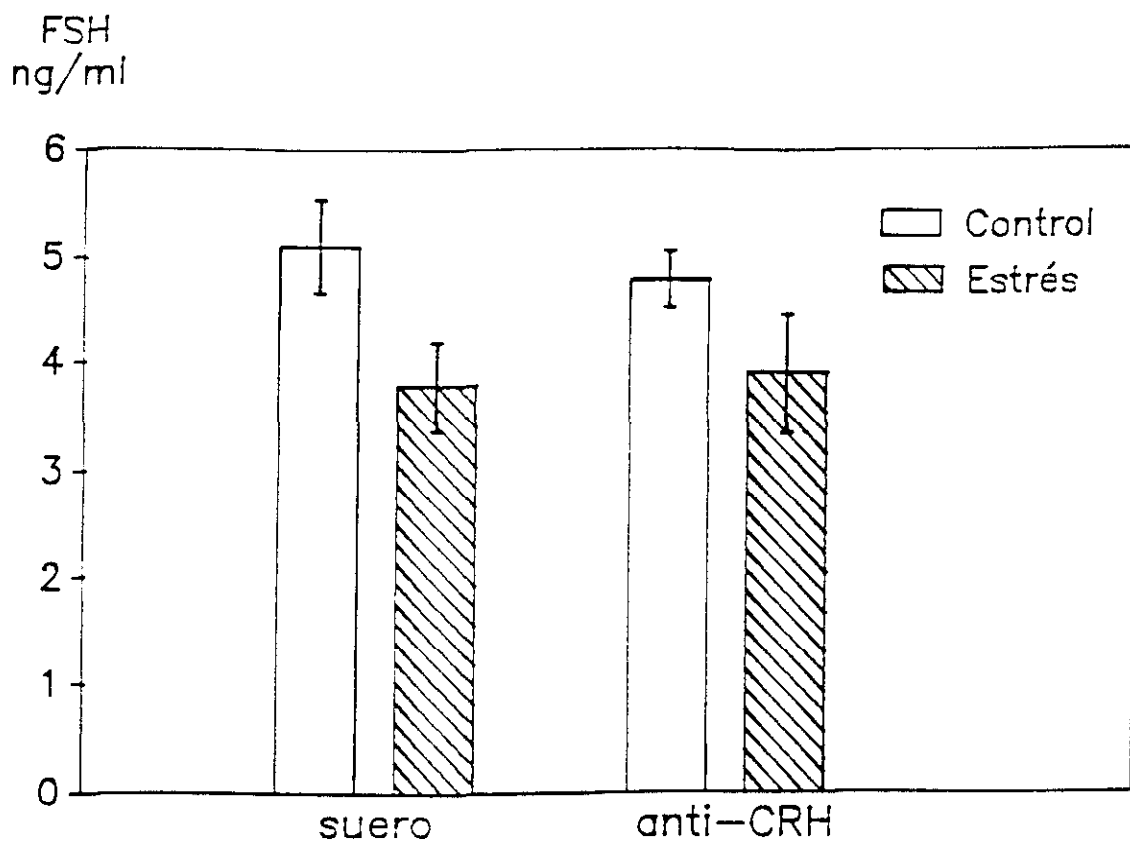


Figura 18: Respuesta de la LH plasmática a la inmovilización crónica en ratas tratadas con anti-CRH. Existe interacción  $p < 0,07$  entre los efectos del estrés y del antisuero.

oo  $p < 0,01$  vs su respectivo grupo control



*Figura 19: Efecto de la administración de antisuero anti-CRH sobre la respuesta de FSH a la inmovilización crónica. El estrés disminuyó significativamente  $p < 0,05$  los niveles de esta hormona.*

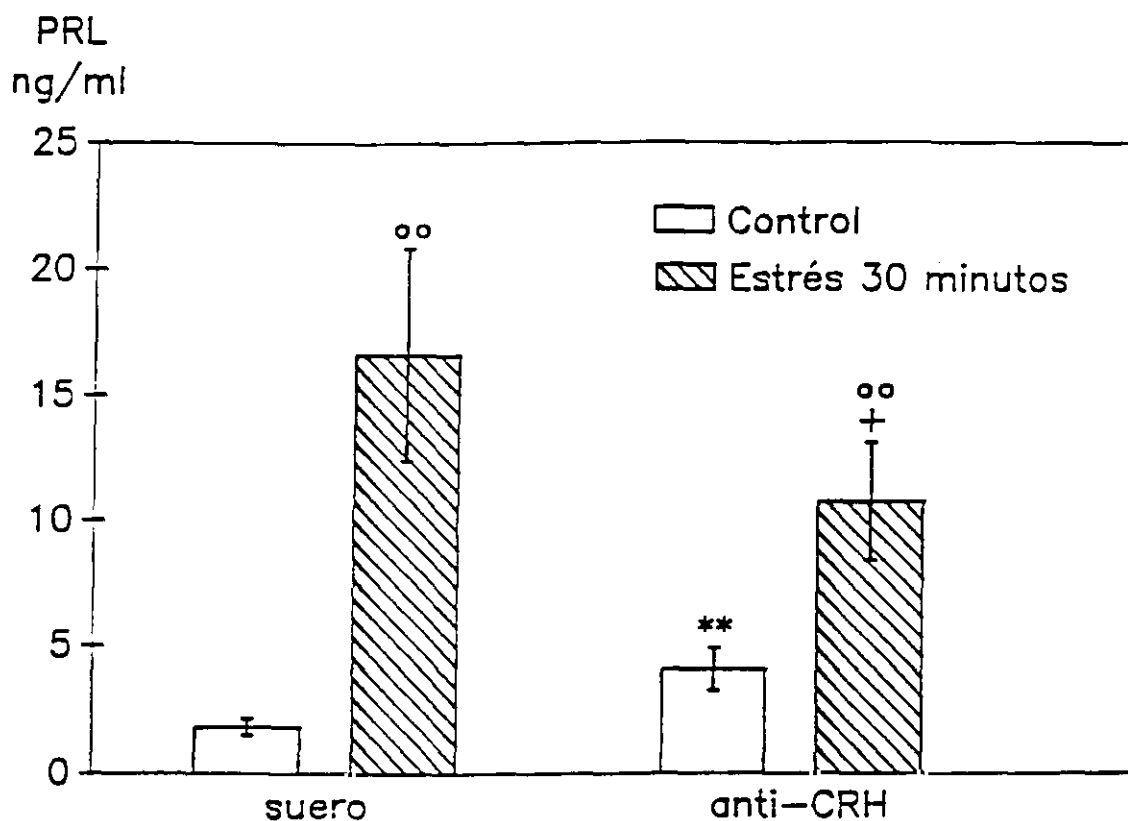


Figura 20: Niveles plasmáticos de PRL en ratas tratadas con antisuero anti-CRH y sometidas a inmovilización durante 30 minutos. El estrés aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles plasmáticos de esta hormona, la interacción entre el estrés y el tratamiento fue significativa  $p < 0,05$ .

oo  $p < 0,01$  vs su respectivo grupo control

\*\*  $p < 0,01$  vs grupo solución salina control

+  $p < 0,05$  vs grupo solución salina estrés

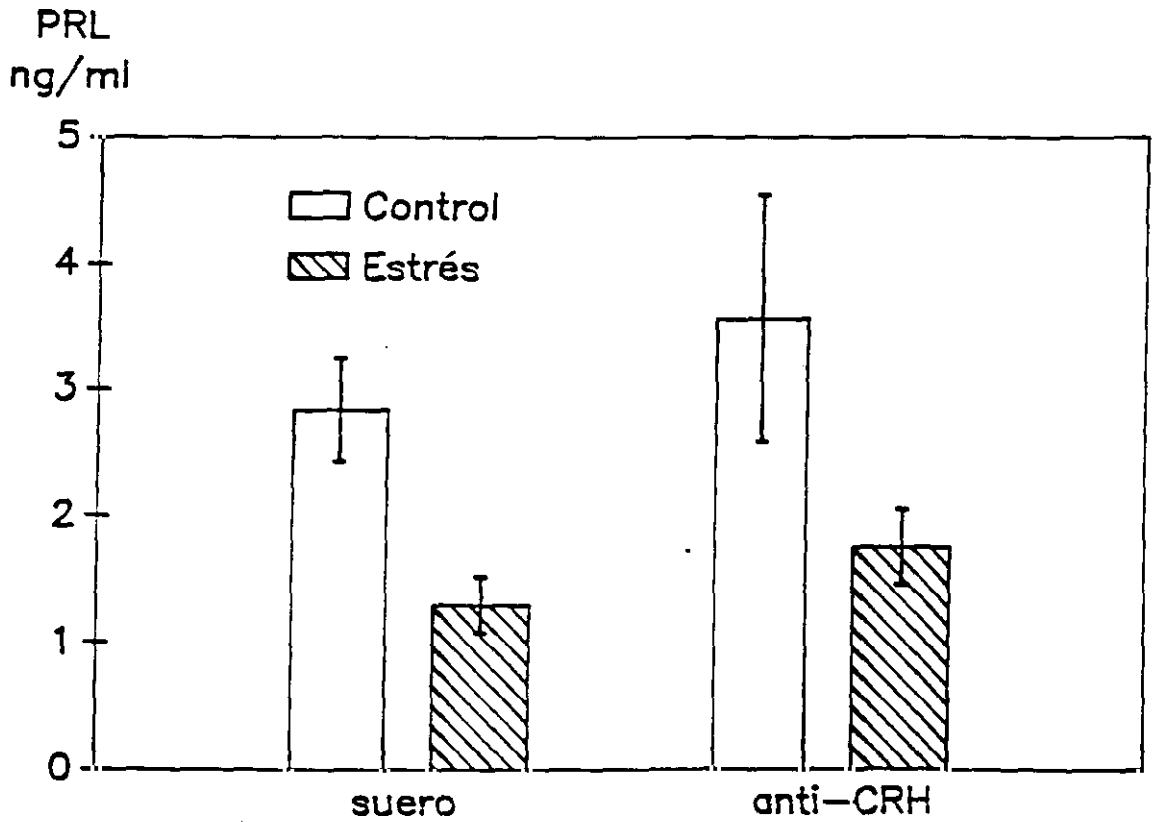
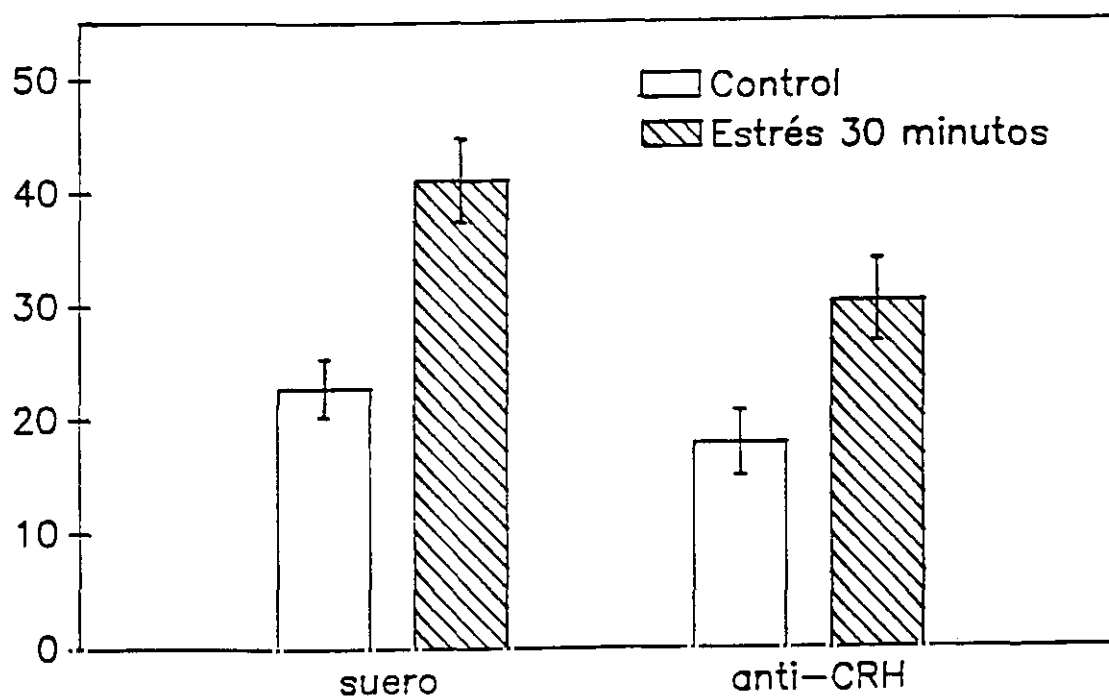


Figura 21: Respuesta al estrés crónico de la PRL plasmática tras administración de antisuero anti-CRH a animales controles o inmovilizados crónicamente. el estrés disminuyó significativamente  $p < 0,01$  los niveles plasmáticos de esta hormona.

Corticosterona  
 $\mu\text{g/dl}$



*Figura 22: Niveles plasmáticos de corticosterona en ratas tratadas con anti-CRH en situación basal o tras 30 minutos de inmovilización. El estrés aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles de corticosterona y el tratamiento disminuyó significativamente  $p < 0,05$  los niveles de esta hormona.*

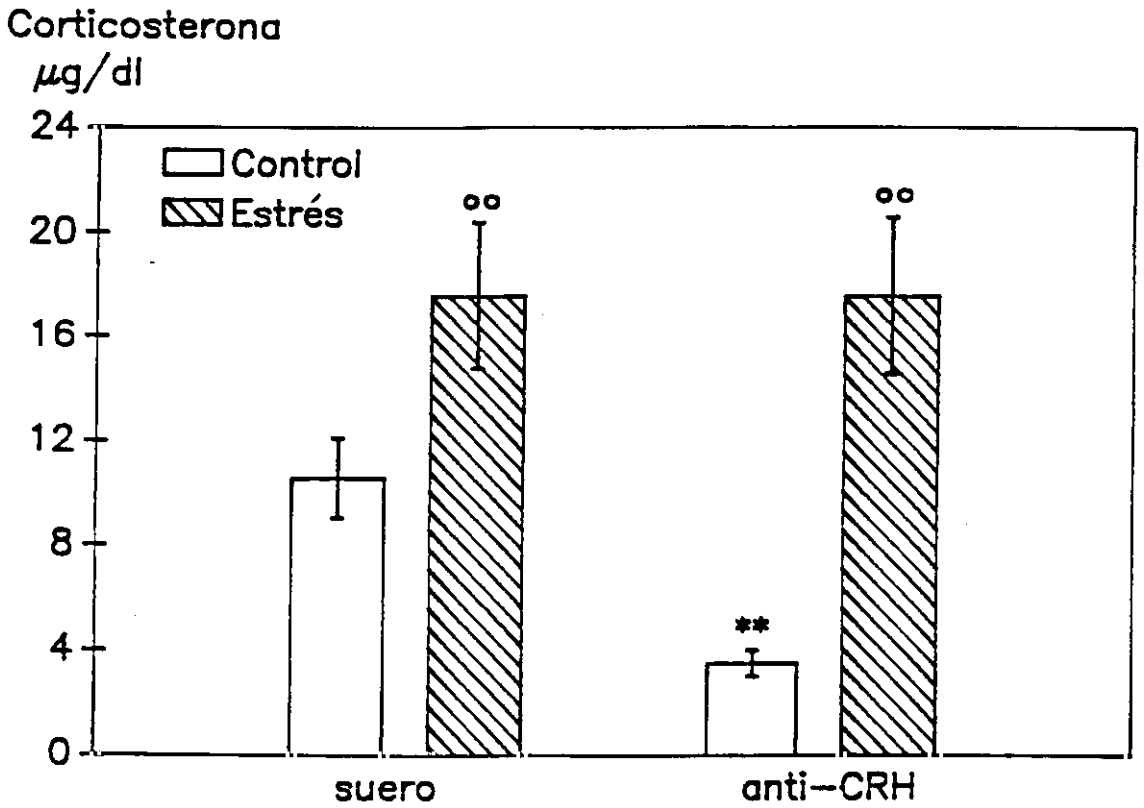


Figura 23: Efecto del tratamiento con anti-CRH en la respuesta de corticosterona a la inmovilización crónica. El estrés aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles de esta hormona, el tratamiento disminuyó significativamente  $p < 0,01$  los niveles de la misma y existe interacción entre los efectos del estrés y del antisuero. significativa  $p < 0,01$ .

oo  $p < 0,01$  vs su respectivo grupo control

\*\*  $p < 0,01$  vs grupo solución salina control

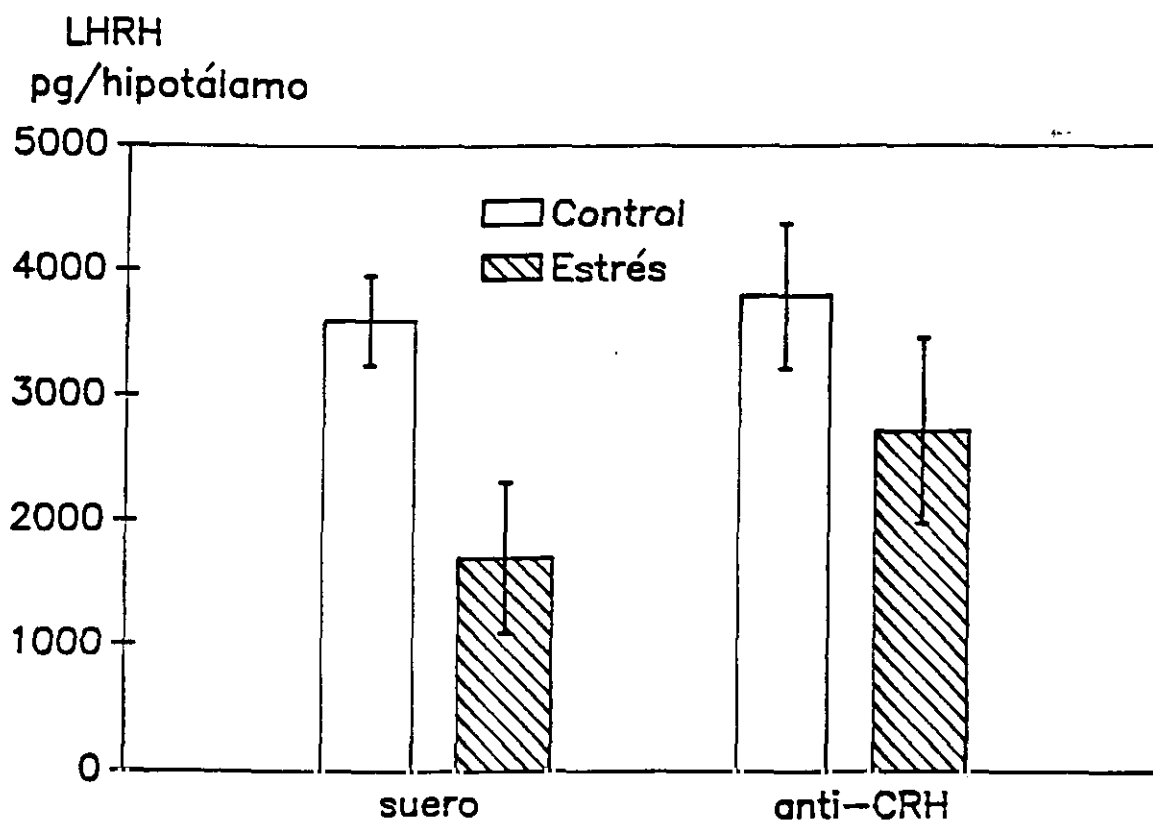


Figura 24: Contenido hipotalámico de LHRH en ratas tratadas con antisuero anti-CRH tanto controles como inmobilizadas crónicamente. El estrés disminuyó significativamente  $p < 0,05$  el contenido hipotalámico de esta hormona.

## **2.2.Efecto de la administración de naltrexona.**

a) **LH:** El tratamiento con naltrexona durante los 4 días de estrés consecutivos produjo en los animales un incremento significativo ( $F_{1,42} = 6,3$   $p < 0,05$ ) de los niveles circulantes de esta hormona. No existe interacción significativa entre el tratamiento utilizado y la inmovilización, puesto que el estrés crónico indujo un descenso significativo ( $F_{1,42} = 13,94$   $p < 0,01$ ) en las concentraciones séricas de LH tanto en el grupo de ratas tratadas con solución salina como en el tratado con naltrexona (Fig. 25).

Como podemos observar en la Fig. 26, a los 30 minutos de la administración de morfina se produce un descenso de los niveles plasmáticos de LH ( $t = 2,31$   $p < 0,05$ ). El tratamiento con naltrexona durante los 4 días que duró el estrés previno completamente el efecto de la morfina sobre la secreción de LH, puesto que los animales tratados con naltrexona presentaron los mismos valores plasmáticos de LH ya fueran inyectados con morfina o con solución salina.

b) **FSH:** Al igual de lo que ocurrió con la LH, el tratamiento con naltrexona durante 4 días aumentó los niveles plasmáticos de FSH ( $F_{1,38} = 15,68$   $p < 0,01$ ). La naltrexona no fue capaz de antagonizar el efecto inhibitor del estrés crónico sobre la FSH puesto que se produjo un descenso de la misma tanto en el grupo tratado con solución salina como en el tratado con naltrexona ( $F_{1,38} = 13,75$   $p < 0,01$ ) (Fig. 27). En la Fig. 28 se representa el efecto de la inyección de morfina que no fue capaz de modificar los niveles plasmáticos de FSH en el grupo de animales que recibió solución salina durante cuatro días.

c) **PRL:** El análisis de los datos reveló una interacción significativa ( $F_{1,36} = 2,97$   $p < 0,09$ ) debido a que el estrés disminuyó en el grupo tratado con solución salina ( $p < 0,01$ ) y no en el de naltrexona. Igualmente la naltrexona también descendió significativamente los niveles de PRL en el grupo sin estresar ( $p < 0,01$ ).

La inyección de morfina aumentó los niveles circulantes de PRL ( $t = 2,84$   $p < 0,01$ ) en las ratas no estresadas tratadas con solución salina durante cuatro días. Al igual de lo que observamos con la LH, la administración de naltrexona durante 4 días consecutivos previno completamente el efecto estimulante de la morfina sobre los niveles plasmáticos de PRL (Fig. 30).

**d) Corticosterona:** El análisis estadístico de los datos muestra que existe una interacción estrés-tratamiento significativa ( $F_{1,40} = 3,57$   $p < 0,06$ ) debida a que el estrés provocó un gran aumento ( $p < 0,01$ ) de los niveles plasmáticos de corticosterona en los dos grupos de animales estudiados controles y tratados con naltrexona y el tratamiento con esta droga aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) los niveles plasmáticos de corticosterona en los animales controles, sin modificar su respuesta al estrés (Fig. 31).

**e) Contenido hipotalámico de LHRH:** Como se muestra en la Fig. 32, tanto el estrés como el tratamiento con naltrexona modificaron el contenido hipotalámico de LHRH, existiendo una interacción significativa entre ambos efectos ( $F_{1,36} = 11,59$   $p < 0,01$ ). Dicha interacción la podemos explicar porque el estrés crónico indujo una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del contenido hipotalámico de LHRH en los animales tratados con solución salina, mientras que el grupo de animales estresados tratados con naltrexona presentan un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la LHRH hipotalámica tras ser sometidos a estrés crónico.

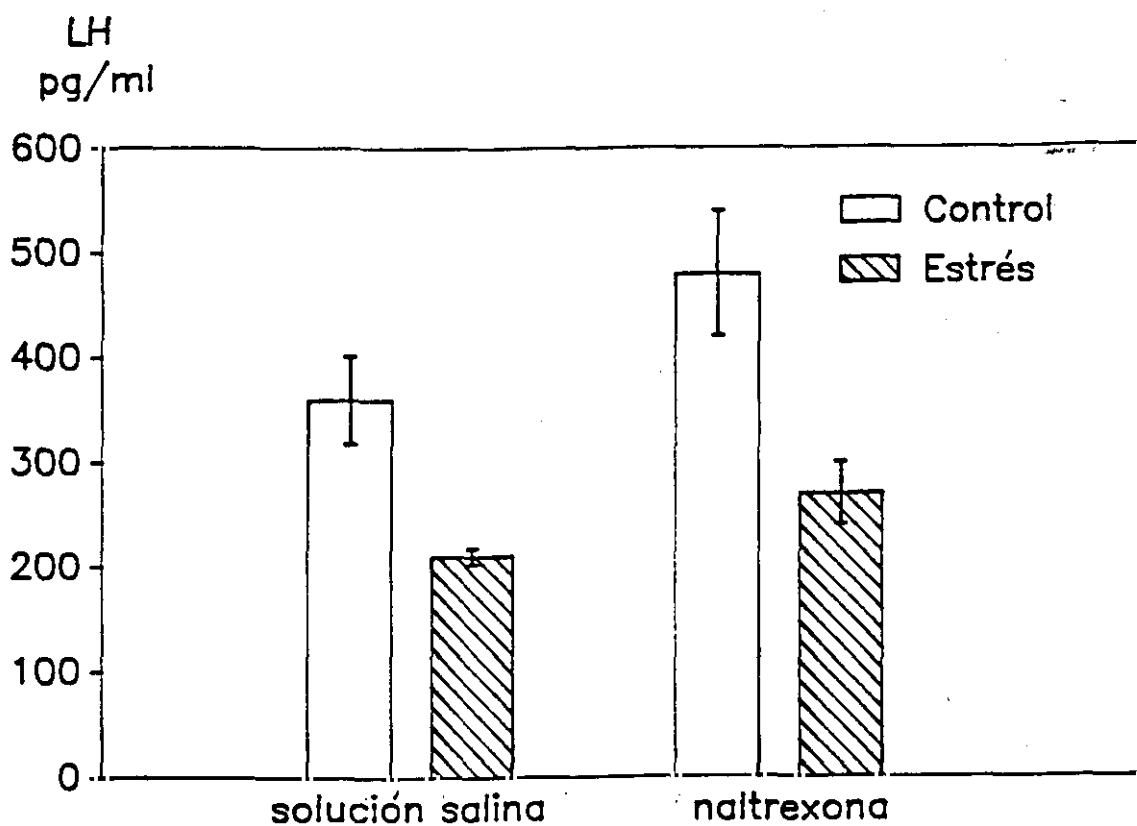
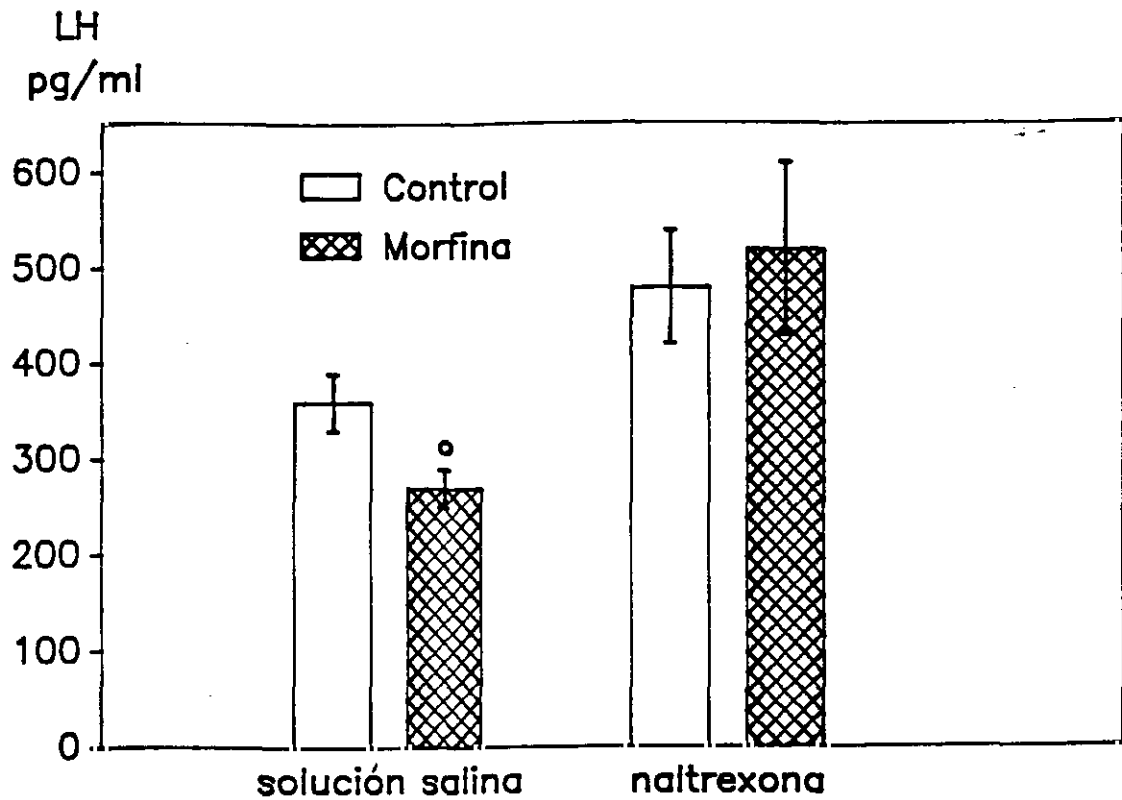
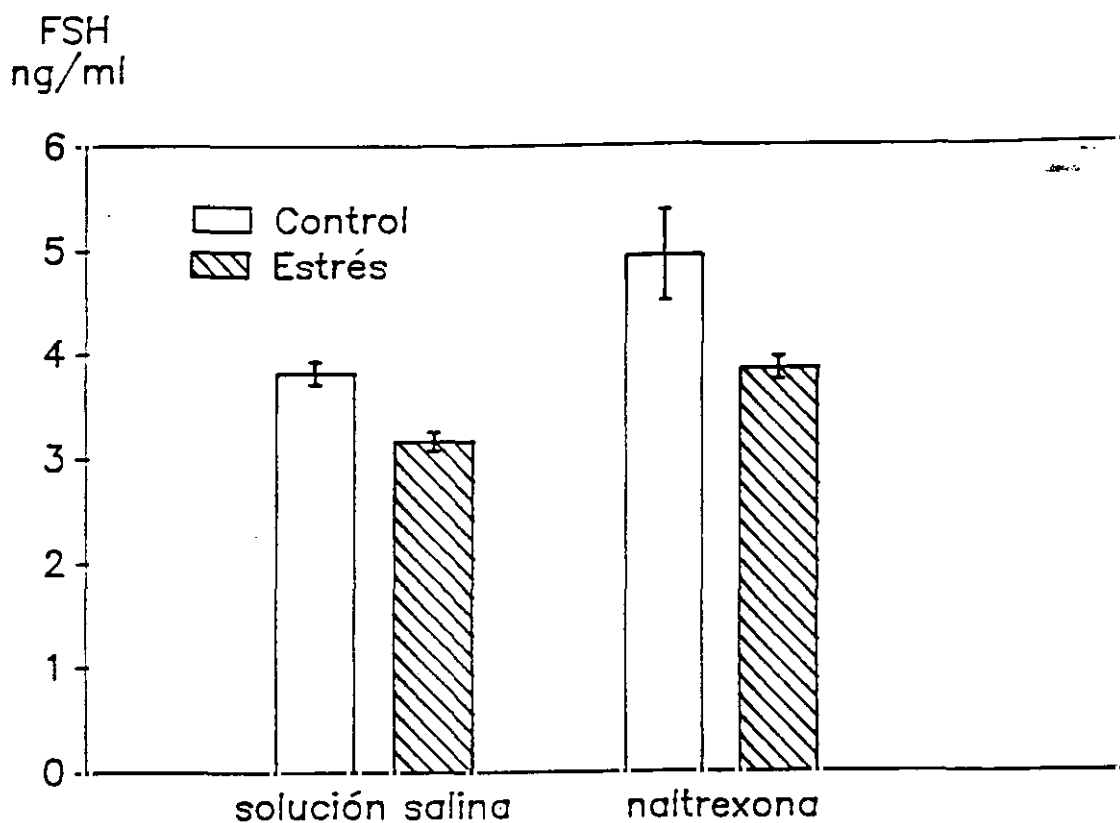


Figura 25: Niveles plasmáticos de LH tras la administración de naltrexona a ratas controles o inmobilizadas durante 4 días. El estrés disminuyó significativamente los niveles de esta hormona  $p < 0,01$ , mientras que el tratamiento con naltrexona los incrementó significativamente  $p < 0,05$ .

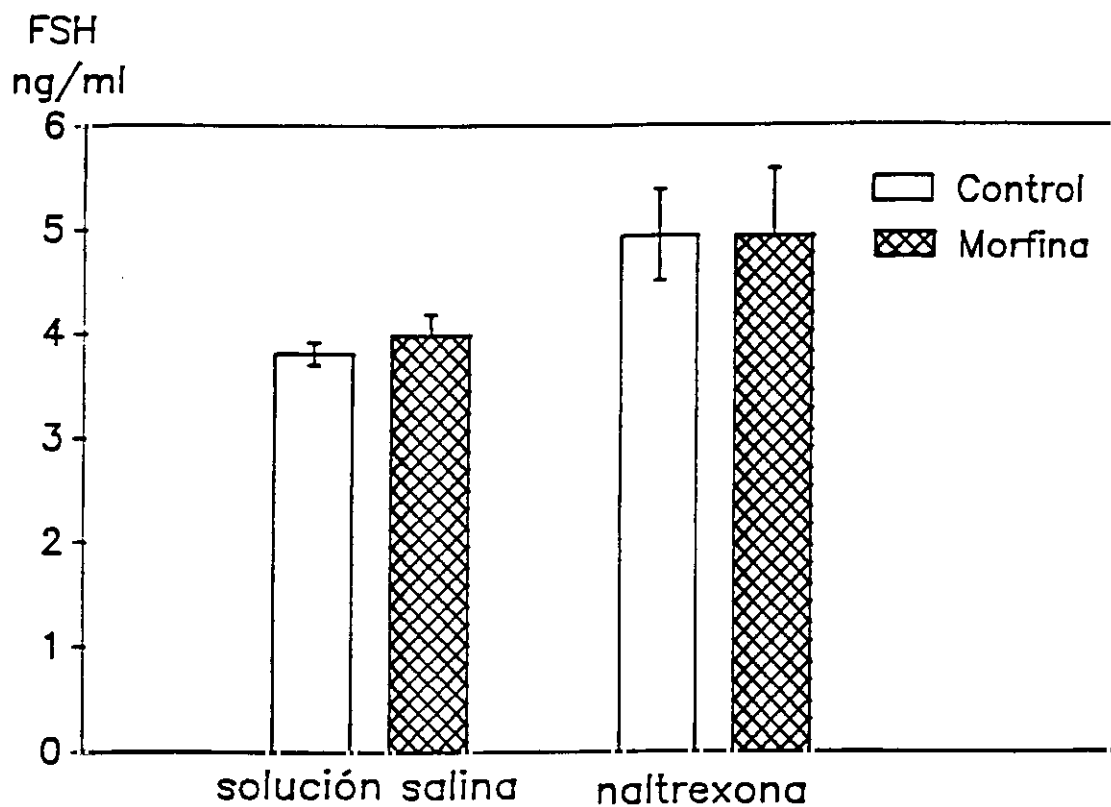


*Figura 26: Efecto de la administración de morfina sobre los niveles plasmáticos de LH en ratas tratadas previamente con naltrexona o solución salina. La morfina disminuyó significativamente  $p < 0,05$  los niveles plasmáticos de LH, sólo en el grupo tratado con solución salina.*

*\*  $p < 0,05$  vs grupo solución salina control*



*Figura 27: Respuesta de la FSH plasmática a la inmovilización crónica intermitente durante cuatro días en animales tratados con solución salina o naltrexona. El estrés disminuyó significativamente los niveles plasmáticos de esta hormona  $p < 0,01$  y el tratamiento con naltrexona los incrementó  $p < 0,01$ .*



*Figura 28: Efecto de la administración de morfina sobre los niveles plasmáticos de FSH en ratas tratadas previamente con naltrexona o solución salina. La morfina no modifica los niveles plasmáticos de FSH.*

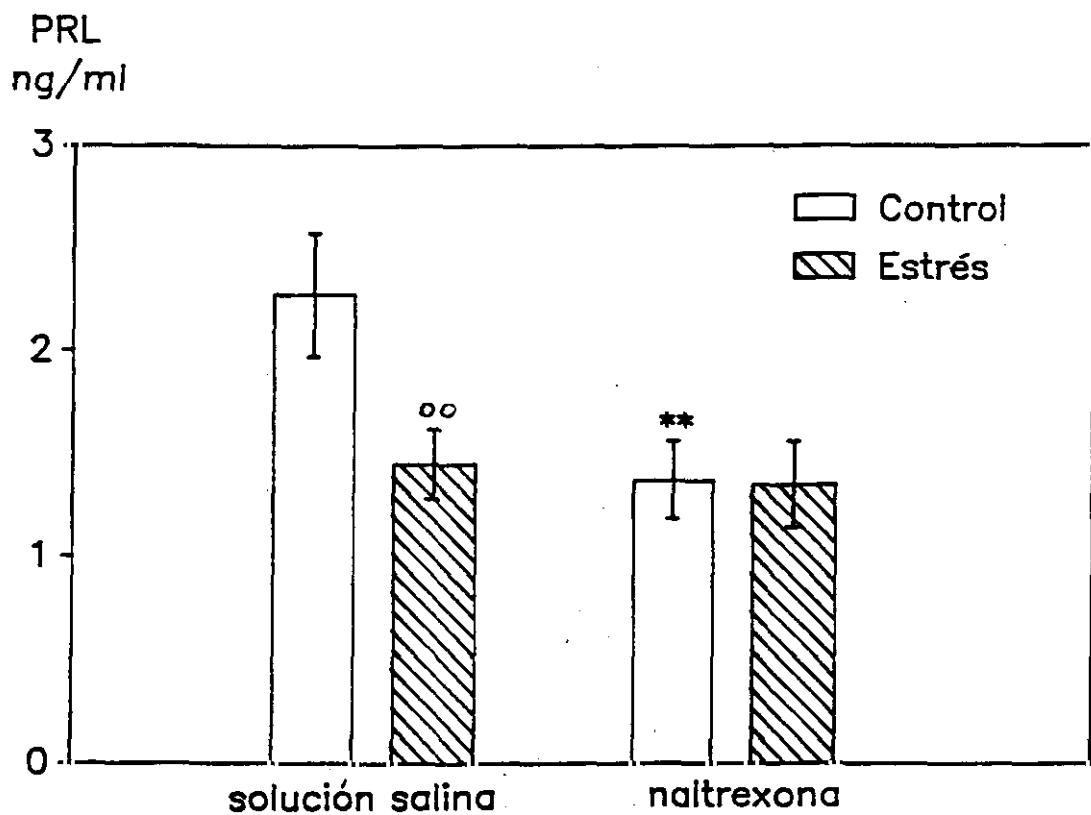


Figura 29: Efecto del tratamiento con naltrexona sobre la respuesta de la PRL plasmática al estrés crónico. Existe interacción significativa  $p < 0,09$  entre estrés-tratamiento.

<sup>oo</sup>  $p < 0,01$  vs su respectivo grupo control

<sup>\*\*</sup>  $p < 0,01$  vs grupo solución salina control

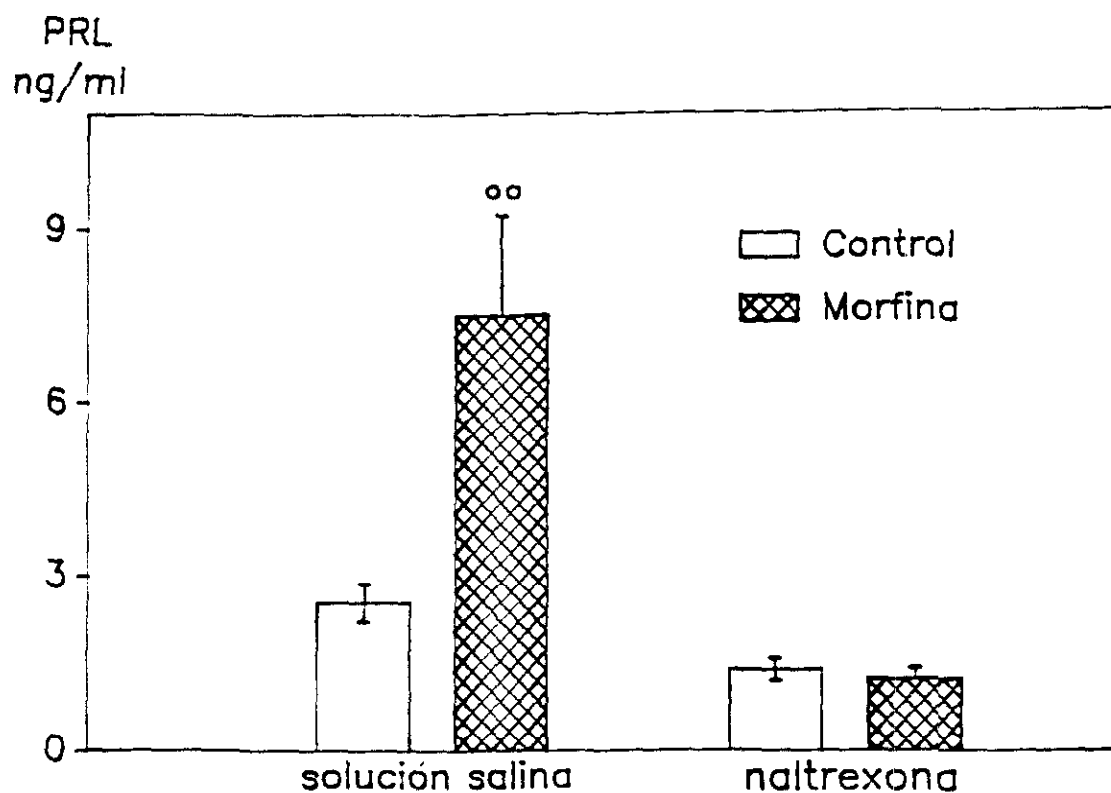


Figura 30: Efecto de la administración de morfina sobre los niveles plasmáticos de PRL en ratas tratadas previamente con naltrexona o solución salina. La morfina aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles plasmáticos de esta hormona únicamente en el grupo tratado con solución salina.

Corticosterona  
 $\mu\text{g/dl}$

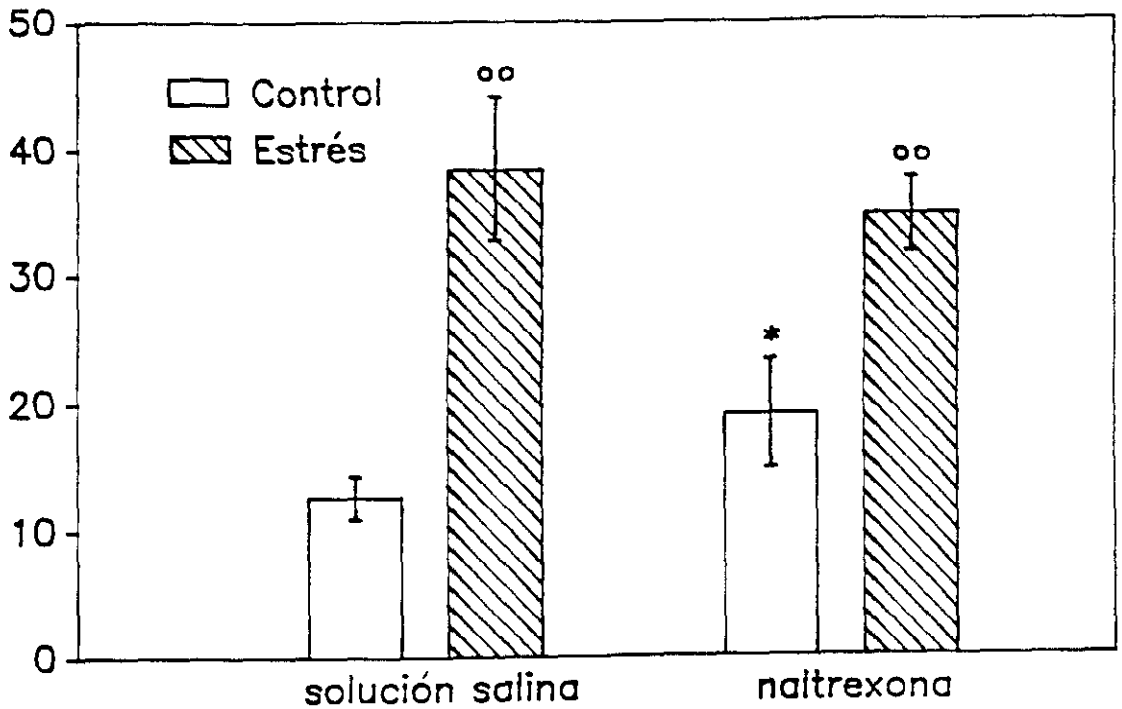


Figura 31: Respuesta al estrés crónico de los niveles plasmáticos de corticosterona en animales a los que se administró solución salina o naltrexona. El estrés aumentó significativamente  $p < 0,01$  los niveles plasmáticos de esta hormona y existe interacción significativa  $p < 0,06$  entre los efectos del estrés y la naltrexona.

oo  $p < 0,01$  vs su respectivo grupo control

\*  $p < 0,05$  vs grupo solución salina control

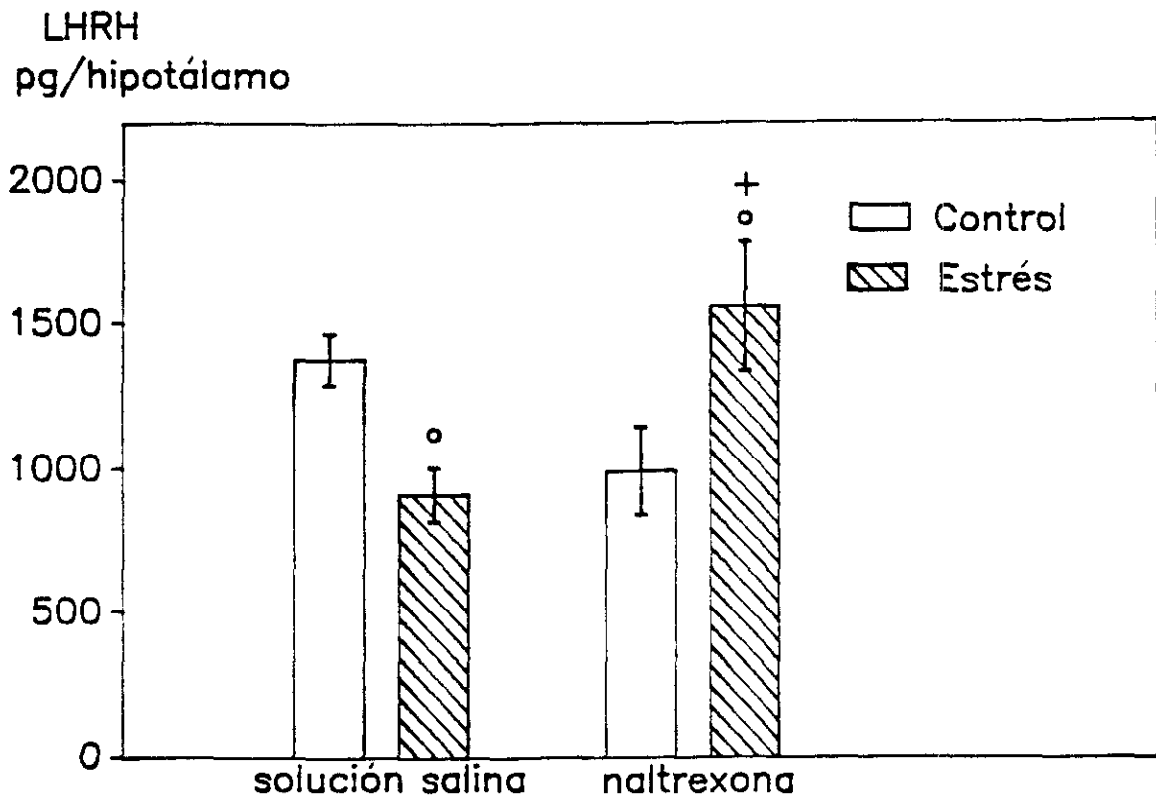


Figura 32: Contenido hipotalámico de LHRH tras la administración de solución salina o naltrexona a ratas controles o inmobilizadas crónicamente durante 4 días. Existe interacción significativa  $p < 0,01$  entre los efectos del estrés y la naltrexona.

- o  $p < 0,05$  vs su respectivo grupo control
- \*  $p < 0,05$  vs grupo solución salina control
- +  $p < 0,05$  vs grupo solución salina estrés

### 2.3. Efecto de la CRH y de la naloxona sobre la secreción hipotalámica de LHRH *in vitro*.

#### a) Secreción basal de LHRH en perfusiones de hipotálamo medio-basal.

En la Fig. 33 está representada la secreción de LHRH en hipotálamo medio basal perfundido con Krebs Ringer bicarbonato. Se puede observar que tras 40 minutos de perfusión se alcanza una secreción estable de aproximadamente 1,7 pg/4min de LHRH, cantidad que se puede medir adecuadamente por nuestro método de radioinmunoanálisis, ya que la mínima cantidad detectable es 0,25 pg/4 min. La estimulación con potasio durante 16 minutos induce un aumento marcado de la liberación de LHRH, al disminuir la concentración de potasio del medio de perfusión se vuelve a restablecer la tasa de secreción de LHRH anterior.

La extracción del calcio y la adición de EDTA al medio de perfusión (Fig 33) disminuyó la secreción basal de LHRH (área bajo la curva  $12,8 \pm 0,66$  versus  $17,2 \pm 1,56$  pg/40 min  $\pm$  s.e.m.  $t = 2,5$   $p < 0,05$ ) y previno el aumento de la secreción de LHRH inducido por el potasio (área bajo la curva  $10,7 \pm 2,06$  versus  $36,8 \pm 5$  pg/32 min  $\pm$  s.e.m.  $t = 4,02$   $p < 0,01$ ).

**b) Respuesta a la administración de CRH y naloxona.** La administración de CRH de  $10^{-7}$  M disminuyó la secreción basal de LHRH así como el aumento de la misma tras la estimulación con potasio.

Como se puede observar en la Fig. 35, la adición de naloxona al medio de perfusión no modificó ni la secreción basal, ni la respuesta de LHRH al estímulo despolarizante del potasio.

En la Fig. 36 se ha representado la liberación de los hipotálamos perfundidos con CRH + naloxona frente a los perfundidos con CRH. Como se puede observar tanto la liberación basal como la respuesta al potasio de ambos grupos experimentales es la misma.

En la Fig. 37 se han representado la pg de LHRH a lo largo de 40 minutos de perfusión (fracciones 21-30 ambas inclusive) de liberación basal y de 32 minutos de estimulación con potasio (fracciones 31-38 ambas inclusive), en todos los grupos estudiados. La CRH disminuyó tanto la secreción basal ( $F_{1,27} = 6,15$   $p < 0,05$ ), así como el aumento de la misma tras la estimulación con potasio ( $F_{1,21} = 10,7$   $p < 0,01$ ). La naloxona no modificó la secreción de LHRH, no existiendo interacción significativa entre los efectos de la CRH y la naloxona ni en la secreción basal ni en la respuesta de LHRH a la estimulación con potasio.

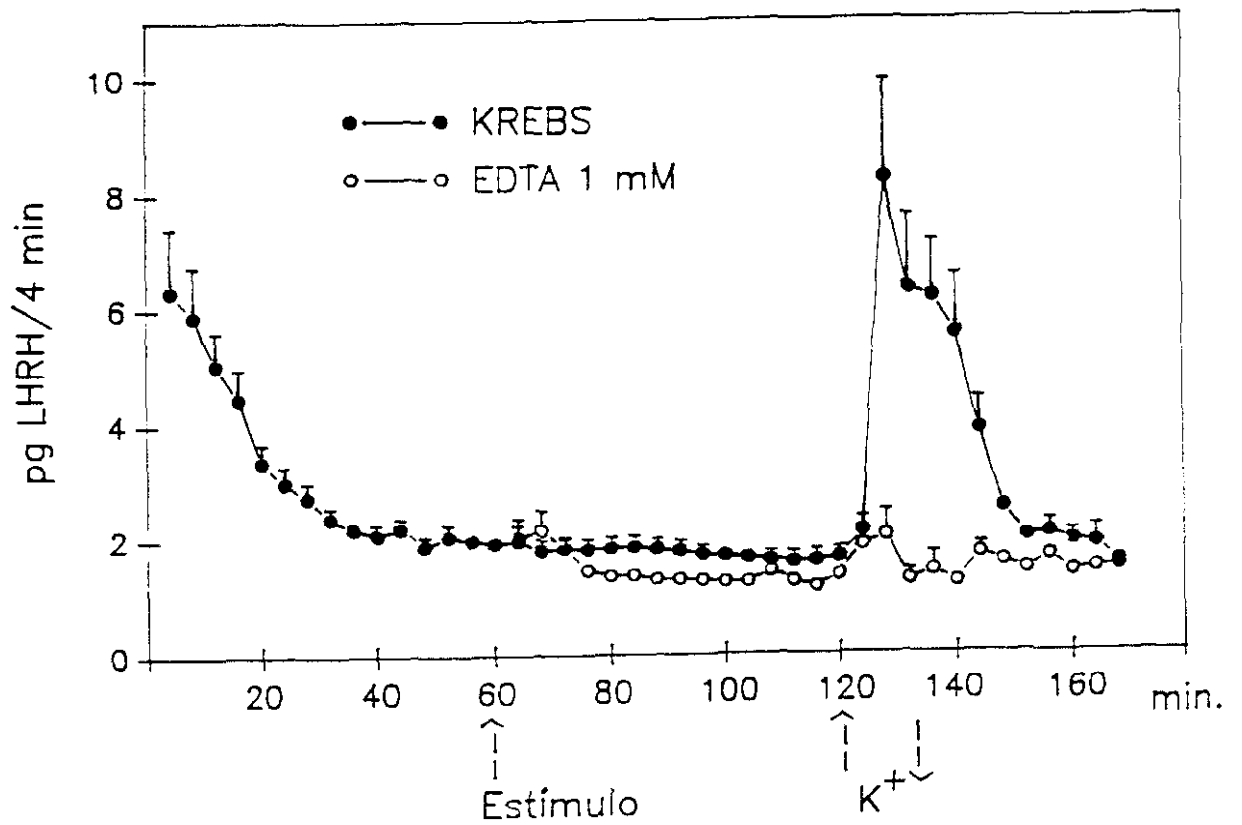


Figura 33: Liberación de LHRH basal y durante la estimulación con KCl en el hipotálamo-medio basal perfundido con Krebs-Ringer o en medio sin calcio y con EDTA 1 mM.

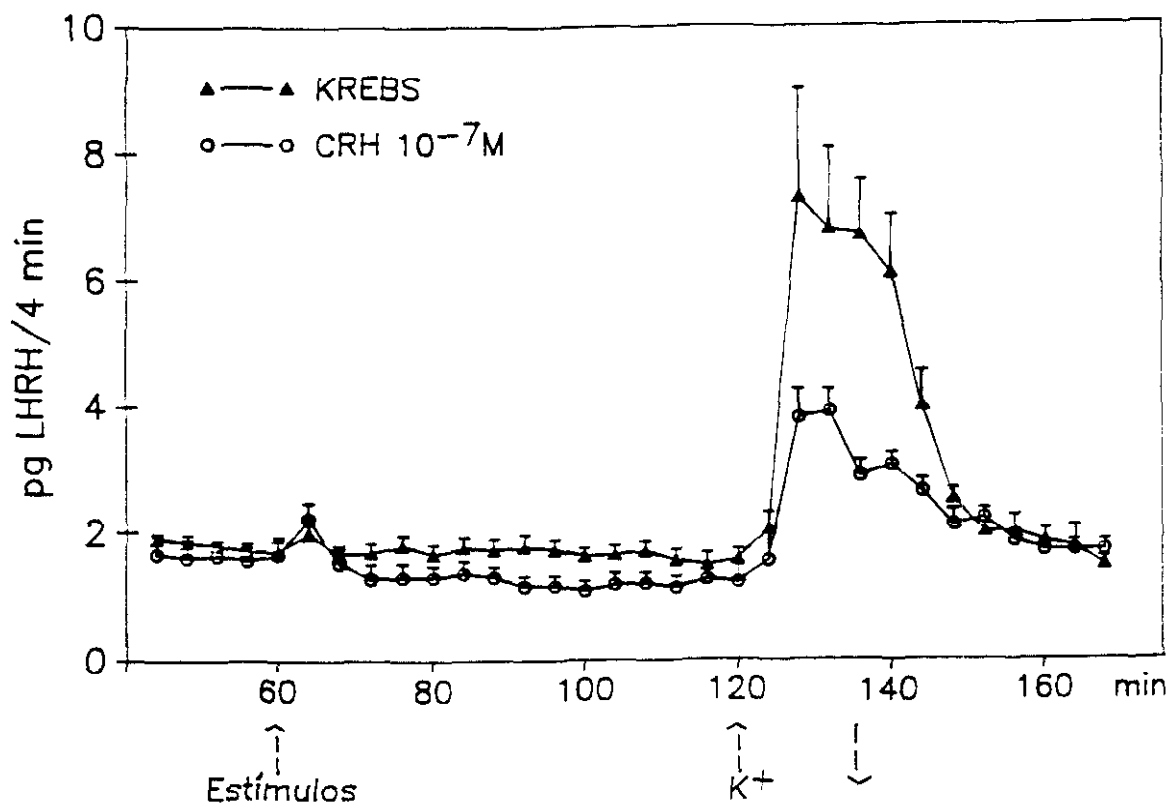


Figura 34. Efecto de la CRH sobre la liberación basal de LHRH y su respuesta al KCL 56 mM.

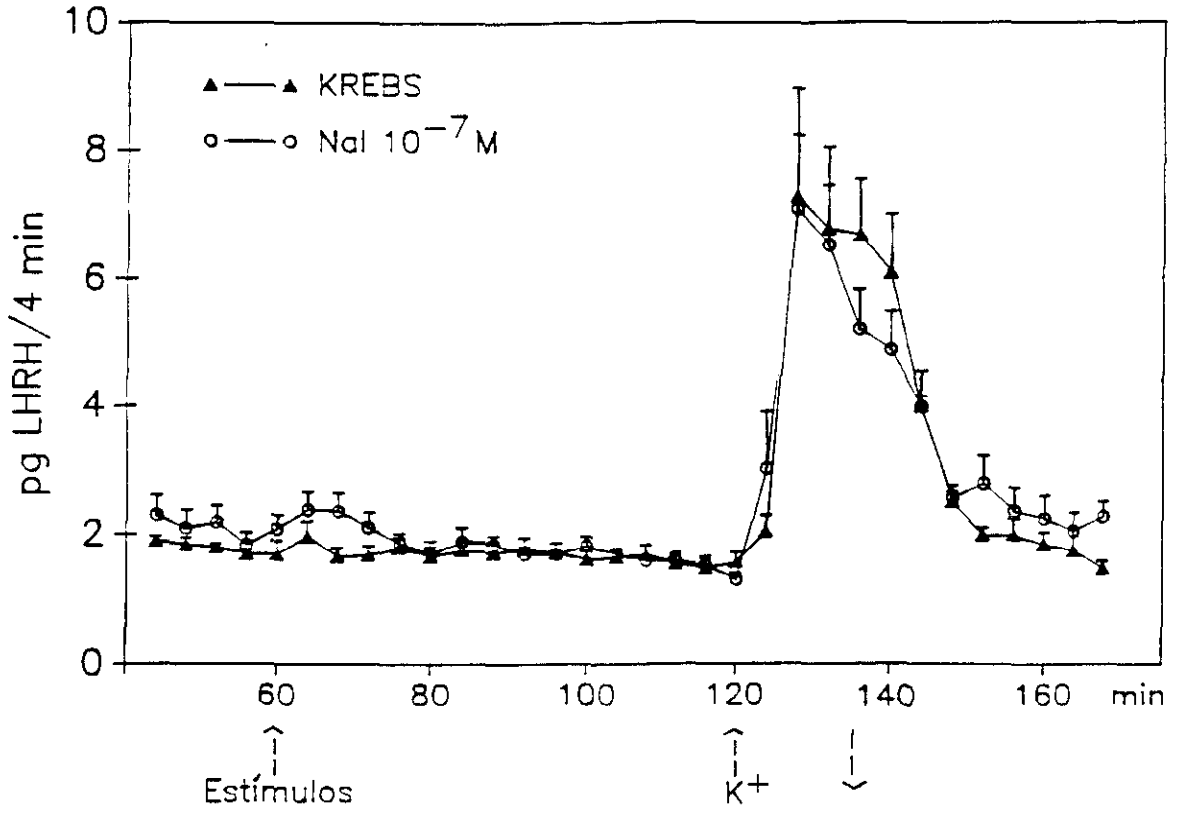


Figura 35: Efecto de la naloxona sobre la liberación de LHRH, en perfusiones de hipotálamos.

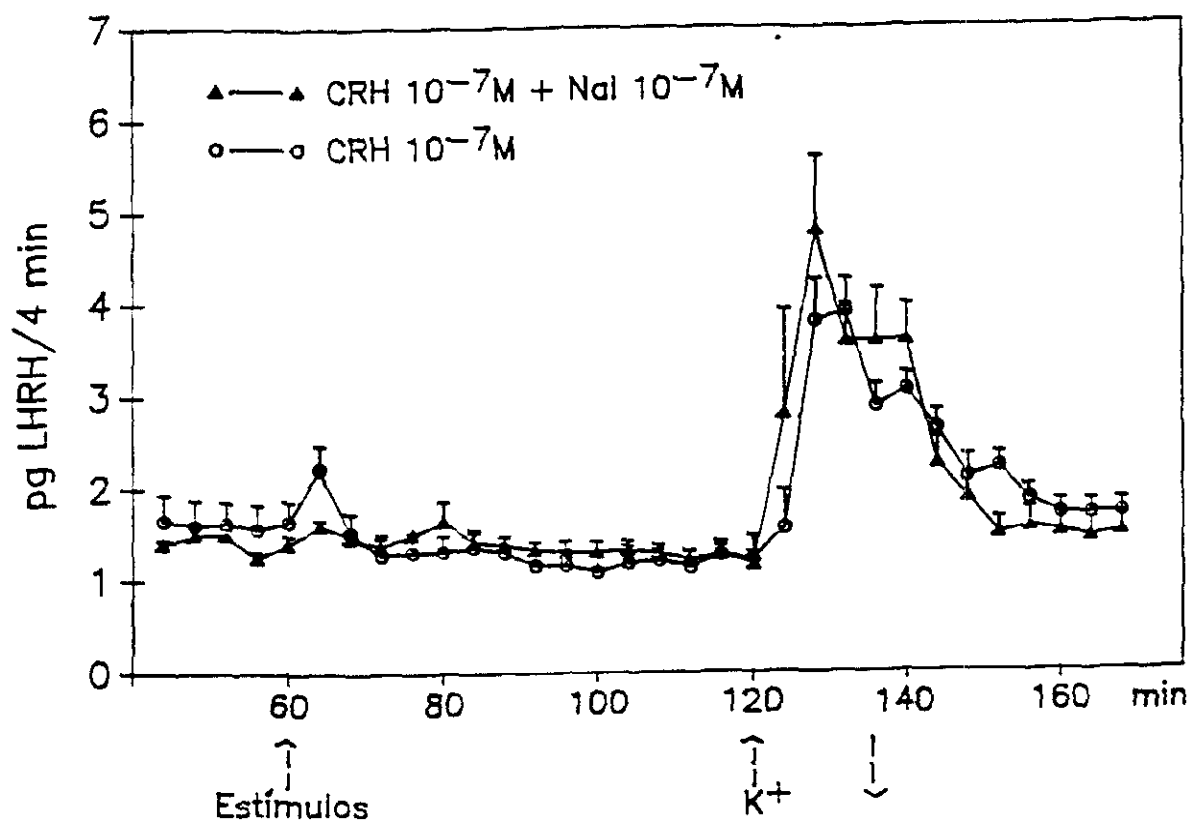


Figura 36: Liberación de LHRH en hipotálamos perifundidos con CRH o naloxona y CRH.

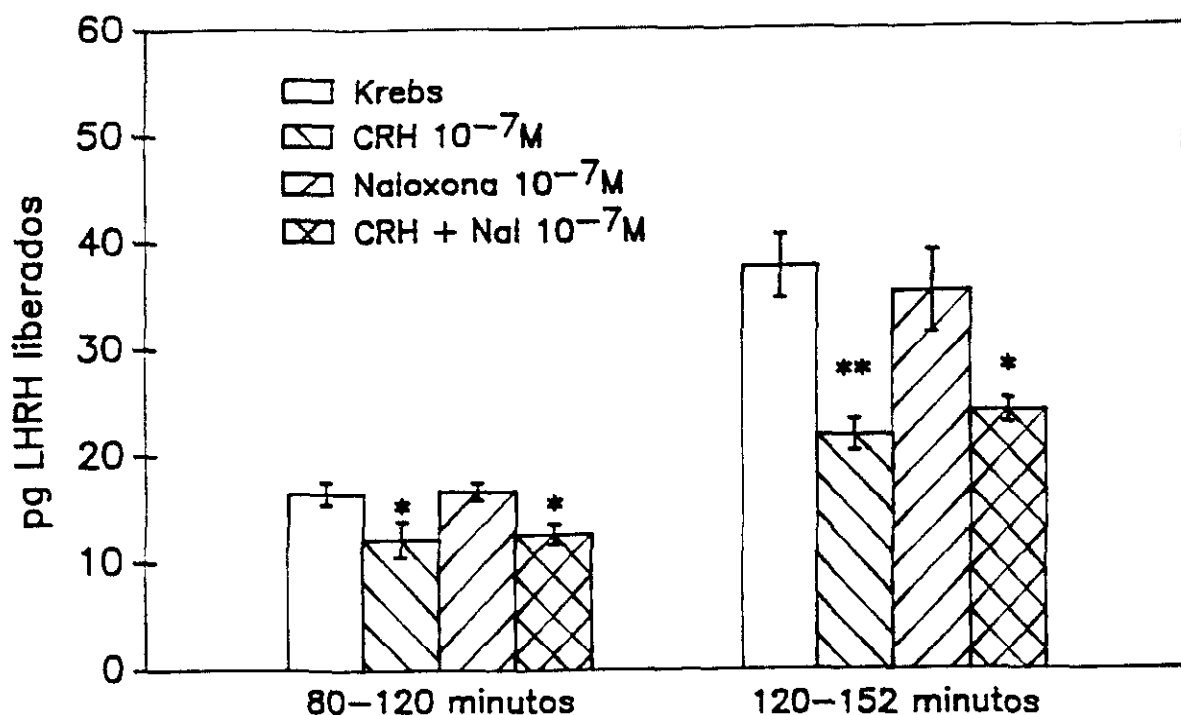


Figura 37: Efecto de la CRH y/o naloxona sobre la liberación media de LHRH en situación basal o durante la estimulación con potasio. La CRH disminuyó significativamente tanto la liberación basal de LHRH  $p < 0,05$  como en respuesta al estímulo despolarizante con KCl 56 mM  $p < 0,01$ .

## ***DISCUSSION***



## 1. PAPEL DE LAS CATECOLAMINAS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS AGUDO.

### 1.1. Gonadotropinas.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos corroboran que el estrés agudo provoca un aumento significativo de los niveles plasmáticos de LH. En trabajos previos se ha observado que el estrés agudo, producido por diferentes modelos, produce un aumento significativo de los niveles plasmáticos de gonadotropinas en ratas macho adultas (Briski, Quigley y Meites 1984; Armario y cols 1986; Armario y cols 1987; López-Calderón y cols 1990). Sin embargo no se conocen los mecanismos por los cuales se produce esta estimulación. Se han propuesto a las catecolaminas como posibles mediadores en dicha respuesta, ya que su recambio hipotalámico parece estar aumentado durante el estrés (Briski y Sylvester 1988).

El contenido hipotalámico de noradrenalina disminuye, mientras que su recambio aumenta durante las situaciones de estrés (Saavedra, Kvetnansky y Copin 1979; Tanaka y cols 1982; Fuxe y cols 1983; Pacak y cols 1992). Sin embargo, los datos existentes en la bibliografía sobre la respuesta de dopamina al estrés son menos homogéneos. Generalmente se observa que el contenido hipotalámico de dopamina no se modifica mientras que su recambio puede aumentar, disminuir o no alterarse tras distintos procedimientos de estrés (Thierry y cols 1968; Corrodi y cols, 1971).

El objetivo de medir las catecolaminas en nuestro trabajo fue comprobar la eficacia de los tratamientos farmacológicos empleados. Como era de esperar la inhibición de la tirosina hidroxilasa disminuye el contenido hipotalámico de dopamina y de noradrenalina, mientras que la inhibición de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa únicamente disminuye el contenido de noradrenalina. No encontramos ninguna modificación del contenido hipotalámico ni de noradrenalina ni de dopamina en los animales estresados durante 30 minutos. Estos resultados, sobre todo en lo referente a la noradrenalina, pueden resultar contradictorios con lo mencionado anteriormente. Sin embargo, Tanaka y cols

### *Estrés y gonadotropinas*

(1982) no observan un descenso en el contenido hipotalámico de noradrenalina hasta que no transcurre al menos una hora de inmovilización, si bien, una vez transcurridos 30 minutos observan un aumento del MHPG-SO<sub>4</sub> (metabolito resultante de la degradación de noradrenalina). Por otro lado, el hecho de que no encontremos modificaciones en el contenido hipotalámico de noradrenalina podría ser consecuencia del diferente tiempo de respuesta al estrés de las distintas neuronas de noradrenalina en núcleos hipotalámicos específicos, por lo que al diseccionar todo el hipotálamo no observamos ningún cambio. En este sentido Palkovits y cols (1975) observaron una disminución de la concentración de norepinefrina en el núcleo arcuato pero no en otros núcleos hipotalámicos, y puesto que este núcleo representa aproximadamente el 5% del total del hipotálamo puede ocurrir que al medir el contenido de noradrenalina en todo él no detectemos modificaciones.

Tanto la administración de DDC como de  $\alpha$ -m-p-Tyr producen una disminución significativa de los niveles plasmáticos de LH en los animales sin estresar, lo que sugiere que las catecolaminas tienen un papel activador de la secreción basal de LH, puesto que al bloquear su síntesis disminuyen también los niveles plasmáticos de esta hormona. Asimismo el tratamiento con prazosín produce un descenso significativo de los niveles plasmáticos de LH. En vista de estos resultados podemos interpretar que las catecolaminas, concretamente la noradrenalina, parecen activar la secreción de LH, a través de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos. Atribuimos este efecto a la noradrenalina, puesto que de ser la dopamina la responsable el tratamiento con DDC no debería haber producido ninguna modificación en la secreción de LH, ya que dicho fármaco no altera los niveles de dopamina y sí los de noradrenalina.

Rettori y cols (1981) han observado una disminución de los niveles plasmáticos de LH tras la administración de estas mismas drogas en animales castrados 48 horas antes. Estos autores obtienen una respuesta mayor al LHRH en el grupo tratado con DDC que en el grupo control, por lo que sugieren que la disminución en el contenido plasmático de LH es consecuencia de una disminución de la liberación de LHRH hipotalámica. Por tanto los

resultados observados en los niveles plasmáticos de LH podríamos atribuirlos a una alteración inducida a nivel hipotalámico. En este sentido nosotros hemos valorado el contenido hipotalámico de LHRH y no hemos detectado ninguna modificación del mismo, con ninguno de los dos tratamientos antes mencionados. Estos resultados son compatibles con lo anteriormente expuesto, ya que es posible que además de estar disminuida la liberación hipotalámica de LHRH, como apuntaban Rettori y cols (1981), también se esté produciendo una disminución de su síntesis lo que ocasionaría que no encontremos modificaciones significativas en el contenido hipotalámico de LHRH.

Existen bastantes datos en la bibliografía, muchos de ellos en hembras, que muestran que la noradrenalina tiene un efecto activador de la secreción basal de LH (Meites y Sonntag 1981; Ojeda, Negro-Vilar y McCann 1982; Gitzen y Ramirez 1988; Terasawa y cols 1988; Gearing y Terasawa 1991). Gearing y Terasawa (1991) sugieren que existen diferencias de especie en el tipo de receptor que media este efecto. Por ejemplo, en la mona son los antagonistas  $\alpha_1$  y no los  $\alpha_2$  o los  $\beta$  los que suprimen la liberación de LHRH, lo que sugiere que los efectos de la noradrenalina sobre la liberación de LHRH están mediados por receptores  $\alpha_1$ . Por el contrario, Negro-Vilar (1982) ha propuesto también los receptores  $\alpha_2$  como mediadores de la regulación catecolaminérgica de la liberación basal de LH en los roedores, aunque tanto nuestros resultados como los de otros autores (Drouva, Laplante y Kordon 1982; Heaulme y Dray 1984) sugieren que existe una mediación  $\alpha_1$  adrenérgica en el control de la secreción basal de LH.

En nuestro trabajo la inhibición de la síntesis de catecolaminas disminuye tanto los niveles basales como la respuesta de LH al estrés, al igual que ocurre con el prazosín, mientras que la yohimbina bloquea la respuesta de LH al estrés sin modificar sus niveles basales. Algunos autores han propuesto que los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos están situados presinápticamente inhibiendo la liberación de noradrenalina (Langer 1981; Ueda, Goshima y Misu 1983; L'Hereux y cols 1986; Abercrombie, Keller y Zigmond 1988; Fernández-Galaz, Herbison y Dyer 1993), por lo que la activación de los receptores  $\alpha_1$  tendría el

### *Estrés y gonadotropinas*

efecto opuesto que la de los  $\alpha_2$ . Nuestros resultados tras la administración de prazosin o de yohimbina no se ajustan a este modelo de autorregulación, puesto que no solo no tienen efectos antagónicos sino que tanto el bloqueo de los receptores  $\alpha_1$  como de los  $\alpha_2$  antagoniza el aumento de la secreción de LH inducida por el estrés agudo.

Para explicar el efecto de la yohimbina en la respuesta de LH al estrés hay que tener en cuenta que se han descrito en el hipotálamo un gran número de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos a nivel postsináptico, más numerosos incluso que a nivel presináptico (U'Prichard y cols, 1979). Durante el estrés se produce un aumento en el recambio hipotalámico de noradrenalina que actuaría a través de dichos receptores sobre otros terminales nerviosos (serotoninérgicos o colinérgicos, por ejemplo) controlando su liberación (Dubocovick 1984; Galzin y cols 1984; Jackish, Weler y Hertting 1984). Estos terminales serotoninérgicos o colinérgicos actuarían a su vez sobre la neurona de LHRH modificando su secreción. A este respecto se ha observado que la acetilcolina estimula la liberación de LHRH en hipotálamo medio basal *in vitro* (Fiorindo y cols 1975), y además parece que durante la inmovilización aumenta el turnover de este neurotransmisor al igual que la serotonina (Culman y cols 1980; Richardson 1984).

En cuanto a la otra gonadotropina, la FSH, nuestros resultados muestran que los niveles plasmáticos de esta hormona no se modifican ni por los 30 minutos de estrés ni por los distintos tratamientos farmacológicos. La FSH se ha descrito como una hormona de menor respuesta a todos los estímulos en general, que la LH. Ya Krulich y cols en 1974 describieron para tres distintos modelos de estrés agudo, que los niveles de LH se elevaban antes que los de FSH. A este respecto, López-Calderón y cols (1990) observan que los niveles plasmáticos de FSH aumentan lentamente, alcanzando significación estadística este aumento a los 90 minutos de estrés por inmovilización. Estos resultados son compatibles con la idea de que la secreción de LH y FSH esté regulada por un único factor hipotalámico y que el diferente patrón secretor de LH y FSH pueda reflejar una relativa insensibilidad de las células secretoras de

FSH al LHRH. Como no se modificó la secreción de esta gonadotropina durante el estrés agudo y el principal objetivo de esta primera parte del trabajo era averiguar los mecanismos implicados en la respuesta hormonal al estrés agudo, no hemos valorado los niveles de esta hormona en ninguno de los experimentos de estrés agudo llevados a cabo posteriormente.

## **1.2. Prolactina.**

Los resultados obtenidos muestran que la inmovilización durante 30 minutos produce un aumento significativo de los niveles de PRL. Son muchos los trabajos que muestran que la respuesta endocrina al estrés agudo no se limita a la activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, si no que implica también otras hormonas adenohipofisarias, entre ellas la prolactina. Al igual que se ha descrito para la LH, la secreción de prolactina aumenta tras distintas situaciones de estrés, sobre todo tras la inmovilización, modelo de estrés que estamos estudiando (Kulich y cols 1974; Collu, Taché y Ducharme 1979; Kant y cols 1987; Armario y cols 1986).

El tratamiento con  $\alpha$ -m-p-tyr aumenta la prolactina circulante, resultado esperado, puesto que esta droga disminuye los niveles de la dopamina, que es ampliamente reconocida como neurotransmisor inhibidor de la secreción de PRL (Ben-Jonathan 1985; Moore 1987; Neill 1988). Los animales a los que administramos DDC, que presentaban unos niveles normales de dopamina, pero disminuidos los de noradrenalina, tenían unos valores de PRL significativamente inferiores a los controles inyectados con solución salina. Estos mismos resultados han sido obtenidos por Smythe y cols (1985), tras administrar DDC y nos sugieren que la noradrenalina tiene un papel activador de la liberación basal de PRL.

La administración de yohimbina aumenta los niveles basales de PRL. La inyección de este antagonista  $\alpha_2$  produce, tanto en ratas como en monos, un aumento de los niveles de PRL, si bien en el hombre no tiene ningún

### *Estrés y gonadotropinas*

efecto (Gold, Donabedian y Redmon 1979; Meltzer, Simonovic y Gudelsky 1983; Lien y cols 1986). Estos datos acerca del papel de las neuronas noradrenérgicas en la regulación basal de PRL son paradójicos. Según nuestros resultados, por un lado la inhibición de la síntesis de noradrenalina inhibe la liberación de PRL, mientras que el bloqueo de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos aumenta la secreción basal de esta hormona, y el de los  $\alpha_1$  la disminuye. Para explicar estos datos aparentemente contradictorios hay que tener en cuenta que existen receptores  $\alpha_2$  presinápticos, que al ser bloqueados por la yohimbina causan un aumento de la liberación de noradrenalina (L'Hereux y cols 1986; Abercrombie, Keller y Zigmond 1988), que a través de los receptores  $\alpha_1$  incrementa la secreción de PRL. En conclusión la noradrenalina jugaría un papel activador de la secreción basal de PRL de acuerdo con los datos obtenidos por otros autores (Donoso y cols 1971; Carr, Conway y Voogt 1977).

En cuanto al papel de las catecolaminas en la respuesta de prolactina al estrés agudo, nuestros resultados sugieren que las catecolaminas no parecen mediar el aumento de la secreción de PRL durante el estrés, ya que, ni el bloqueo de la síntesis de estos neurotransmisores, ni la administración de ninguno de los antagonistas adrenérgicos fue capaz de bloquear la respuesta al estrés, a pesar de los grandes cambios en los niveles plasmáticos basales de esta hormona. Shin (1980) descartó igualmente la intervención de la dopamina, al analizar su papel en el aumento de PRL tras la inhalación de éter, en la rata macho adulta.

Otros autores han sugerido que el aumento de la secreción de PRL durante la inmovilización está mediada por receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos puesto que su bloqueo reduce los niveles plasmáticos de prolactina (Haanwinckel y cols 1991). Sin embargo estos autores no analizan el efecto del bloqueo de los receptores  $\beta_2$  sobre la secreción basal de PRL, por lo cual no podemos saber si se suprime el aumento de la secreción de PRL o al igual de lo que nosotros observamos al administrar DDC se produce un descenso, tanto de la secreción basal como durante el estrés, pero no se bloquea el incremento. En conclusión nuestros resultados indican que el aumento de PRL que se produce durante el

estrés no se puede explicar en función del aumento del recambio de catecolaminas que se produce durante esta situación.

Los responsables de la respuesta de prolactina al estrés agudo podrían ser otros neurotransmisores como los opioides, la histamina o la serotonina, como han sugerido otros autores (Petraglia, Vale y Rivier 1987a; Knigge, Matzen y Warberg 1988; Jorgensen, Knigge, Warber 1992). Respecto a este punto, Meyerhoff, Mougey y Kant (1987) observaron que se requiere la presencia del núcleo paraventricular intacto para que se produzca un aumento de los niveles plasmáticos de prolactina tras estrés por choques eléctricos. ¿Qué factores suprimimos al lesionar el núcleo paraventricular responsables de esta respuesta?. Por un lado el VIP, que también se ha demostrado que juega un papel importante en otro tipo de estrés como es el éter (Kaji y cols 1985). Un segundo mecanismo que podría causar la menor respuesta de prolactina es la destrucción de las neuronas de TRH presentes en dicho núcleo (Brownstein, Eskay y Palkovits 1982). Un tercer mecanismo posible es la atenuación de la liberación de un factor estimulante, la  $\beta$ -endorfina, que se produce tras la lesión de este núcleo.

Además de los mencionados existe otro péptido, la oxitocina que puede producir liberación de prolactina de células dispersas de hipófisis (Samson, Lumpkin y McCann 1986) y cuya concentración aumenta tras estrés por hemorragia (Plotsky, Bruhn y Vale 1985). Jorgensen, Knigge y Warberg (1992) observaron que al bloquear los distintos receptores de serotonina se inhibe la respuesta de prolactina al estrés por inmovilización y por éter. A su vez, la serotonina incrementa la concentración de VIP en el sistema porta hipofisario (Shimatsu y cols 1984), pudiendo ser este factor el responsable en último término del aumento de prolactina. Con estos resultados Jorgensen, Knigge y Warberg (1992), proponen que las neuronas serotoninérgicas, junto con otros neurotransmisores, mediarían en la liberación de prolactina en respuesta al estrés. Por lo tanto distintos tipos de estrés pueden poner en marcha diferentes mecanismos que se traducen en una misma respuesta hormonal.

### **1.3.Corticosterona.**

En todos los experimentos realizados, el estrés por inmovilización provoca un aumento significativo de los niveles plasmáticos de corticosterona lo que concuerda con los hallazgos de diversos autores (Tanaka y cols 1982a; Armario y Castellanos 1984; Moldow y cols. 1987; Hauger y cols. 1988).

Puesto que la administración tanto de  $\alpha$ -m-p-tyr, como de DDC, produce en los animales no estresados un aumento significativo de los niveles plasmáticos de corticosterona, podemos deducir que las catecolaminas inhiben la secreción de esta hormona, ya que al bloquear su síntesis aumentan sus niveles plasmáticos. Por otro lado, de los antagonistas estudiados tan sólo la yohimbina fue capaz de modificar la secreción de corticosterona, produciendo un aumento significativo de la misma. Todos estos datos nos indican por tanto, que la activación de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos disminuye la secreción de corticosterona.

La posibilidad de una acción directa de las catecolaminas inhibiendo la secreción hipofisaria de ACTH fue descartada, puesto que la administración sistémica de adrenalina y noradrenalina, que no atraviesan la barrera hematoencefálica, no modifica la secreción de ACTH, mientras que la L-Dopa que sí la atraviesa, produce modificación de los niveles de ACTH (Rappapor 1976). Además la incubación de adenohipófisis *in vitro* con adrenalina y noradrenalina no afecta la secreción de ACTH (Ganong 1963; Kraier y Morris 1976; Fischer y Moriarty 1977). Asimismo, ninguna de las catecolaminas es capaz de estimular la secreción de los péptidos derivados de la proopiomelanocortina en cultivos de células dispersas del lóbulo anterior de rata (Briaud y cols 1979; Vermes y cols 1980). Sin embargo, otros autores (Pettibone y Mueller 1982; Heisler, Reisine y Axelrod 1983) utilizando también cultivos celulares, observaron que la adrenalina y la noradrenalina estimulan débilmente la secreción de estos péptidos. Estos distintos resultados podrían atribuirse a procesos tales como la desensibilización de los receptores

adrenérgicos que se podría producir en ausencia de catecolaminas en el medio de cultivo.

La acción de las catecolaminas a nivel hipotalámico está ampliamente aceptada, si bien el papel preciso que éstas juegan a nivel central controlando la secreción de CRH es muy controvertido. Existen evidencias experimentales que indican tanto que pueden inhibir (Scapagnini y cols 1972; Hillhouse, Burden y Jones 1975; Buckingham y Hodges 1977; Ganong 1980; Suda y cols 1987), como activar la secreción de CRH (Smythe, Bradshaw, y Vining 1983; Tilders y cols 1985; Plotsky 1987; Tsagarakis y cols 1988), dependiendo de la dosis, de la metodología y del diseño experimental empleados.

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores que tras administrar DDC y  $\alpha$ -m-p-tyr observan un aumento significativo de los niveles plasmáticos de corticosterona (Scapagnini y cols 1970; Scapagnini y cols 1975; Smythe y cols. 1985).

Guillaume y cols. (1987) tras administrar 6-OHDA (6-hidroxidopamina), droga que destruye los terminales noradrenérgicos, en la banda noradrenérgica ventral observan una disminución de los niveles plasmáticos de CRH en el sistema porta, resultados que interpretan como una evidencia directa del efecto estimulador de las catecolaminas sobre la liberación de CRH. Sin embargo Weindenfed y Feldman (1991) tras llevar a cabo la misma maniobra experimental de administrar 6-OH-dopamina en la banda noradrenérgica ventral no observan ninguna modificación ni en el contenido hipotalámico de CRH, ni en los niveles plasmáticos de ACTH. Esta diferencia en los resultados podría explicarse porque en el primer diseño de Guillaume y cols (1987) utilizan animales anestesiados.

Liposits y cols (1986) han verificado inmunocitoquímicamente que existe una conexión anatómica entre las neuronas adrenérgicas y las neuronas que sintetizan CRH en el núcleo paraventricular. A pesar de que Spinedi y cols

(1988) asignan a la adrenalina un papel activador de la secreción de CRH, Mezey y cols (1984) observaron que la administración de inhibidores de la PNMT, aumenta el número de neuronas inmunorreactivas a la CRH en el núcleo paraventricular. Asimismo, Roth y cols (1981) encontraron un aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona tras la administración de inhibidores de esta enzima, aumento que no se bloquea por la adrenomedulectomía, descartando de esta forma que pudiera tratarse de un efecto periférico. Todos estos datos indican por tanto un efecto inhibitorio de la adrenalina sobre la secreción de CRH. En nuestro diseño experimental no pudimos determinar los niveles de adrenalina, por lo que no podemos descartar que el efecto inhibitorio que observamos no sea producido por una disminución de los niveles de adrenalina, puesto que hemos administrado inhibidores de los primeros pasos de la síntesis de este neurotransmisor.

Si eran contradictorios y dispares los datos de la literatura en lo que al papel de las catecolaminas en la secreción de CRH se refiere, no lo son menos los referentes al tipo de receptor que media dicho efecto.

Nuestros resultados sugieren que la activación de los receptores  $\alpha_2$  disminuye la secreción de la corticosterona puesto que su bloqueo mediante la administración de yohimbina aumenta la secreción de esta hormona mientras que ni el prazosín ni el propranolol modificaron la secreción basal de corticosterona.

Se ha elucidado la distribución de los distintos subtipos de receptores utilizando una gran variedad de métodos experimentales como autorradiografía, unión de radioligando, northern blot y técnicas inmunocitoquímicas. Estos estudios revelan en general, que la densidad de receptores en el núcleo paraventricular es como sigue  $\alpha_2 > \alpha_1 > \beta_1 = \beta_2$  en la rata adulta. Cummings y Seybold (1988), demostraron la presencia de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos en el pericarion de las células parvocelulares del núcleo paraventricular de ratas adultas. Estos resultados constituyen una evidencia morfológica a favor de una mediación de los receptores  $\alpha_2$  en el

control adrenérgico de la secreción de CRH.

Experimentos llevados a cabo *in vitro* por Suda y cols (1987) indican en cambio que la noradrenalina inhibe la liberación de CRH principalmente a través de un mecanismo  $\beta$ -adrenérgico, y parcialmente a través de uno  $\alpha$ -adrenérgico. Tsagarakis y cols (1988) también apuntan un mecanismo  $\beta$ -adrenérgico, si bien, este grupo observa que la norepinefrina tiene un efecto estimulante de la CRH.

En cuanto al efecto de los tratamientos empleados en el aumento de corticosterona que tiene lugar durante el estrés, ninguno de los antagonistas de los receptores adrenérgicos empleados en este estudio bloqueó la respuesta de corticosterona al estrés, lo que apoya la interpretación anterior de los resultados, es decir, las catecolaminas no parecen jugar un papel significativo en la respuesta de corticosterona al estrés, puesto que de haberlo tenido alguno de los antagonistas empleados hubiera bloqueado el aumento de dicha hormona. Estos mismos resultados han sido obtenidos por Murakami y cols (1989), tras administrar DDC. La yohimbina produce un aumento significativo de los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona, si bien no observan un aumento de estas hormonas tras someter a los animales a estrés. Esta diferencia en la respuesta al estrés se puede deber a que el modelo de estrés utilizado en este trabajo es la exposición al éter, por lo que los cambios neuroendocrinos que se produzcan no deben ser totalmente coincidentes con los producidos por la inmovilización.

## **2.- PAPEL DE LA CRH Y LOS OPIOIDES ENDOGENOS EN LA RESPUESTA AL ESTRES CRÓNICO.**

### **2.1. Efecto de la administración intracerebroventricular de un antisuero anti-CRH.**

Antes de discutir la respuesta hormonal a la administración crónica intracerebroventricular (i.c.v) del anticuerpo de CRH vamos a comentar el efecto de dicho anticuerpo en la primera toma de sangre que realizamos a los 30 minutos de inmovilizar a los animales el primer día de estrés. Pudimos comprobar que el tratamiento había sido efectivo, ya que modificó los niveles basales de LH y disminuyó la respuesta al estrés de prolactina y corticosterona aunque no llegó a bloquearla.

Lo primero que nos llama la atención en estas tomas de sangre llevadas a cabo a los 30 minutos de comenzar el estrés, es que los niveles plasmáticos de LH no están significativamente aumentados como consecuencia de la inmovilización aguda, efecto que habíamos observado en los apartados anteriores dedicados al estrés agudo donde el periodo de estrés empleado fue precisamente 30 minutos. Este hecho se puede deber a varios factores: la distinta raza de los animales empleados, Wistar frente a Sprague-Dawley utilizados en este experimento. Sin embargo otros autores también observan un aumento de la secreción de LH tras estrés agudo en las ratas Sprague Dawley (Armario y cols 1987). La manipulación previa a que son sometidos las ratas, entendiéndose por esto la inyección intracerebroventricular y el sangrado, a pesar de que como ya se ha descrito en los diseños experimentales, la conexión del catéter se realizó una hora antes de la extracción de la muestra de sangre, con el fin de minimizar el efecto estresante que supone la manipulación de los animales. A este respecto Neill (1972), describió una disminución en los niveles plasmáticos de LH en ratas hembras canuladas, si bien la duración del pico ovulatorio era similar en los animales cateterizados y en los decapitados. Y por último y muy importante a tener en cuenta, es que para evitar que se quitaran

las cánulas unos a otros, alojamos a cada animal individualmente en jaulas separadas. Aunque este período de aislamiento no se ha descrito como suficiente para alterar el tamaño adrenal o para producir involución del timo (Klein y cols 1992) podría ser la causa de que los niveles de corticosterona sean significativamente más altos de los esperados encontrar durante la mañana. La PRL en cambio, a pesar de ser una hormona muy sensible a cualquier tipo de estrés, no presenta modificaciones en la toma de sangre de la mañana frente a la llevada a cabo por la tarde.

**Corticosterona.** Aunque en este experimento no pretendíamos modificar la liberación de CRH a nivel de la eminencia media, observamos un descenso tanto de los niveles basales de corticosterona como de su incremento durante los primeros 30 minutos de estrés, tras la administración del anticuerpo anti-CRH. Igualmente los niveles basales de corticosterona también eran menores en los animales tratados con el antisuero de manera crónica, por lo que parte del anticuerpo administrado debió atravesar la barrera hematoencefálica y actuar a nivel de la eminencia media o en la adenohipófisis, produciendo consecuentemente una disminución de ACTH, ya que éste es el efecto observado por otros autores tras administrar un antisuero anti-CRH intravenoso, forma de administración que sí garantiza que se actuó sobre las terminales CRHérgicas de la eminencia media (Kjoer y cols 1992; Bagdy, Chrousos y Calogero 1991).

A pesar de que como hemos mencionado los valores de corticosterona alcanzan incluso los niveles de estrés en la muestra de la mañana, la inmovilización durante 30 minutos incrementó los valores de esta hormona sobre los basales ya elevados. Estos resultados no son sorprendentes ya que se ha descrito un aumento en la respuesta de corticosterona y de ACTH a un segundo estrés (García-Márquez y Armario 1987) como por ejemplo, un aumento de la secreción de corticosterona durante la exposición aguda al éter en los animales que previamente habían sido inmovilizados de manera crónica (Sakellaris y Vermikos-Danellis 1975). Por otro lado la administración i.c.v. del

### *Estrés y gonadotropinas*

anticuerpo no atenúa la respuesta de corticosterona a la inmovilización crónica. Estos resultados pueden ser consecuencia de que el incremento de corticosterona que se produce como consecuencia del estrés puede estar controlado, además de por la CRH, por otros péptidos hipotalámicos como la vasopresina, la colecistocinina u otros (Rivier y Vale 1983; Linton y cols 1985; Kjoer y cols 1992) y la oxitocina (Lang y cols 1983; Gibbs 1986). Whitnall en 1989 observó que tras la inmovilización se produce una deplección de las vesículas secretoras de AVP/CRH en la zona externa de la eminencia media, lo que apoya fuertemente un papel de la AVP como mediador de la respuesta de ACTH al estrés. Asimismo, a nivel celular, la inmovilización repetida produce un incremento de las reservas de AVP colocalizadas con CRH en las neuronas de la eminencia media (De Goeij y cols 1991) y un aumento del m-RNA de vasopresina en el núcleo paraventricular (Bartanusz y cols 1993). Por tanto, la administración i.c.v. de anti-CRH no fue capaz de bloquear la respuesta de corticosterona a la inmovilización crónica, lo que indica que la respuesta de esta hormona al estrés es consecuencia de la estimulación de distintos factores, además de la CRH.

**Gonadotropinas.** La inmunoneutralización de la CRH central produjo un aumento significativo de los niveles plasmáticos de LH a los 90 minutos de su administración. Estos resultados coinciden con los existentes en la literatura pues ya se ha sugerido desde hace tiempo que la CRH podría inhibir la secreción de LH actuando a nivel hipotalámico disminuyendo la liberación de LHRH (Ono y cols 1984; Rivier y Vale 1985a; Gambacciani, Nikolarakis y cols 1986; Yen y Rasmussen 1986; Petraglia y cols 1987), y nosotros mismos lo hemos podido comprobar en los hipotálamos perfundidos "in vitro".

Cuando la administración del antisuero anti-CRH se lleva a cabo durante 4 días y la extracción de sangre se hace por decapitación, 7 horas después de la última inyección del anticuerpo, no se modifican los niveles plasmáticos basales de LH. Esto podría llevarnos a pensar que la inmunoneutralización crónica puede haber producido una hipersensibilidad de los

receptores de la CRH a la hormona que permaneciera sin neutralizar. Esta hipótesis puede plantearnos la duda de que el efecto bloqueante de la respuesta de las gonadotropinas al estrés que hemos atribuido a la CRH sea entonces consecuencia de la pauta de administración empleada. Esta objeción queda descartada si tenemos en cuenta los resultados que hemos obtenido en los niveles plasmáticos de corticosterona, con esta hormona observamos el efecto contrario al descrito para la LH. La administración del antisuero durante cuatro días produce una disminución significativa de los niveles plasmáticos de corticosterona en situación basal, lo cual indica que no se produce ningún proceso de "adaptación" a la administración repetida del anticuerpo.

En cuanto a la respuesta de LH al estrés crónico que era el objeto de este experimento, los resultados obtenidos muestran, primero que la inmovilización crónica produce un descenso significativo de los niveles plasmáticos de LH, ya descrito por otros autores (Du Ruisseau y cols 1979; Briski, Quigley y Meites 1984; López-Calderón y cols 1987) y segundo, que el anticuerpo anti-CRH previene la disminución de los niveles plasmáticos de LH inducida por el estrés crónico.

La inmovilización crónica disminuye los niveles plasmáticos de FSH. Sin embargo la administración del anticuerpo anti-CRH no fué capaz de prevenir el descenso de esta hormona, como ocurre con la LH. No obstante, en los animales tratados con el antisuero, el descenso de los niveles plasmáticos de FSH es menor que el de los animales tratados con suero de conejo normal, si bien esta diferencia no fue significativa.

El contenido hipotalámico de LHRH se reduce en los animales estresados crónicamente. Esta disminución en el contenido parece ser secundaria a una inhibición de la síntesis y secreción de LHRH (López-Calderón y cols 1990). La inmunoneutralización de la CRH atenúa la disminución del contenido de LHRH.

Nuestros datos sugieren que la CRH es una de las principales

### *Estrés y gonadotropinas*

responsables de la inhibición de la función reproductora que se produce como consecuencia del estrés crónico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rivier y Vale (1986) tras administrar i.c.v. un antagonista de la CRH en machos castrados utilizando como modelo de estrés agudo los choques eléctricos. Sin embargo estos mismos autores posteriormente han observado que la destrucción del núcleo paraventricular atenúa la respuesta de ACTH y corticosterona plasmáticas al estrés crónico, pero no modifica el descenso de los niveles plasmáticos de LH (Rivest y Rivier 1991). Por lo que concluyen que el descenso de los niveles de LH durante el estrés se encuentra mediado por neuronas CRHérgicas localizadas fuera del núcleo paraventricular.

**Prolactina.** La respuesta de PRL al estrés al igual que ocurre con las gonadotropinas es bifásica, períodos cortos de estrés provocan una estimulación de PRL (Krulich y cols 1974; Ducharme y cols 1982) mientras que el estrés crónico disminuye la concentración plasmática de esta hormona (Reigle y Meites 1976; Taché y cols 1976).

Al contrario de lo que ocurre con la corticosterona, los niveles plasmáticos basales de PRL son similares en el experimento agudo que en el crónico. Datos no publicados de nuestro grupo, obtenidos en animales canulados, muestran que como consecuencia de la conexión de la cánula se produce un aumento de PRL y de corticosterona. Dicho aumento de PRL es rápido y vuelve a los niveles basales aproximadamente a los 30 minutos, mientras que el de corticosterona se mantiene más tiempo, aproximadamente 120 minutos, si bien era de menor magnitud. Igual ocurre durante el estrés (López-Calderón y cols 1989), el aumento de PRL es de mayor magnitud pero de menor duración, de manera que a los 90 minutos de inmovilización se vuelve a los niveles basales. La corticosterona en cambio, aumenta de manera menos pronunciada, pero dicho incremento se mantiene durante un período de tiempo más largo.

Nuestros resultados muestran que la administración de anticuerpo

anti-CRH aumenta los niveles plasmáticos de PRL en los animales sin estresar, aunque disminuye su incremento durante el estrés agudo, sin llegar a bloquear la respuesta al estrés.

Dado que los glucocorticoides inhiben la secreción basal de PRL (López-Calderón, Esquifino y Tresguerres 1984; Oosteron y cols 1985; Briski y Silvester 1992), así como el incremento de esta hormona en respuesta al estrés agudo (Euker y cols 1975; Rossier y cols 1980), podríamos explicar el efecto estimulante de la administración del antisuero sobre los valores basales de prolactina. Sin embargo, Vale y Rivier (1985) observan que la administración de CRH disminuye la secreción de PRL tanto en ratas adrenalectomizadas como intactas, por lo que el efecto inhibitor de la CRH sobre la secreción de PRL podría ser independiente de los glucocorticoides adrenales.

En cuanto a la respuesta al estrés de la PRL, Petraglia, Vale y Rivier (1987a) obtuvieron un resultado similar, pero al antagonizar la  $\beta$ -endorfina y la dinorfina A en lugar de la CRH. Puesto que la CRH estimula la liberación de  $\beta$ -endorfina y Met-Enk (Nikolarakis y cols 1988), la administración de anti-CRH, disminuiría la liberación de estos péptidos opioides endógenos, por lo que observamos los mismos resultados obtenidos por Petraglia, Vale y Rivier (1987a), ya que, indirectamente modularíamos la concentración hipotalámica de estos péptidos opioides.

La situación es diferente durante el estrés crónico. Los resultados obtenidos por López-Calderón y cols en 1989 indican claramente que el efecto inhibitor de la inmovilización crónica sobre la secreción de PRL es debido a la hipersecreción de glucocorticoides consecuencia del estrés, puesto que la adrenalectomía y no la adrenamedulectomía bloquea la respuesta de esta hormona al estrés. ¿Qué ocurre tras la administración de anti-CRH?. tras la inmunoneutralización de dicha hormona no se modifica la respuesta de PRL al estrés crónico. Estos resultados no están en contradicción con los resultados mencionados sobre adrenalectomía puesto que la administración de anti-CRH

### *Estrés y gonadotropinas*

no bloquea la respuesta de corticosterona. Por tanto, estos datos serían una evidencia a favor de que la inhibición de PRL que se produce tras la inmovilización crónica es consecuencia del incremento de corticosterona e independiente de la CRH hipotalámica.

Lo que no resulta tan claro de esta acción es el lugar de actuación de los glucocorticoides inhibiendo la secreción de prolactina. Se han identificado receptores para los glucocorticoides tanto en la hipófisis (DeKloet, Wallach y McEwen 1975), como en distintos lugares del cerebro (Birmingham, Stumpf y Sar 1984; Reul y DeKloet 1985). Los resultados obtenidos *in vitro* sugieren que pueden actuar a nivel hipofisario (Leung y cols 1980; Rotsztein y cols 1980; Rotsztein y cols 1981). En cambio Briski y Sylvester (1992) observan que la administración intracerebroventricular de un glucocorticoide sintético produce una disminución significativa de la liberación hipofisaria de prolactina. Sugieren por ello que los glucocorticoides modulan la secreción lactotropa a través de un mecanismo inhibitor que se inicia en el cerebro.

### **2.2. Efecto de la naltrexona en la respuesta de gonadotropinas al estrés crónico.**

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la disminución de la secreción de gonadotropinas que se produce como consecuencia del estrés crónico se debe a la hipersecreción hipotalámica de CRH y no a la activación de la secreción de glucocorticoides adrenales.

Algunos autores sugieren que los opioides endógenos modulan la inhibición de la función reproductora inducida por el estrés. Se ha descrito que los opiáceos inhiben la secreción de gonadotropinas (Kalra y Kalra 1983) y sus antagonistas revierten la disminución de LH consecuencia de la aplicación de distintos tipos de estrés agudo (Petraglia, Vale y Rivier 1986; Briski y Sylvester 1988; O'Byrne, Lunn y Dixon 1989; Norman y Smith 1992). Según esta hipótesis el aumento de la secreción hipotalámica de la CRH produciría un incremento de la liberación de los opioides endógenos, y serían estos últimos

los que inhibirían la secreción hipotalámica de LHRH y secundariamente la de LH (Petraglia, Vale y Rivier 1986; Almeida, Nikolarakis y Herz, 1988). Para comprobar si el efecto inhibitor de la CRH sobre la LHRH es ejercido de forma directa o mediado por la liberación de opioides endógenos administramos naltrexona a animales tanto controles como estresados. Si el efecto inhibitor del estrés sobre la LHRH está mediado por opiáceos, al administrar un antagonista de los receptores opiáceos bloquearíamos la disminución de LH tras el estrés.

La inmovilización durante cuatro días produce una disminución de los niveles plasmáticos de LH y FSH, así como del contenido hipotalámico de LHRH como ya habíamos descrito en el experimento anterior. Esto confirma que la disminución de los niveles plasmáticos de gonadotropinas va acompañado de una disminución del contenido hipotalámico de LHRH, asociada con un aumento de la respuesta hipofisaria a la estimulación con LHRH exógena (Du Ruisseau y cols 1979; López-Calderón y cols 1990), que refleja una inhibición de la síntesis de esta hormona hipotalámica. Nuestros resultados muestran que la naltrexona no revierte la disminución de los niveles plasmáticos de LH y FSH que se produce como consecuencia del estrés. La pauta de administración diaria podría hacernos dudar de la efectividad del tratamiento empleado ya que la inyección continuada de un antagonista opiáceo puede inducir tolerancia (Gabriel y Simpkins 1983). Para descartar esta posibilidad inyectamos morfina a animales tratados con salino o con naltrexona siguiendo la pauta de administración descrita. El tratamiento con naltrexona revierte el efecto inhibitor de la morfina sobre la LH y así como el aumento de la secreción de PRL, lo cual nos da la seguridad de que este tratamiento con naltrexona ha sido efectivo y podemos descartar posibles efectos de tolerancia a los opiáceos. Además, dicho tratamiento con naltrexona indujo, al contrario que la morfina, un aumento de la LH y FSH plasmáticas y una disminución de la secreción de PRL, lo cual apoya la idea de que los opioides endógenos inhiben tónicamente la secreción de gonadotropinas y estimulan la de PRL. Sin embargo durante el estrés crónico los opioides endógenos no parecen jugar un papel importante, ya que la disminución de los niveles plasmáticos de LH y FSH, consecuencia de la

### *Estrés y gonadotropinas*

inmovilización, fue similar en el grupo tratado con naltrexona y en el tratado con solución salina.

Esta conclusión parece estar en contradicción con la propuesta por Briski, Quigley y Meites (1984). Este grupo propone que los opiáceos endógenos están implicados en la disminución de LH inducida por el estrés crónico, basándose en que el tratamiento con naltrexona tiene un efecto estimulador de los niveles circulantes de LH en animales sometidos a ayuno o a estrés quirúrgico. Sin embargo, dicho trabajo no tuvieron en cuenta el efecto de la naltrexona por sí sola y como muestran nuestros propios resultados y los de la literatura (Sylvester, Cheng y Meites 1980; Bhanot y Wilkinson 1984) la administración de antagonistas opiáceos activa la liberación de LH y FSH en ratas macho intactas.

El tratamiento con naltrexona empleado produjo un aumento del contenido hipotalámico de LHRH junto con un aumento en los niveles circulantes de LH y FSH, lo que nos sugiere que la naltrexona activa la síntesis y liberación hipotalámica de LHRH. En resumen, tanto el estrés como la naltrexona afectan a la secreción de gonadotropinas actuando a nivel central (Kalra 1981b; Rasmussen y cols 1983; O'Byrne, Lunn y Dixon 1988), pero nuestros resultados indican que el estrés crónico y la naltrexona modulan la neurona LHRHérgica a través de distintos caminos. Sin embargo la naltrexona tiene mayor afinidad por los receptores  $\mu$  y  $\epsilon$  y se necesitan grandes dosis de esta droga para antagonizar los receptores  $\delta$  y K, por lo que no podemos excluir la posibilidad de que el efecto del estrés crónico sobre el eje gonadal pueda estar mediado por este tipo de receptores opiáceos.

En cualquier caso, si los péptidos opioides endógenos actúan centralmente inhibiendo la secreción hipotalámica de LHRH, parece lógico esperar que durante el estrés crónico aumente el contenido hipotalámico de los péptidos derivados de la POMC (proopiomelanocortina). En este sentido, los datos sobre el efecto del estrés en los niveles hipotalámicos de  $\beta$ -endorfina son controvertidos. Los choques eléctricos aplicados de forma aguda producen una

depleción rápida del contenido hipotalámico de  $\beta$ -endorfina (Millan y cols 1981), mientras que ni la inmovilización aguda (Maggi y cols 1988) ni la aplicación prolongada de choque eléctricos (Przewlocki y cols 1987) modifican los niveles de este neurotransmisor. López-Calderón, Ariznavarreta y Chen (1991) no observaron ninguna modificación ni en el contenido hipotalámico de  $\beta$ -endorfina ni en los niveles de ARNm de la POMC durante la inmovilización crónica, lo cual es una evidencia más a favor de que los péptidos opioides no jueguen un papel importante en la respuesta neuroendocrina al estrés crónico.

En cuanto a la PRL los resultados obtenidos indican que la naltrexona produce una disminución de los niveles plasmáticos basales de esta hormona, mientras que la morfina los aumenta, es decir, los opiáceos endógenos tienen un efecto estimulante de la secreción de PRL. Estos efectos de la morfina y la naltrexona han sido ampliamente descritos por otros autores y parecen estar mediados por receptores  $\mu$  y  $\kappa$  (Van vught y cols 1981; Delitala, Grossman y Besser 1983; Leaden y Yagenova 1987; Pfeiffer y cols 1987). Como ya habíamos observado, el estrés crónico produjo una disminución significativa de los niveles plasmáticos de PRL. Los animales tratados con naltrexona y estresados no presentaron modificaciones en los niveles de PRL con respecto a su grupo control. Con estos resultados no podemos concluir que la naltrexona bloquee la respuesta de PRL al estrés crónico pues aunque sí es cierto que no disminuye los niveles de esta hormona con respecto a su grupo control, también es cierto que el tratamiento por sí solo disminuye los niveles de esta hormona a unos valores de estrés.

Con respecto al efecto de la naltrexona sobre la secreción de corticosterona los resultados obtenidos sugieren que los opiáceos endógenos tienen un efecto inhibitor sobre la secreción de este esteroide, al igual de lo que observaron otros grupos (Tolis, Hickey y Guyda 1975; Rittmaster y cols 1985; Grossman y cols 1986; Allolio y cols 1987; Grossman 1988). Este efecto parece ejercerse a nivel hipotalámico puesto que Buckingham (1986) observó que dosis pequeñas de  $\beta$ -endorfina estimulaban la secreción de CRH en hipotálamo mediobasal "in vitro", mientras que dosis más altas inhibían la liberación de esta

## *Estrés y gonadotropinas*

hormona hipotalámica. La respuesta de corticosterona al estrés no se bloqueó tras la dosis de naltrexona administrada. Este resultado nos puede indicar que los péptidos opiáceos no intervienen en la respuesta de esta hormona al estrés crónico, asimismo podría indicar que durante el estrés crónico no aumenta la liberación de los opioides endógenos, o que si aumenta, no lo hace en la concentración adecuada para afectar al eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (Grossman y cols 1986). En cualquier caso el efecto que producirían sería una disminución de dicha respuesta, de ahí que se les haya implicado en la inhibición de ACTH que ocurre tras repetidas exposiciones a estrés (Buckingham y Cooper 1984).

### **2.3. Efecto de la CRH y/o naloxona sobre la secreción hipotalámica de LHRH *in vitro*.**

Para corroborar los resultados obtenidos *in vivo* pusimos a punto una técnica de perfusión *in vitro*. Estudiamos el efecto de la administración de un antagonista opiáceo, la naloxona así como la CRH con el objeto de comprobar si el efecto inhibitor de la CRH sobre la secreción hipotalámica de LHRH podría realizarse independientemente de la activación de una vía opioide.

Ninguna de las sustancias probadas (naloxona, CRH, EDTA, ni el propio Krebs-Ringer) interfieren en el RIA de LHRH. La linealidad obtenida al poner distintas alícuotas de un hipotálamo y del medio tras estimulación con KCl 56 mM, muestran que no existe interferencia de los distintos medios usados, y que además, hay una buena correlación entre la cantidad de muestra incluida en el RIA y la cantidad detectada en el mismo.

La tasa de liberación basal de LHRH obtenida en las perfusiones es semejante a la obtenida por Nikolarakis y cols (1986a y 1986b) que obtienen una liberación media de 0.3 pg/min, o a la obtenida en nuestro laboratorio en incubaciones de hipotálamo medio basal de  $0.216 \pm 0.03$  pg/min (Martín 1991).

Para validar nuestro sistema de perfusión *in vitro* llevamos a cabo perfusiones en las que eliminamos el calcio del medio y quelamos el calcio intracelular con EDTA 1 mM. La eliminación de este ión provoca una disminución de la liberación de LHRH y bloquea la respuesta a la estimulación con KCl 56 mM. Se ha descrito un papel fundamental del calcio en los procesos de exocitosis *in vitro* para una gran variedad de neuropéptidos (Drouva, Epelbaum y Kordon 1982) y neurotransmisores (Rubin 1970). Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Lengyel y cols (1984) que obtienen una disminución en la liberación, basal o tras la estimulación con potasio, de LHRH al incubar el tejido en medio libre de calcio.

La administración de CRH a hipotálamos perfundidos disminuyó tanto la liberación basal de LHRH como la respuesta al potasio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en hipotálamos perfundidos, en los que la CRH inhibe la secreción de LHRH, mientras que un antagonista de la CRH la aumenta (Gambacciani y cols 1986, Nikolarakis y cols 1986a y 1988).

El efecto inhibitorio de la CRH sobre la secreción hipotalámica de LHRH *in vitro* corrobora los resultados obtenidos *in vivo* al administrar CRH. En animales adrenalectomizados, la inyección de CRH en el tercer ventrículo disminuye los niveles plasmáticos de LH, mientras que la administración intravenosa de CRH no modifica la secreción de LH (Ono y cols 1984) lo cual indica que el efecto inhibitorio de la CRH sobre la secreción de gonadotropinas se realiza a nivel central. Posteriormente Petraglia y cols (1987) comprobaron que la administración central de CRH produce una disminución de los niveles de LHRH en el plasma portal.

Una vez verificado el efecto inhibitorio de la CRH sobre la secreción hipotalámica de LHRH, administramos un antagonista opiáceo, la naloxona a una dosis equimolecular de la empleada de CRH. Los hipotálamos perfundidos con naloxona presentan una secreción basal y en respuesta al potasio igual a

### *Estrés y gonadotropinas*

los hipotálamos controles. El hecho de no obtener ninguna modificación de la secreción se puede deber a la dosis de naloxona empleada. Leadem y cols (1985) y Rasmussen y cols (1988) demostraron que la concentración mínima de naloxona necesaria para estimular la liberación de LHRH, en el complejo hipotálamo medio basal y área preóptica es de 1 mg/ml. Sin embargo, *in vivo* se puede conseguir un aumento significativo de la secreción de LH con dosis mucho más bajas de naloxona (Kalra y Kalra 1983b). Según Leadem y cols (1985) la diferente eficacia de la naloxona para bloquear los receptores opiáceos, *in vivo* que *in vitro* podría deberse a que cuando se administra *in vitro* existe una mayor dificultad para difundirse pasivamente al interior del tejido. Sin embargo nos parece más probable la hipótesis de que los péptidos opioides actúen en vías localizadas fuera del hipotálamo medio basal.

Por tanto, nuestros resultados muestran que el efecto inhibitor de la CRH sobre la secreción de LHRH no se puede antagonizar por naloxona ya que los hipotálamos perfundidos a la vez con CRH y naloxona presentaron una liberación igual a la de los hipotálamos perfundidos sólo con CRH.

Los datos de la bibliografía sobre este tema son dispares. Existen evidencias tanto a favor, como en contra de una mediación de los opiáceos en la inhibición de la LHRH por la CRH.

Sirinathsinghji y cols (1983) han sugerido que los opiáceos endógenos podrían mediar la acción de la CRH sobre la LHRH. Se han localizado terminales axónicas con CRH y  $\beta$ -endorfina en las mismas áreas del hipotálamo medio basal y de la eminencia media (Swanson y cols 1983). Por lo que la CRH podría estimular la síntesis y secreción de la proopiomelanocortina en el hipotálamo del mismo modo que lo hace en la adenohipófisis (Gagner y Drouin 1985).

La microinfusión de CRH en el área arcuato-ventromedial del hipotálamo, inhibe el comportamiento de lordosis en la rata, efecto que depende de la LHRH y se bloquea por la administración de un antisuero anti- $\beta$ -endorfina

(Sirinthsinghji y cols 1983).

La infusión de naloxona revierte el efecto inhibitor de la CRH sobre los niveles plasmáticos de gonadotropinas, en los primates (Gindoff y Ferin 1987b; Barbarino y cols 1989). En la rata castrada, la administración de antisuero anti- $\beta$ -endorfina reduce el efecto inhibitor de la CRH, administrada por vía intracerebroventricular, sobre la secreción de LH (Petraglia y cols 1987). No obstante, en estos últimos trabajos no analizan el efecto del bloqueo opiáceo ya que por si solo induce un aumento de la secreción de LH.

Sin embargo Rivier y Vale (1984) observaron que la administración de naltrexona o de dexametasona, en dosis que inhibían el aumento de  $\beta$ -endorfina, no era capaz de modificar el efecto inhibitor de la CRH en ratas orquidectomizadas. Igualmente Almeida y cols (1988) no consiguieron antagonizar el efecto de la CRH en ratas macho castradas, por lo que concluyen que al menos parte de las acciones de la CRH sobre la LHRH no se realizan por mediación opiácea.

No se conoce muy bien el efecto de la CRH sobre la secreción hipotalámica de  $\beta$ -endorfina. Mediante inmunohistoquímica se han localizado terminales axónicas con CRH y  $\beta$ -endorfina en las mismas áreas del hipotálamo medio basal y de la eminencia media (Swanson y cols 1983). Varios autores han observado un efecto estimulante de la CRH sobre la secreción hipotalámica de  $\beta$ -endorfina (Nikolarakis y cols 1986a y 1986b; Kapcala y cols 1992). Sin embargo no se ha podido encontrar un efecto estimulante de la CRH sobre la  $\beta$ -endorfina hipotalámica en fragmentos de hipotálamo o cultivos de hipotálamos fetales (Sweep y Wiegat 1989). Incluso en los trabajos en los que se encuentra un efecto estimulante de la CRH sobre la  $\beta$ -endorfina hipotalámica, dicho efecto es transitorio y no se mantiene más de 45 minutos (Nikolarakis y cols 1986b). Además también se ha descrito que la exposición prolongada a la CRH disminuye la expresión del gen de la POMC en cultivos de neuronas hipotalámicas fetales (Hereault y Barden 1991). Estos resultados parecen indicar que la regulación de las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo que

### *Estrés y gonadotropinas*

sintetizan POMC es distinta a la de las células corticotropas hipofisarias, puesto que en este caso ni la CRH ni el estrés cuando se aplican de manera crónica aumentan la síntesis y secreción de los péptidos derivados de la POMC, al contrario de lo que ocurre en la hipófisis anterior. La secreción hipotalámica de los péptidos derivados de la POMC parecen depender fundamentalmente de los esteroides sexuales y de la dopamina (Wilcox y Roberts 1985; Vermes, Tilders y Stoof 1985; Chowen-Breed y cols 1989).

Desde hace bastante tiempo se conocen las acciones inhibitoras de los opiáceos endógenos sobre la secreción de gonadotropinas y parecen efectuarse a nivel hipotalámico inhibiendo la secreción de LHRH. Sin embargo, cuando se han estudiado dichas acciones en el hipotálamo *in vitro*, los resultados obtenidos por los distintos autores no son del todo claros. La naloxona no tiene siempre un efecto estimulante sobre la secreción de LHRH *in vitro*, sino que dependiendo de la concentración a la que se la añade al medio, puede no sólo no estimular la liberación de LHRH, sino por el contrario inhibirla (Rasmussen y cols 1988). Igualmente la administración de morfina *in vivo* tiene una acción claramente inhibitora de la secreción de LHRH y LH, sin embargo *in vitro* el efecto de la morfina es muy poco claro, puesto que se ha visto que, dependiendo de la dosis administrada, la morfina puede no tener efecto, inhibir o incluso estimular la secreción hipotalámica de LHRH (Rasmussen y cols 1988; Messi y cols 1989).

No podemos excluir la posibilidad de que los opiáceos actúen sobre la secreción de LHRH a través de un receptor que no se active con morfina ni si bloquee con la naloxona, como se ha descrito para la  $\beta$ -endorfina (Hazum, Chang y Cuatrecasa 1979). Sin embargo la  $\beta$ -endorfina, que dentro de los opiáceos endógenos es el que tiene mayor acción inhibitora sobre la secreción de LH (Bicknell 1985) no modifica la secreción basal de LHRH en perfusiones de hipotálamos, sino únicamente su respuesta al estímulo despolarizante con potasio (Clough, Hoffman y Sladek 1990; López-Calderón y cols 1992). Estos datos nos hacen pensar que posiblemente los opiáceos actúen sobre la neurona secretora de LHRH de modo indirecto, quizás a través

de vías que se encuentren fuera del hipotálamo medio basal.

Una posibilidad es que la CRH actúe directamente sobre la neurona secretora de LHRH. A favor de esta hipótesis están los resultados de Rasmussen y cols (1983) en los que se observa un descenso de la secreción de LHRH al administrar CRH, tanto a hipotálamo medio basal como en eminencia media aislada.



# ***CONCLUSIONES***



## *Conclusiones*

- 1.- Las catecolaminas juegan un papel activador en la secreción de LH durante los primeros minutos de inmovilización. Este efecto parece estar mediado por receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos.
- 2.- Las catecolaminas no intervienen en el aumento de la secreción de prolactina que se produce durante los primeros minutos de inmovilización.
- 3.- El aumento de la liberación hipotalámica de CRH durante la inmovilización crónica altera la secreción de LHRH, dando lugar secundariamente a un descenso de la secreción hipofisaria de gonadotropinas.
- 4.- El efecto inhibitor del estrés crónico y de la CRH sobre la secreción hipotalámica de LHRH e hipofisaria de gonadotropinas no está mediado por los opioides endógenos.
- 5.- El efecto inhibitor de la inmovilización crónica sobre la secreción de prolactina es independiente de la CRH hipotalámica.



# ***BIBLIOGRAFIA***



- ABERCROMBIE, E.D., KELLER, J.R., and ZIGMOND, M.J. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: Pharmacological and behavioral studies. *Neuroscience* 27:897-904 (1988).
- ADLER, M.W. Opioid peptides. *Life Science* 26:497-510 (1980)
- ADLER, B.A., CROWLEY, W.R. Modulation of luteinizing hormone release and catecholamine activity by opiates in the female rat. *Neuroendocrinology* 38:248-253 (1984).
- AJIKA, K., KALRA, S.P., FAWCETT, C.P., KRULICH, L., McCANN, S.M. The effect of stress and nembutal on plasma levels of gonadotropins and prolactin in ovariectomized rats. *Endocrinology* 90:707-715 (1972).
- AKIL, H. SHIOMI, H., MATTHEWS, J. Induction of the intermediate pituitary by stress: synthesis and release of a non opioid form of  $\beta$ -endorphin. *Science* 227:424-426 (1985).
- ALLOLIO, B., SCHULTE, H.M., DEUSS, U., KALLABIS, D., HAMEL, E. and WINKELMANN, W. Effect of oral morphine and naloxone on pituitary-adrenal response in man induced by human corticotropin-releasing hormone. *Acta Endocrinologica* 114:509-514 (1987).
- ALMEIDA, O.F.X., NIKOLARAKIS, K.E. and HERZ, A. Evidence for the involvement of endogenous opioids in the inhibition of luteinizing hormone by corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 122:1034-1041 (1988).
- ALVAREZ, C. Alteraciones en el eje reproductor inducidas por la administración crónica de agonistas del GnRH. Tesis doctoral. Fac. de Medicina, Univ. Complutense, Madrid. (1989)
- AMIR, S., BROWN, Z.W., AMIT, Z. The role of endorphins in stress: Evidences and speculations. *Neuroscience Biobehaviour Reviews* 4:77-87 (1980)
- ANTONI, F.A., HOLMES, M.C., JONES, M.T. Oxytocin as well as vasopressin potentiate ovine CRF in vitro. *Peptides* 4:411-415 (1983).
- ARIZNAVARRETA, C., CALDERON, M.D., TRESGUERRES, J.A.F. and LOPEZ-CALDERON, A. Effect of adrenalectomy and propranolol treatment on the response of gonadotrophins to chronic stress in male rats. *Journal of Endocrinology* 120:275-279 (1989).
- ARMARIO, A., CASTELLANOS, J.M. A comparison of corticoadrenal and gonadal responses to acute immobilization stress in rats and mice. *Physiology and Behaviour* 32:517-523 (1984).
- ARMARIO, A., LOPEZ-CALDERON, A., JOHN, T., CASTELLANOS, J.M. Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sciences* 39:471-475 (1986).
- ARMARIO, A. RESTREPO, C. HIDALGO, J. and LOPEZ-CALDERON, A. Differences in prolactin and LH responses to acute stress between peripuberal and adult male rats. *Journal of Endocrinology* 112:9-13 (1987)

*Estrés y gonadotropinas*

ARNETZ, B.B., LAHNBORG, G., ENEROTH, P., THUNELL, S. Age-related differences in the serum prolactin response during standardized surgery. *Life Science* 35:2675-2680 (1984)

AZNAR, A., ROMERO, N.A., HERRERA JUSTINIANO, A.E., DIAZ, M., AZNAR, R.A. Efecto de la administración de ACTH sobre la liberación de testosterona de la célula de Leydig. *Revista Española de Fisiología* 34:97-102 (1978)

BAGDY, G., CHROUSOS, G.P., CALOGERO, A.E. Circadian patterns of plasma immunoreactive corticotropin, beta-endorphin, corticosterone and prolactin after immunoneutralization of corticotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 53:573-578 (1991)

BAIZMAN, E.R., COX, B.M., OSMAN, O.H., GOLDSTEIN, A. Experimental alterations of endorphin levels in rat pituitary. *Neuroendocrinology* 28:402-424 (1979)

BAMBINO, T.H., HSUEH, A.J.W. Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology* 108:2142-2148 (1981).

BARBARINO, A., DE MARINIS, L., TOFANI, A., DELLA CASA, S., D'AMICO, C., MANCINI, A., CORSELLO, S.M., SCIUTO, R. and BARINI, A. Corticotropin-Releasing hormone inhibition of gonadotropin release and the effect of opioid blockade. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 68:523-528 (1989).

BARTANUSZ, V., JEZOVA, D., BERTINI, L.T., TILDERS, F.J.H., AUBRY, J.M., and KISS, J.Z. Stress-Induced Increase in Vasopressin and Corticotropin-Releasing Factor Expression in Hypophysiotrophic Paraventricular Neurons. *Endocrinology* 93:895-901 (1993).

BEITINS, I.Z., BAYARD, F., KOWARSKI, A. and MIGEON, C.J. The effect of ACTH administration on plasma testosterone, DHT, and serum LH concentrations in normal men. *Steroids* 21:447-553 (1973).

BHANOT, R., WILKINSON, M. Opiatergic control of LH secretion is eliminated by gonadectomy. *Endocrinology* 112:399-401 (1983a)

BHANOT, R., and WILKINSON, M. Opiatergic Control of Gonadotropin Secretion during Puberty in the Rat: a Neurochemical Basis for the Hypothalamic "Gonadostat?". *Endocrinology* 113:596-603 (1983b)

BHANOT, R., and WILKINSON, M. The inhibitory effect of opiates on gonadotrophin secretion is dependent upon gonadal steroids. *Journal of Endocrinology* 102:133-141 (1984).

BHATTACHARYA, A.N., DIERSCHKE, D.J., YAMAJI, T., KNOBIL, E. The pharmacologic blockade of the circadian mode of LH secretion in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 90:778-786 (1972).

BEN-JONATHAN, N. Dopamine, a prolactin-inhibiting hormone. *Endocrine Reviews* 6:564-689 (1985).

BICKNELL, R.J. Endogenous opioid peptides and hypothalamic neuroendocrine neurones. *Journal of Endocrinology* 107:437-446 (1985).

BIRMINGHAM, M.K., STUMPF, W.E. SAR, M. Localization of aldosterone and corticosterone in central nervous system assessed by quantitative autoradiography. *Neurochemistry Research* 9:333-342 (1984).

BJÖRKLUND, A., NOBIN, A. Fluorescence histochemical and microspectrofluorometric mapping of dopamine and noradrenaline cell groups in the rat diencephalon. *Brain Research* 51:193-205 (1973).

BLAKE, C.A. Effects of "stress" on pulsatile luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 148:813-815 (1975).

BLANK, M.S., ROBERTS, D.L. Antagonist of gonadotropin-releasing hormone blocks naloxone-induced elevations in serum luteinizing hormone. *Neuroendocrinology* 35:309-316 (1982).

BLANK, M.S., FABBRI, A., CATT, K.J. and DUFAU, M.L. Inhibition of luteinizing hormone release by morphine and endogenous opiates in cultured pituitary cells. *Endocrinology* 118:2097-2101 (1986).

BLISS, E.L., AILION, J. and ZWANZIGER, J. Metabolism of norepinephrine, serotonin and dopamine in rat brain with stress. *Journal of Pharmacology experimental Therapeutic* 164:122-134 (1968).

BOCCUZZI, G., ANGELI, A., BISBOCCI, D., FONZO, A., GAIDANO, G.P. GERESA, F. Effect of Synthetic LH-RH on the Release of gonadotropins in Cushing Disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 40:892-897 (1975).

BRIAUD, B., KOCH, B., LUTZ-BUCHER, B. and MIALHE, C. In vitro regulation of ACTH release from neurointermediate lobe of rat hypophysis. *Neuroendocrinology* 28:377-385 (1979).

BRISKI, K.P., QUIGLEY, K. and MEITES, J. Endogenous opiate involvement in acute and chronic stress-induced changes in plasma LH concentrations in the male rat. *Life Sciences* 34:2485-2493 (1984).

BRISKI, K.P., SYLVESTER, P.W. Effect of specific acute stressors on luteinizing hormone release in ovariectomized and ovariectomized estrogen-treated female rats. *Neuroendocrinology* 47:194-202 (1988).

BRISKI, K.P. and SYLVESTER, P.W. Inhibition of pituitary bioactive prolactin secretion in the male rat by glucocorticoid agonist decadron phosphate. *Biology of Reproduction* 47:478-484 (1992).

BROWN, M.R., FISHER, L.A., SPIESS, J., RIVIER, C., RIVIER, J. VALE, W. Corticotropin-Releasing Factor: Actions on the Sympathetic Nervous System and Metabolism. *Endocrinology* 111:928-931 (1982).

BROWNSTEIN, M.J., ESKAY, R.L., PALKOVITS, M. Thyrotropin releasing hormone in the median eminence is in the processes of paraventricular nucleus neurons. *Neuropeptides* 2:197-201 (1982).

BRUHN, T.O., PLOTSKY, P.M. and VALE, W.W. Effect of Paraventricular Lesions on Corticotropin Releasing Factor (CRF)-Like Immunoreactivity in the Stalk-Median Eminence: Studies on the Adrenocorticotropin Response to Ether Stress and Exogenous

*Estrés y gonadotropinas*

CRF. *Endocrinology* 114:57-62 (1984).

BRUNI, J.F., VAN VUGT, D., MARSHALL, S., MEITES, J. Effects of naloxone, morphine and methionine enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. *Life Sciences* 21:461-466 (1977).

BRUNI, J.F., HAWKINS, R.L., YEN, S.S.C. Serotonergic mechanisms in the control of beta-endorphin and ACTH release in male rats. *Life Sciences* 30:1247-1251 (1982)

BUCKINGHAM, J.C., HODGES, J.R. Production of corticotrophin releasing hormone by the isolated hypothalamus of the rat. *Journal of Physiology* 272:469-479 (1977).

BUCKINGHAM, J.C., COOPER, T.A. Differences in hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in the rat after acute and prolonged treatment with morphine. *Neuroendocrinology* 38:411-417 (1984).

BUCKINGHAM, J.C. Stimulation and inhibition of corticotropin releasing factor secretion by beta-endorphin. *Neuroendocrinology* 42:148-152 (1986).

CARR, L.A., CONWAY, P.M., and VOOGT, J.L. Role of norepinephrine in the release of prolactin induced by suckling and estrogen. *Brain Research* 133:305-314 (1977).

CHANTARAPRATEEP, P., THIBIER, M. Effects of Dexametasone and Testosterone propionate on LH Response to Gonadoliberin (LRH) in young Post-Pubertal Bulls. *Andrologia* 11:25-32 (1979).

CHARNEY, D.S. and REDMOND, D.E. Neurobiological mechanisms in human anxiety: evidence supporting central noradrenergic activity. *Neuropharmacology* 22:1531-1536 (1983).

CHARNEY, D.S., HENINGER, G.R., & REDMON, D.E. Yohimbine induced anxiety and increased noradrenergic function in humans: effects of diazepam and clonidine. *Life Science* 33:19-29 (1983).

CHARPENET, G., TACHE, Y., BERNIER, M., DUCHARME, J.R. and COLLU R. Stress-Induced Testicular Hyposensitivity to Gonadotropin in Rats. Role of the Pituitary Gland. *Biology of Reproduction* 27:616-623 (1982).

CHARRO-SALGADO, A.L., LOPEZ-MANCIA, A., PEREZ-INFANTE, V. and FERNANDEZ-CRUZ, A. Failure of gonadotropin response to LH-RH in Cushings disease and in ACTH-treated patients: Demostration of adrenal dependence. *Endocrinología* 26:96-103 (1979).

CHING, M. Correlative surges of LHRH, LH and FSH in pituitary stalk plasma and systemic plasma of rat during proestrus:Effect of anesthetics. *Neuroendocrinology* 34:279-285 (1982).

CHOWEN-BREED, J., FRASER, H.M., VICIAN, L., DAMASSA, D.A., CLIFTON, D.K., and STEINER, R.A. Testosterone regulation of proopiometanocortin messenger ribonucleic acid in the arcuatus nucleus of the male rat. *Endocrinology* 124:1697-1702 (1989).

CHRISTIAN, J.J. LLOYD, Y.AZ., DAVIS, D. The role of endocrines in the self-regulation of mammalian population. *Recent Progress Hormones Research* 21:501-578 (1965).

CICERO, T.J., SCHAIKER, B.A., MEYER, E.R. Endogenous Opioids Participate in the Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Luteinizing Hormone Axis and Testosterone's Negative Feedback Control of Luteinizing Hormone. *Endocrinology* 104:1286-1291 (1979).

CICERO, T.J., SCHOMOEKER, P.F., MEYER, E.R., and MILLER, B.T. Luteinizing Hormone Releasing Hormone Mediates Naloxone's effects on serum luteinizing hormone levels in normal and morphine-sensitized male rats. *Life Sciences* 37:467-474 (1985).

CIVELLI, O., BIRNBERG, N. and HERBERT, E. Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *Journal of Biological Chemistry* 257:6783-6787 (1982).

CLOUGH, R.W., HOFFMAN, G.E., and SLADEK, C.D. Sinergistic interaction between opioid receptor blockade and alfa-adrenergic stimulation on luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion *in vitro*. *Neuroendocrinology* 51:131-138 (1990).

COCCHI, D., FRASCHINI, F., JALANBO, H., and MÜLLER, E.E. Role of brain catecholamines in the postcastration rise in plasma LH of prepubertal rats. *Endocrinology* 95:1649-1657 (1974).

COE, C.L., MENDOZA, S.P., DAVIDSON, J.M., SMITH, E.R., DALLMAN, M.F., LEVINE, S. Hormonal Response to Stress in the Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). *Neuroendocrinology* 26:367-377 (1978).

COHEN, J.L., MAY, P.B., KIM, C.S., DAS, B., AUSTIN, S.M., ERTEL, N.H. Graded exercise induced changes in pituitary hormones. *Clinical research* 28:257A (1980).

COLLU, R., TACHE, Y., DUCHARME, J.R. Hormonal Modifications Induced by Chronic stress in Rats. *Journal of Steroid Biochemistry* 11:989-1000 (1979a).

COLLU, R., DU RUISSEAU, P., TACHE, Y. Role of putative Neurotransmitters in prolactin, GH, LH response to acute Immobilization stress in male rats. *Neuroendocrinology* 28:178-186 (1979b).

CORRODI, H., FUXE, K., HÖKFELT, T. The effect of immobilization stress on the activity of central monoamine neurons. *Life Science* 7:107-112 (1968).

CORRODI, H., FUXE, K., LIDBRINK, P., and OLSON, L. *Minor tranquilizers, stress and central catecholamine neurons*. *Brain Research* 29:1-16 (1971).

CULMAN, J., KVETNANSKY, R., TORDA, T., MURGAS, K. Serotonin concentration in individual hypothalamic nuclei of rats exposed to acute immobilization stress. *Neuroscience* 5:1503-1506 (1980).

CUMMINGS, S., SEYBOLD, V. Relationship of alpha-1- and alpha-2-adrenergic-binding sites to regions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus containing corticotropin-releasing factor and vasopressin neurons. *Neuroendocrinology* 47:523- (1988).

DALLMAN, M.F. and JONES, M.T. Corticosteroid feedback control of ACTH secretion; effects of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress response in the rat. *Endocrinology* 92:1367-1375 (1973).

## *Estrés y gonadotropinas*

DE GOEIJ, D.C.E., KVETNANSKY, R., WHITNALL, M.H., JESOVA, D., BERKENBOSCH, F., and TILDERS, F.J.H. Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin releasing factor in the median eminence of rats. *Neuroendocrinology* 53:150-159 (1991).

DE KLOET, R., WALLACH, G., McEWEN, B.S. Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat brain and pituitary. *Endocrinology* 96:598-609 (1975).

DELITALA, G., GROSSMAN, A., BESSER, M. Differential Effects of Opiate Peptides and Alkaloids on Anterior Pituitary Hormone Secretion. *Neuroendocrinology* 37:275-279 (1983).

DE SOUZA, E.B., PERRIN, M.H., INSEL, T.R., RIVIER, J., VALE, W.W., KUCHAR, M.J. Corticotropin-Releasing Factor Receptors in Rat Forebrain: Autoradiographic Identification. *Science* 224:1449-1451 (1984).

DE WIED, D. and JOLLES, J. Neuropeptides derived from proopiomelanocortin: behavioral, physiological and neurochemical effects. *Physiological Reviews* 62:976-1059 (1982).

DONOSO, A.D., BISHOP, W., FAWCETT, C.P., KRULICH, L., and McCANN, S.M. Effects of drugs that modify brain monoamine concentrations on plasma gonadotropin and prolactin levels in the rat. *Endocrinology* 89:774-784 (1971).

DROUVA, S.V., LAPALANTE, E., KORDON, C.  $\alpha_1$ -Adrenergic receptor involvement in the LH surge in ovariectomized estrogen primed rats. *European Journal of Pharmacology* 81:341-344 (1982).

DROUVA, S.V., EPELBAUM, J., KORDON, C. Hormonal regulation of an ionic requirements for *in vitro* release of hypothalamic peptides. En: "Hormonally Active Brain Peptides", Mckerns, Pantic, editors, pp 99-123, Plenum Press, New York (1982).

DUBOCOVICH, M.L. Presynaptic alpha-adrenoceptors in the central nervous system. *Annual New York Academic Science* 430:7-25 (1984).

DUCHARME, J.R., TACHE, Y., CHARPENET, G. and COLLU, R. Effects of stress on the Hypothalamic-Pituitary-Testicular Function in Rats. En "Brain Peptides and Hormones". R. Collu et al. (ed) Raven Press, N.Y. 305-318 (1982).

DU RUISSEAU, P. TACHÉ, Y. BRACEAU, P., COLLU, R. Effects of chronic immobilization stress on pituitary hormone secretion, on hypothalamic factor levels and on pituitary responsiveness to LHRH and TRH in female rats. *Neuroendocrinology* 29:90-99 (1979).

DYER, R.G., MANSFIELD, S., CORBET, H. and DEAN, A.D.P. Fasting impairs LH secretion in female rats by actuating on inhibitory opioid pathway. *Journal of Endocrinology* 105:91-97 (1985).

EBERHART, J.A., HERBERT, J., KEVERNE, E.B., and MELLER, R.E. Some hormonal aspects of primate social behaviour. *Proceedings of the Sixth International Congress of Endocrinology*, 622-625, Melbourne, Australia (1980).

ELLINGBOE, J., VELDHVIS, J.D., MENDELSON, J.H., KVEHNLE, J.C., MELLO, N.K. Effect of endogenous opioid blockade on the amplitude and frequency of pulsatile

lutinizing hormone secretion in normal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 54:854-857 (1982).

ENGELAND, W.C., SHINSAKO, J., WINGET, C.M., VERNIKOS-DANELIS, J., DALLMAN, M.F. Circadian Patterns of Stress-induced ACTH secretion are modified by corticosterone responses. *Endocrinology* 100:138-147 (1977).

EUKER, J.S., MEITES, J., RIEGLE, G.D. Effects of acute stress on serum LH and Prolactin in Intact, Castrate and Dexametasone-treated male rats. *Endocrinology* 96:85-92 (1975).

EVERITT, B.J., HERBERT., J. and KEVERNE, E.B. The neuroendocrine anatomy of the limbic system: a discussion with special reference to steroid responsive neurons, neuropeptides and monoaminergic systems. In Navaratnam V. & Harrison R.J. (eds) *Progress in Anatomy*, Vol. 3:235-260 (1983), Cambridge University Press.

FABBRI, A., TINAJERO, J.C., DUFAU, M.L. Corticotropin-Releasing Factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role in the testis. *Endocrinology* 127:1541-1543 (1990).

FAMILARI, M., SMITH, A.I., SMITH, R., FUNDER, J.W. Arginine vasopressin is a much more potent stimulus to ACTH release from ovine anterior pituitary cells than ovine corticotropin-releasing factor. I. *In vitro* studies. *Neuroendocrinology* 50:152-157 (1989).

FENSKE, M., GROSPETSON, G. and KONING, A. Effect of ether stress on plasma glucocorticosteroid and aldosterone concentrations in immature and adult rabbits. *Acta Endocrinologica. sspl.* 234:148-149 (1980).

FERNANDEZ-GALAZ, C. HERBISON, A.E., and DYER, R.G. Characterization of tritiated noradrenaline release from the rat preoptic area with microdialysis *in vivo*. *En prensa* (1993).

FILE, S.A., PEET, L.A. The Sensitivity of the Rat Corticosterone Response to Environmental Manipulations and to Chronic Chlordiazepoxide Treatment. *Physiology and Behaviour* 25:753-758 (1980).

FIORINDO, R.P., JUSTO, G., MOTTA, M., SIMONOVIC, I., and MARTINI, L. Cholinergic mechanisms and the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. In: *Anatomical Neuroendocrinology*; edited by W.E. Stumpff and L.D. Grant, pp:443-444. S. Karger, New York, (1975).

FISCHER, J.L., and MORIARTY, C.M. Control of bioactive corticotropin-release from the neuro-intermediate lobe of the rat pituitary *in vitro*. *Endocrinology* 100:1047-1054 (1977).

FRAIOLI, F., PANERAI, A.E., SANTORO, C., FABBRI, A., SANTORO, F., and ISIDORI, A. Control of Gonadotropin Secretion in Man: Role of Opioid Peptides. *Hormone metabolism Research* 14:312-316 (1982).

FRANKENHAEUSER, M., RAUSTE-VON WRIGHT, M., COLLINS, A., VON WRIGHT, J., SEDVALL, G. and SWAHN, C.G. Sex differences in psychoneuroendocrine reactions to examination stress. *Psychosomatic Medicine* 40:334-343 (1978).

FRANTZ, A.G., WARDLAW, S.L., RAGAVAN, V.V., THORON, L., WEHREBERG, W.B.,

*Estrés y gonadotropinas*

- and FERIN, M. Opioid Regulation of pituitary secretion. *Physiopathology of Hypophysial Disturbances and Diseases of Reproduction*. Alan R. Liss, Inc. N.Y. 153-177 (1982).
- FRISCH, R.E., WYSHAK, G., VINAULT, L. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. *New England Journal of Medicine* 303:17-23 (1980).
- FUJIEDA, K., HIROSHIGE, T. Changes in rat hypothalamic content of corticotrophin-releasing factor (CRF) activity, plasma ACTH and corticosterone under stress and the effect of cycloheximide. *Acta Endocrinologica* 89:10-19 (1978).
- FUXE, K. Evidence for existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiologica Scandinava Suppl.* 247:36-85 (1965).
- FUXE, K., ANDERSSON, K., ENEROTH, P., SIEGEL, R.A., & AGNATI, L.E. Immobilization stress-induced changes in discrete hypothalamic catecholamine levels and turnover, their modulation by nicotine and relationship to neuroendocrine function. *Acta Physiologica Scandinava* 117:421-426 (1983).
- GABRIEL, S.M. and SIMPKINS, J.V. Effects of a Sustained-Release Naloxone Pellet on Luteinizing Hormone Secretion in Female Rats. *Neuroendocrinology* 37:342-348 (1983).
- GAGNER, J.P., DROUIN, J. Opposite regulation of proopiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 49:25-32 (1985).
- GALZIN, A.M., MORET, C. and LANGER, S.Z. Evidence that exogenous but not endogenous norepinephrine activates the presynaptic alpha-2 adrenoceptors on serotonergic nerve endings in the rat hypothalamus. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*. 228:725-732 (1984).
- GAMBACCIANI, M., YEN, S.S.C., and RASMUSSEN, D.D. GnRH Release from the Mediobasal Hypothalamus: in vitro Inhibition by Corticotropin-Releasing Factor. *Neuroendocrinology* 43:533-536 (1986).
- GANONG, W.F. The central nervous system and the synthesis and release of adrenocorticotrophic hormone. In: *Advances in Neuroendocrinology*, edited by A.V. Nalbandov, Urbana Univ. of Illinois Press, 92-149 (1963).
- GANONG, W.F. Neurotransmitters and pituitary function. Regulation of ACTH secretion. *Federal Proceedings* 39:2915-2921 (1980).
- GARCIA-MARQUEZ, C., ARMARIO, A. Chronic stress depresses exploratory activity without altering ACTH response to a novel acute stressor. *Physiology and Behavior* 40:33-38 (1987).
- GEARING, M., TERASAWA, E. The alpha-1-adrenergic neuronal system is involved in the pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone in ovariectomized female rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 53:373-381 (1991).
- GEE, C.E., CHEN, C.L.C., ROBERTS, J.L., THOMPSON, R. and WATSON, S.L. Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by *in situ* cDNA-mRNA hybridization. *Nature* 306:374-376 (1983).

GIBBS, D.M., VALE, W. Presence of corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in hypophysial portal blood. *Endocrinology* 111:1418-1420 (1982).

GIBBS, D.M. Dissociation of oxytocin, vasopressin, and corticotropin secretion during different types of stress. *Life Science* 35:487-491 (1984).

GIBBS, D.M. Stress-Specific Modulation of ACTH Secretion by Oxitocin. *Neuroendocrinology* 42:456-458 (1986).

GIBSON, M.J., KRIEGER, D.T. Circadian corticosterone rhythm and stress response in rats with adrenal autotransplants. *American Journal of Physiology* 240:E363-E366 (1981).

GILLIES, G., LOWRY, P. Corticotropin releasing factor may be modulated vasopressin. *Nature (London)* 278:463-464 (1979).

GINDOFF, P.R. and FERIN, M. Brain opioid peptides and menstrual cyclicity. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 5:125-133 (1987a).

GINDOFF, P.R. and FERIN, M. Endogenous opioid peptides modulate the effect of corticotropin-releasing factor on gonadotropin release in the primate. *Endocrinology* 12:837-842 (1987b).

GITZEN, J.F., RAMIREZ, V.D. In vivo  $\alpha_1$  adrenergic stimulation of LHRH release from the female rat using push-pull cannulae. *Society Neuroscience Abstr.* 14:512 (1988).

GLAVIN, G.B. Stress and brain noradrenaline: a review. *Neuroscience Biobehaviour Review* 9:233-243 (1985).

GOLD, M., DONABEDIAN, R., and REDMOND, R. Further evidence for alpha-2-adrenergic receptor mediated inhibition of prolactin secretion: The effect of yohimbine. *Psychoneuroendocrinology* 3:253-260 (1979).

GRAY, G.D., SMITH, E.R., DAMASSA, D.A., EHRENKRANZ, J.R.L., DAVIDSON, J.M. Neuroendocrine mechanism mediating the suppression of circulating testosterone levels associated with chronic stress in male rats. *Neuroendocrinology* 25:247-256 (1978).

GROSSMAN, A., DELITALA, G., MANNELLI, M., AL-DAMLUJI, S., COY, D.H. and BESSER, G.M. An analogue of met-enkephalin attenuates the pituitary-adrenal response to ovine corticotropin releasing factor. *Clinical Endocrinology* 17:379-388 (1986).

GROSSMAN, A. Opioids and stress in man. *Journal of Endocrinology* 119:377-381 (1988).

GUILLEMIN, R., VARGO, T., ROSSIER, J., MINICK, S., LING, N., RIVIER, C., VALE, W., BLOM, F.  $\beta$ -endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly in the pituitary gland. *Science* 197:1367-1369 (1977).

GUILLAUME, V., CONTE-DEVOLX, B., SZAFARCZYK, A., MALAVAC, F., PARES-HERBUTE, N., GRINO, M., ALONSO, G., ASSENMACHER, I., OLIVER, C. The corticotropin-releasing factor release in rat hypophysial portal blood is mediated by brain catecholamines. *Neuroendocrinology* 46:143-146 (1987).

GUILLAUME, V., CONTE-DEVOLX, B., MAGNAN, E., BOUDOURESQUE, F., GRINO, M., CATALDI, M., MURET, L., PRIOU, A., DEPPEZ, P., FIGAROLI, J.C., and OLIVER, C.

## *Estrés y gonadotropinas*

Effect of chronic active immunization anti-corticotropin-releasing factor on the pituitary-adrenal function in the sheep. *Endocrinology* 130:2291-2298 (1992).

HAANWINCKEL, M.A., ANTUNES-RODRIGUES, J., De CASTRO E SILVA, E. Role of central beta-adrenoceptors on stress-induced prolactin release in rats. *Hormone metabolism research* 23:318-320 (1991)

HAGINO, N., WATNABE, M., GOLDZIEHER, J.W. Inhibition by Adrenocorticotrophin of Gonadotrophin-Induced ovulation in Immature Female Rats. *Endocrinology* 84:308-314 (1969).

HALES, D.B., and PAYNE, A.H. Glucocorticoid-Mediated repression of P450<sub>ccc</sub> mRNA and the novo synthesis in cultured Leydig cells. *Endocrinology* 124:2099-2104 (1989).

HARBUZ, M.S. and LIGHTMAN, S.L. Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat. *Journal of Endocrinology* 122:705-711 (1989).

HARBUZ, M.S., NICHOLSON, S.A., GILLHAM, B., and LIGHTMAN, S.L. Stress responsiveness of hypothalamic corticotrophin-releasing factor and pituitary pro-opiomelanocortin mRNAs following high-dose glucocorticoid treatment and withdrawal in the rat. *Journal of Endocrinology* 127:407-415 (1990).

HAZUM, E.K., CHANG, K., and CUATRECASAS, P. Specific non opiate receptor for  $\beta$ -endorphin. *Science* 205:1033-1035 (1979).

HAUGER, R.L., MILLAN, M.A., LORANG, M., HARWOOD, J.P. and AGUILERA, G. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology* 123:396-405 (1988).

HEAULME, M., DRAY, F. Noradrenaline and Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulate LHRH Release from Rat Median Eminence through Distinct 1-Alpha-Adrenergic and PGE<sub>2</sub>-Receptors. *Neuroendocrinology* 39:403-407 (1984).

HEDGE, G.A., VAN REE, J.M., VERSTEEG, D.H.G. Correlation between hypothalamic catecholamine synthesis and ether stress-induced ACTH secretion. *Neuroendocrinology* 21:236-246 (1976).

HEISLER, S., REISINE, T. and AXELROD, J. Desensitization of beta<sub>2</sub>-adrenergic receptors and adrenocorticotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 11:112-119 (1983).

HERRENKOHL, L.R., POLITEH, J.A. Effects of prenatal stress on the estrous cycle of female offspring as adults. *Experientia* 34:1240-1251 (1978).

HILLHOUSE, E.W., BURDEN, J., JONES, M.T. The effect of Various Putative Neurotransmitters on the Release of Corticotrophin Releasing Hormone from the Hypothalamus of the rat *in vitro*. I. The Effect of Acetylcholine and Noradrenaline. *Neuroendocrinology* 17:1-11 (1975).

HOLLT, V., PRZEWŁOCKI, R., HAARMANN, I., ALMEIDA, O.F.X., KLEY, N., MILLAN, M.J., HERZ, A. Stress-induced alterations in the levels of messenger RNA coding for proopiomelanocortin and prolactin in rat pituitary. *Neuroendocrinology* 43:277-282 (1986).

- HOWLAND, B.E., BEATON, D.B., JACK, M.I. Changes in Serum Levels of Gonadotroping and Testosterone in the Male Rat in Response to Fasting, Surgery and Ether. *Experientia* 30:1223-1224 (1974).
- JACKISH, R., WERLE, E., and HERTTING, C. Identification of mechanisms involved in the modulation of release of noradrenaline in the hippocampus of the rabbit *in vitro*. *Neuropharmacology* 23: 1363-1371 (1984).
- JARRY, H., LEONHARDT, S. and WUTTKE, W. A norepinephrine-dependent mechanism in the preoptic/anterior hypothalamic area but not in the mediobasal hypothalamus is involved in the regulation of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 51:337-344 (1990).
- JOHNSON, B.H., WELSH, T.H., JUNIEWICZ, P.E. Suppression of Luteinizing Hormone and Testosterone Secretion in Bulls Following Adrenocorticotropin Hormone Treatment. *Biology of Reproduction* 26:305-310 (1982).
- JOHNSTON, C.A., SPINEDI, E.J., NEGRO-VILAR, A. Effect of acute ether stress on monoamine metabolism in median eminence and discrete hypothalamic nuclei of the rat brain and on anterior pituitary hormone secretion. *Neuroendocrinology* 41:83-88 (1985).
- JONSSON, G., FUXE, K., and HÖKFELT, T. On the catecholamine innervation of the hypothalamus with special reference to the median eminence. *Brain Research* 77:269-279 (1972).
- JORGENSEN, H., KNIGGE, U., WARBERG, J. Effect of Serotonin 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, and 5-HT<sub>3</sub> Receptor Antagonists on the Prolactin Response to Restraint and Ether Stress. *Neuroendocrinology* 56:371-377 (1992).
- JUDD, S.J., RIGG, L.A., YEN, S.S.C. The effects of ovariectomy and estrogen treatment on the dopamine inhibition of gonadotropin and prolactin release. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 49:182-184 (1979).
- KAJI, H., CHIHARA, K., KITA, T., KASHIO, Y., OKIMURA, Y. and FUJITA, T. Administration of antisera to vasoactive intestinal polypeptide and peptide histidine isoleucine attenuates ether induced prolactin secretion in rats. *Neuroendocrinology* 41:529-531 (1985).
- KALIN, N.H., CARNES, M., BARKSDELE, C.M., SHELTON, S.E., STEWART, R.D., and RISCH, S.C. Effects of Acute Behavioral Stress on plasma and Cerebrospinal Fluid ACTH and  $\beta$ -Endorphin in Rhesus Monkeys. *Neuroendocrinology* 40:97-101 (1985).
- KALRA, S.P. Neural circuitry involved in the control of LHRH secretion: A model for preovulatory LH release. In Ganong W.F., Martini, L. (eds). En: "Frontiers in Neuroendocrinology", New York, Raven, Vol 9:31-75 (1981b).
- KALRA, S.P., KALRA, P.S. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrine Reviews* 4:311-351 (1983b).
- KALRA, X.P. Catecholamine Involvement in Preovulatory LH Release: Reassessment of the Role of Epinephrine. *Neuroendocrinology* 40:139-144 (1985).
- KALRA, P.S., CROWLEY, W.R. and KALRA, S.P. Differential *in vitro* Stimulation by Naloxone and K<sup>+</sup> Catecholamine release from the Hypothalami of Intact and Castrated

*Estrés y gonadotropinas*

Rats: *Endocrinology* 120:178-185 (1987).

KANT, G.J., MOUGEY, E.H., MEYERHOFF, J.L. Diurnal variation in neuroendocrine response to stress in rats: plasma ACTH,  $\beta$ -endorphin,  $\beta$ -LPH, corticosterone, prolactin and pituitary cyclic AMP responses. *Neuroendocrinology* 43:383-387 (1986).

KANT, G.J., LEU, J.R., ANDERSON, S.M., and MOUGEY, E.H. Effects of chronic stress on plasma corticosterone ACTH and prolactin. *Physiology and Behavior* 40:775-779 (1987).

KAPCALA, L.P. and WENG, C. *In vitro* regulation of immunoreactive  $\beta$ -endorphin secretion from adult and fetal hypothalamus by sequential stimulation with corticotropin-releasing hormone. *Brain Research* 588:13-20 (1992).

KAUFMAN, J.M., KESNER, J.S., WILSON, R.C., KNOBIL, E. Electrophysiological manifestation of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: Influence of  $\alpha$ -adrenergic and dopaminergic blocking agents. *Endocrinology* 116:1327-1333 (1985).

KAWAKAMI, M., HIGUCHI, T., MATSUURA, M. Immobilization stress and prolactin secretion in male rats. Possible roles of dopamine and TRH. *Neuroendocrinology* 29:262-269 (1979).

KELLER-WOOD, M., DALLMAN, M. Corticosteroids inhibition of ACTH secretion. *Endocrine Reviews* 5:1-26 (1984).

KJOER, A., KNIGGE, U., BACH, F.W., and WARBERG, J. Histamine -and Stress-Induced Secretion of ACTH and  $\beta$ -Endorphin: Involvement of Corticotropin-Releasing Hormone and Vasopressin. *Neuroendocrinology* 56:419-428 (1992).

KLEIN, F., LEMAIRE, V., SANDI, C., VITIELLO, S., VAN DER LOGT, J., LAURENT, P.E., NEVEN, P., LE MOAL, M., MARMEDE, P. Prolonged increase of corticosterone secretion by chronic social stress does not necessarily impair immune functions. *Life Sciences* 50:723-731 (1992).

KLETZKY, O.A., SHANGOLD, G.A. Variability and selectivity of anterior pituitary response to dopamine agonists throughout the normal menstrual cycle. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 154:362-367 (1986).

KNIGGE, U., MATZEN, S. and WARBERG, J. Histaminergic Mediation of the stress-Induced Release of Prolactin in Male Rats. *Neuroendocrinology* 47:68-74 (1988).

KNOBIL, E. On the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Recent Progr. Hormone Res.* 30:1-36 (1974).

KORF, J., AGHAJANIAN, G.K., ROTH, R.H. Increased turnover of norephrine in the rat cerebral cortex during stress: Role of the locus coeruleus. *Neuropharmacology* 12:933-938 (1973).

KRAICER, J., and MORRIS, R. *In vitro* release of ACTH from dispersed rat pars intermedia cells. II. Effect of neurotransmitter substances. *Neuroendocrinology* 21:175-192 (1976).

KRIEG, R.J. and SAWYER, S. Effects of intraventricular catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized-steroid-primed rats. *Endocrinology* 99:411-419

(1976).

KRSTULOVIC, A. M. Investigations of catecholamine metabolism using high-performance liquid chromatography. Analytical methodology and clinical applications. *Journal of Chromatography* 229:1-6 (1982).

KRULICH, L., HEFCO, E., ILLNER, P. and READ, C.B. The effects of Acute Stress on the Secretion of LH, FSH, Prolactin and GH in the Normal Male Rat with comments on their Statistical Evaluation. *Neuroendocrinology* 16:293-311 (1974).

KVETNANSKY, R., PALKOVITS, M., MITRO, A., TORDA, T., MIKULAS, L. Catecholamines in individual hypothalamic Nuclei of acutely and repeatedly stressed rats. *Neuroendocrinology* 23:257-267 (1977).

LACHUER, J., GAILLET, S., BARBAGLI, B., BUDA, M., TAPPAZ, M. Differential early Time Course activation of the brainstem catecholaminergic groups in response to various stresses. *Neuroendocrinology* 53:589-596 (1991).

LAL, S., TOLIS, G., MARTIN, J.B., BROWN, G.M., and GUYDA, H. Effect of clonidine on growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone in the serum of normal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 41:827-832 (1975).

LANG, R.E., HEIL, J.W.W., GANTEN, D., HERMANN, K., UNGER, T., RASCHER, W. Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 37:314-316 (1983).

LANGER, S.Z. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacological Reviews* 32:337-362 (1981).

LEADEM, C.A., CROWLEY, W.R., SIMPKINS, J.W., KALRA, S.P. Effects of Naloxone on Catecholamine and LHRH Release from the perfused Hypothalamus of the Steroid-Primed Rat. *Neuroendocrinology* 40:497-500 (1985).

LEADEM, C.A., and YAGENOVA, S.V. Effects of Specific Activation of Mu-, Delta-, and kappa- Opioid Receptors on the secretion of Luteinizing Hormone and Prolactin in the Ovariectomized Rat. *Neuroendocrinology* 45:109-117 (1987).

LEHMANN, H., VASAVAN NAIR, N.P., KLINE, N.S.  $\beta$ -Endorphin and naloxone in psychiatric patients. Clinical and biological effects. *American Journal of Psychiatry* 136:762-766 (1979).

LEIPHEIMER, R.E., and GALLO, R.V. Medial preoptic area involvement in norepinephrine-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 40:345-351 (1985).

LE MEVEL, J.C., ABITBOL, S., BERAUD, G., MANIEY, J. Temporal changes in plasma adrenocorticotropin concentration after repeated neurotropic stress in male and female rats. *Endocrinology* 105:812-817 (1979).

LENGYEL, A.J., GROSSMAN, A., ACKLAND, J., NIEUWENHUYZEN-KRUSEMAN, A.C., REES, L.H. Glucose Modulation of Somatostatin and LHRH Release from Rat Hypothalamic Fragments *in vitro*. *Neuroendocrinology* 39:31-38 (1984).

## *Estrés y gonadotropinas*

LEUNG, F.C., CHEN, H.T., VERKAIK, S.J., STEGER, R.W., PELUSO, J.J., CAMPBELL, G.A., MEITES, J. Mechanism by which adrenalectomy and corticosterone influence prolactin release in the rat. *Journal of Endocrinology* 87:131-140 (1980).

L'HEREAULT, S. and BARDEN, N. Regulation of proopiomelanocortin messenger RNA concentrations by opioid peptides in primary cell cultures of rat hypothalamus. *Molecular Brain Research*, 10:115-121 (1991).

L'HEUREUX, R., DENNIS, T., CURET, O., and SCATTON, B. Measurement of endogenous noradrenaline release in the rat cerebral cortex *in vivo* by transcortical dialysis: Effects of drugs affecting noradrenergic transmission. *Journal of Neurochemical* 46:1794-1801 (1986).

LIEN, E., MORRISON, A., KASSARICH, J. and SULLIVAN, D. Alpha-2-adrenergic control of prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 44:184-189 (1986).

LIGHTMAN, S.L., and YOUNG, W.S. Corticotropin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *Journal of Physiology* 403:511-523 (1988).

LIGHTMAN, S.L., and YOUNG, W.S. Influence of steroids on the hypothalamic corticotropin-releasing factor and pre-proenkephalin mRNA responses to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 86:4306-4310 (1989).

LIMONTA, P., MAGGI, R., DONDI, D., MOTTA, M. Effect of naloxone on gonadotropin and prolactin secretion during the estrous cycle. *Journal of Endocrinology Investigations* 8 suppl. 3:26 (1985).

LINTON, E.A., TILDERS, F.J.H., HODGKINSON, S., BERKENBOSCH, F., VERMES, I., LOWRY, P.J. Stress-induced secretion of adrenocorticotropin in rats is inhibited by administration of antisera to ovine corticotropin-releasing factor and vasopressin. *Endocrinology* 116:966-970 (1985).

LIPOSITS, Z.S., PHELIX, C., PAULL, W.K. Adrenergic innervation of corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Histochemistry* 84:201-205 (1986).

LIPTRAP, R.M., and RAESIDE, J.I. Effect of cortisol on the response to gonadotrophin releasing hormone in the boar. *Journal of Endocrinology* 97:75-81 (1983).

LOPEZ-CALDERON, A. and TRESGUERRES, J.A.F. Glucocorticoid and pituitary gonadotropin secretion in the adult male rat. *Journal of Steroids Biochemistry* 17:256-26 (1982).

LOPEZ-CALDERON, A., ESQUIFINO, A.I., y TRESGUERRES, J.A.F. Influencia de la ACTH y los glucocorticoides sobre los niveles plasmáticos de prolactina en la rata macho. *Revista Española de Fisiología* 40:483-488 (1984).

LOPEZ-CALDERON, A., ARIZNAVARRETA, C., CALDERON, M.D., and TRESGUERRES, J.A.F. Gonadotropin inhibition during chronic stress: role of the adrenal gland. *Journal of Steroids Biochemistry* 27:609-614 (1987).

LOPEZ-CALDERON, A., ARIZNAVARRETA, C., CALDERON, M.D., TRESGUERRES, J.A.F., and GONZALEZ-QUIJANO, M.I. Role of the adrenal cortex in chronic stress-induced inhibition of prolactin secretion in male rats. *Journal of Endocrinology* 120:269-

273 (1989).

LOPEZ-CALDERON, A., GONZALEZ-QUIJANO, M.I., TRESGUERRES, J.A.F., and ARIZNAVARRETA, C. Role of LHRH in the gonadotrophin response to restraint stress in intact male rats. *Journal of Endocrinology* 124:241-246 (1990).

LOPEZ-CALDERON, A., ARIZNAVARRETA, C., and CHEN, C.L.C. Influence of chronic restraint stress on proopiomelanocortin mRNA and  $\beta$ -endorphin in the rat hypothalamus. *Molecular Brain Research* 7:197-204 (1991).

LOPEZ-CALDERON, A., ARIZNAVARRETA, C., MARTIN, A.I., GONZALEZ-QUIJANO, M.I., and TRESGUERRES, J.A.F. How the adrenal talks to the gonadotrope. En: "Stress and Reproduction", Serono Symposia, Eds: Shepparsd, K.E., Boublik, J.H., y Funder, J.W. 157-168, (1992).

MADAM, M.L., JOHNSON, H.D. Environmental heat effects on bovine luteinizing hormone. *J. Dairy Sci.* 56:575-580 (1973).

MADEN, J., AKIL, H., PATRICK, R.L., BARCHAS, J.D. Stress-induced parallel changes in central opioid levels and pain responsiveness in the rat. *Nature*, 265:358-360 (1977).

MAGGI, R., DONDI, D., PANERAI, A.E., and LIMONTA, P. Hypothalamic  $\beta$ -endorphin and brain Mu opiate receptor concentrations in male rat after restraint stress. *Neuroendocrinology Letters*, 10:285-295 (1988).

MAJEED, N.H., LASON, W., PRZEWLOCKA, B., PRZEWLOCKI, R. Brain and peripheral opioid peptide after changes in ingestive behavior. *Neuroendocrinology* 42:267-272 (1986).

MAKARA, G.B. Mechanism by which stressful stimuli activate the pituitary-adrenal system. *Federation Proceedings*, 44:149-153 (1985).

MAKARA, G.B., KVETNANSKY, R., JEZOVA, D., JINDRA, A., KAKUISKA, I., OPRSALOVA, Z. Plasma catecholamines do not participate in pituitary-adrenal activation by immobilization stress in rats with transection of nerve fibers to the median eminence. *Endocrinology*, 119:1757-1762 (1986).

MALAK, G.A., THIBIER, M. Plasma LH and testosterone responses to synthetic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or dexamethasone-GnRH combined treatment and their relationship to semen output in bulls. *Journal of Reproduction Fertility*, 64:107-113 (1982).

MANCHEÑO, E., DURAN, F., ORIOL, A. Cuantificación de corticosteroides en plasma y orina mediante análisis por desplazamiento competitivo. *Medicina Clínica* 65:345-350 (1975).

MANCIA, M. Neurotrasmittitori e Mediatori. En "Sinapsi centrali", Schering Eds, 37-38, (1985).

MANN, D.R., FREE, C., NELSON, C., SCOTT, C., COLLINS, D.C. Mutually Independent Effects of Adrenocorticotropin on Luteinizing Hormone and Testosterone secretion. *Endocrinology*, 120:1542-1550 (1987).

MARTIN, A.I. Efecto de la CRH sobre la secreción hipotalámica de LHRH *in vitro*.

*Estrés y gonadotropinas*

Memoria de Licenciatura, Fac. de CC. Biológicas, Univ. Complutense, Madrid (1991).

MATT, K.S., SOARES, M.J., TALAMANTES, F., BARTKE, A. Effects of handling and ether anesthesia on serum prolactin levels in the golden hamster. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 163:463-466 (1984).

McCANN, S.M. Hormonal effects of brain peptides. Conferencia pronunciada en la Academia Nacional de Ciencia de Buenos Aires, 1986.

McQUEEN, D.S. Opioid peptide interactions with respiratory and circulatory systems. *Brain Medical Bulletin*, 39:77-82 (1983).

MEITES, J. and SONNATG, W.E. Hypothalamic hypophysiotropic hormones and neurotransmitter regulation current reviews. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 21:259-278 (1981).

MELTZER, H., SIMONOVIC, M. and GUDELSKY, G. Effect of yohimbine on rat prolactin secretion. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutic*, 224:21-27 (1983).

MESSI, E., MOTTA, M. and ZANISI, M. Role of peptides and of LHRH on the hypothalamo pituitary-gonadal axis. *Journal of Clinical Investigation* 12 sspl, 2:57 (1989).

MERMET, C.C., GONON, F.G. Ether stress stimulates noradrenaline release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 47:75-82 (1988).

MEYERHOFF, J.L., MOUGEY, E.H., KANT, G.J. Paraventricular Lesions Abolish the Stress-Induced Rise in Pituitary Cyclic Adenosine Monophosphate and Attenuate the Increases in Plasma Levels of Proopiomelanocortin-Derived Peptides and Prolactin. *Neuroendocrinology* 46:222-230 (1987).

MEZEY, E., KISS, J.Z., SKIRBOLL, L.R., GOLDSTEIN, M. & AXELROD, J. Increase of CRH-staining in rat paraventricular nucleus neurones by depletion of hypothalamic adrenaline. *Nature*, 310:140-141 (1984).

MILLAN, M.J., PRZEWLOCKI, R., JERLICZ, M., GRAMSCH, C.H., HOLLT, V., and HERZ, A. Stress-induced release of brain and pituitary  $\beta$ -endorphin: major role of endorphins in generation of hyperthermia not analgesia. *Brain Research*, 208:325-338 (1981).

MOLDOW, R.K., KASTIN, A.J., GRAF, M., and FISCHMAN, A.J. Stress mediated changes in Hypothalamic Corticotropin Releasing Factor-like Immunoreactivity. *Life Sciences*, 40:413-418 (1987).

MOORE, K.E. Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. *Biology of Reproduction*, 36:47-58 (1987).

MURAKAMI, K., AKANA, S., DALLMAN, M.F., GANONG, W.F. Correlation between the Stress-Induced Transient Increase in Corticotropin-Releasing Hormone Content of the Median Eminence of the Hypothalamus and Adrenocorticotropin Hormone Secretion. *Neuroendocrinology*, 49:233-241 (1989).

MURISON, R.C.C. and ISAKSEN, E. Gastric ulceration and adrenocortical activity after inescapable and escapable pre-shock in rats. *Scandinavian Journal of Psychology* ssp. 1:133-137 (1982).

NEGRO-VILAR, A. The median eminence as a model to study presynaptic regulation of neural peptide release. *Peptides*, 3:305-310 (1982).

NEILL, J.D. Effect of Stress on Serum Prolactin and Luteinizing Hormone Levels During the Estrous Cycle of the Rat. *Endocrinology*, 87:1192-1197 (1970).

NEILL, J.D. Comparison of Plasma Prolactin levels in Cannulated and Decapitated Rats. *Endocrinology*, 90:568-572 (1972).

NEILL, J.D. Prolactin secretion and its control. In Knobil, E., Neill, J. (eds). En: "The Physiology of Reproduction", New York, Raven Press, 1379-1390 (1988).

NIKOLARAKIS, K.E., ALMEIDA, O.F.X., and HERZ, A. Corticotropin-releasing factor (CRF) inhibits gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from superfused rat hypothalami *in vitro*. *Brain Research*, 377:388-390 (1986a).

NIKOLARAKIS, K.E., ALMEIDA, O.F.X., and HERZ, A. Stimulation of hypothalamic  $\beta$ -endorphin release by corticotropin-releasing factor (*in vitro*). *Brain Research*, 399:152-155, (1986b).

NIKOLARAKIS, K.E., ALMEIDA, O.F.X., SIRINTHSINGHJI, D.J.S., HERZ, A. Concomitant Changes in the *in vitro* and *in vivo* Release of Opioid Peptides and Luteinizing Hormone-Releasing Hormone from the Hypothalamus following Blockade of Receptors for Corticotropin-Releasing Factor. *Neuroendocrinology*, 47:545-550, (1988).

NORMAN, R.L., and SMITH, C.J. Restraint inhibits luteinizing hormone and testosterone secretion in intact male Rhesus macaques: effects of current naloxone administration. *Neuroendocrinology*, 55:405-415 (1992).

NOWELL, N.W. Adrenocortical function in relation to mammalian population densities and hierarchies. En: "General, Comparative and Clinical Endocrinology of the adrenal cortex", Eds Chester Jones & Henderson, I.W., Academic Press London, N.Y. S. Francisco, 3:349-393 (1980).

O'BYRNE, K.T., LUNN, S.F., DIXON, A.F. Naloxone reversal of stress-induced suppression of LH release in the common marmoset. *Physiology & Behavior*, 46:1077-1080 (1989).

OJEDA, S.R., and McCANN, S.M. Evidence for participation of a catecholaminergic mechanism in the post-castration rise in plasma gonadotropins. *Neuroendocrinology*, 12:295-315 (1973).

OJEDA, S., NEGRO-VILAR, A., and McCANN, S. Evidence for involvement of  $\alpha$ -adrenergic receptors in norepinephrine-induced prostaglandin  $E^2$  and luteinizing hormone-releasing hormone release from median eminence. *Endocrinology*, 110:409-412 (1982).

OLSTER, D.H. and FERIN, M. Corticotropin-Releasing Hormone Inhibits Gonadotropin Secretion in the Ovariectomized Rhesus Monkey. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 65:262-267 (1987).

ONO, N., LUMPKIN, M.D., SAMSON, W.K., McDONALD, J.K., McCANN, S.M. Intrahypothalamic action of corticotropin-releasing factor (CRF) to inhibit growth hormone and LH release in the rat. *Life Science*, 35:1117-1123 (1984).

## *Estrés y gonadotropinas*

OOSTEROM, R., VERLEUN, T., ZUIDERWIJK, J., HITTERLINDEN, P., and LAMBERTS, S.W.J. Effect of long-term corticosteroid administration on rat pituitary growth hormone and prolactin. *Acta Endocrinologica*, 108:475-478 (1985).

PACAK, K., ARMANDO, I., FUKUHARA, K., KVETNANSKY, R., PALKOVITS, M., KOPIN, I.J., GOLDSTEIN, D.S. Noradrenergic activation in the paraventricular nucleus during acute and chronic immobilization stress in rats: an *in vivo* microdialysis study. *Brain Research*, 589:91-96 (1992).

PALKOVITS, M., BROWNSTEIN, M., SAAVEDRA, J.M., and AXELROD, J. Norepinephrine and dopamine content of hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Research*, 77:137-149 (1974).

PALKOVITS, M., KOBAYASHI, R.M., KIZER, J.S., JACOBOWITZ, D.M., and KOPIN, I.J. Effects of Stress on Catecholamines and Tyrosine Hydroxylase Activity on Individual Hypothalamic Nuclei. *Neuroendocrinology*, 18:144-153 (1975).

PARIS, A.L., RAMALEY, J.H. Adrenal-gonadal relations and fertility: the effects of repeated stress upon the adrenal rhythm. *Neuroendocrinology*, 15:126-137 (1974).

PARKER, L., EUGENE, J., FARBER, D., LIFRAK, E., LAI, M., JULER, G. Dissociation of adrenal androgen and cortisol levels in acute stress. *Hormone Metabolism Research*, 17:209-213 (1985).

PETRAGLICA, F., VALE, W., RIVIER, C. Opioids act centrally to modulate stress-induced decrease in luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology*, 119:2445-2450 (1986).

PETRAGLIA, F., SUTTON, S., VALE, W., and PLOTSKY, P. Corticotropin-Releasing Factor Decreases Plasma Luteinizing Hormone Levels in female Rats by Inhibiting Gonadotropin-Releasing Hormone Release into Hypophysial-Portal Circulation. *Endocrinology*, 120:1083-1088 (1987).

PETRAGLIA, F., VALE, W., RIVIER, C. Beta-Endorphin and Dynorphin Participate in the Stress-Induced Release of Prolactin in the Rat. *Neuroendocrinology*, 45:338-342 (1987a).

PETTIBONE, D.J., and MUELLER, G.P. Adrenergic control of immunoreactive  $\beta$ -endorphin release from the pituitary of the rat *in vivo* and *in vitro* studies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 22:103-108 (1982).

PFEIFFER, D.G., PFEIFFER, A., ALMEIDA, O.F.X., HERZ, A. Opiate suppression of LH secretion involves central receptors different from those mediating effects on prolactin secretion. *Journal of Endocrinology*, 114:469-476 (1987).

PIVA, F., MAGGI, R., LIMONTA, P., DONDI, D., MARTINI, L. Decrease of Mu opioid receptors in the brain and in the hypothalamus of the aged male rat. *Life Science*, 40:391-398 (1987).

PLOTSKY, P.M., and VALE, W. Hemorrhage-induced secretion of corticotropin releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology*, 114:164-169 (1984).

PLOTSKY, P.M., BRUHN, T.O., VALE, W. Evidence for multifactor regulation of adrenocorticotropin secretory response to hemodynamic stimuli. *Endocrinology*,

116.6333-639 (1985).

PLOTSKY, P.M. Facilitation of Immunoreactive Corticotropin-Releasing Factor Secretion into the Hypophysial-Portal Circulation after Activation of Catecholaminergic Pathways or Central Norepinephrine Injection. *Endocrinology*, 121:924-930 (1987).

PLOTSKY, P.M., CUNNINGHAM, J.R., WIDMAIER, E.P. Catecholaminergic Modulation of Corticotropin-Releasing Factor and Adrenocorticotropin Secretion. *Endocrine Reviews*, 10:437-458 (1989).

PRZEKOP, F., STUPNICKA, E., WOLINSKA-WITORT, E., MATEUSAK, K., SADOWSKI, B., and DOMANSKY, E. Changes in circadian rhythm and suppression of the plasma cortisol level after prolonged stress in the sheep. *Acta Endocrinologica*, 110:540-545 (1985).

PRZEWLOCKI, R., LASON, W., KONECKA, A., GRAMSCH, C.H., HERZ, A., REID, L. *Science*, 219:71-88 (1983).

PRZEWLOCKI, R., LASON, W., HOLTZ, V., SILBERRING, J., and HERZ, A. The influence of chronic stress on multiple opioid peptide systems in the rat: pronounced effects upon dynorphin in spinal cord. *Brain Research*, 413:213-219 (1987).

RAMIREZ, V.D., FEDER, H.H., SAWYER, C.H. The role of brain catecholamines in the regulation of LH secretion. A critical inquiry; En: "Frontiers in Neuroendocrinology" Martini, L., Ganong, W.F. (eds.), New York, Raven, 8:27-84 (1984).

RAPPAPORT, S.J. Blood-Brain Barrier. En: "Physiology and Medicine": New-York Raven Press (1976).

RASMUSSEN, D.D., LIU, J.H., WOLF, P.L., and YEN, S.S.C. Endogenous Opioid Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Release from the Human Fetal Hypothalamus *in Vitro*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 57:881-884 (1983).

RASMUSSEN, D.D., KENNEDY, B.P., ZIEGLER, M.G., NETT, T.M. Endogenous Opioid Inhibition and Facilitation of Gonadotropin-Releasing Hormone Release from the Median Eminence *in vitro*: Potential Role of Catecholamines. *Endocrinology*, 43:2916-2921 (1988).

REIGLE, G.D., and MEITES, J. The effect of stress on serum prolactin in the female rat. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 152:441-448 (1976).

RETTORI, V., SEILICOVICH, S., GOIJAMN, S., and DEBELJUK, L. Effect of Inhibitors of Catecholamine Synthesis on the Pituitary Response to LH-RH. *Archives of Andrology*, 6:151-154 (1981).

REUL, J.H.M.H., DEKLOET, E.R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117:2505-2511 (1985).

RHESS, R.W., FLEMING, D.E. Effects of malnutrition, maternal stress, or ACTH injection during pregnancy on sexual behavior of male offspring. *Physiology & Behaviour*, 27:879-882 (1981).

RICHARDSON, J.S. Brain part monoamines in the Neuroendocrine Mechanism activated by immobilization stress in the rat. *International Journal of Neuroscience*, 23:57-68

*Estrés y gonadotropinas*

(1984).

RINGSTROM, S.J., and SCHWARTZ, N.B. Cortisol suppresses the LH but not the FSH, response to gonadotropin-releasing hormone after orchidectomy. *Endocrinology* 114:880-887 (1985).

RITTMASER, R.S., CUTLER, JR. G.B., SOBHEL, D.O., GOLDSTEIN, D.S., KOPPELMAN, M.C.S., LORIAUX, D.L., and CHROUSOS, G.P. Morphine inhibits the pituitary-adrenal response to ovine corticotropin-releasing hormone in normal subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 60:981-985 (1985).

RIVEST, S., and RIVIER, C. Influence of the Paraventricular nucleus of the hypothalamus in the alteration of neuroendocrine functions induced by intermittent footshock or interleukin. *Endocrinology* 129:2049-2057 (1991).

RIVIER, C., VALE, W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature*, 305:325-327 (1983).

RIVIER, C. and VALE, W. Influence of Corticotropin-Releasing Factor on Reproductive Functions in the rat. *Endocrinology*, 114:914-921 (1984).

RIVIER, C., and VALE, W. Effect of the Long-Term Administration of Corticotropin-releasing Factor on the Pituitary-Adrenal and Pituitary-Gonadal Axis in the Male Rat. *Journal of Clinical Investigations*, 75:689-694 (1985a).

RIVIER, C., VALE, W. Effects of corticotropin-releasing factor, neurohypophyseal peptides, and catecholamines on pituitary function. *Federal Proceedings*, 44:189-195 (1985b).

RIVIER, C., RIVIER, J., and VALE, W. Stress-induction inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science*, 231:607-609 (1986).

ROPERT, J.F., QUIGLEY, M.E., YEN, S.S.C. Endogenous opiates modulate pulsatile luteinizing hormone release in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 52:583-594 (1981).

ROSE, R.M., BERNSTEIN, I.S., GORDON, T.P. Consequences of social conflict on plasma testosterone levels in rhesus monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 3:221-227 (1979).

ROSE, R., SACHAR, E. *Psychoendocrinology*. En: Williams, R.H., ed. *Textbook of Endocrinology* 645, WB Saunders, Philadelphia (1981).

ROSSIER, J., FRENCH, E., RIVIER, C., SHIBASAKI, T., GUILLEMIN, R., and BLOOM, F.E. Stress-Induced release of Prolactin Blockade by dexamethasone and naloxone may indicate  $\beta$ -Endorphin mediation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:666-669 (1980).

ROTH, K.A., KATZ, R.J., SIBEC, M., MEFFORD, I.N., BARCHAS, J.D., CARROLL, B.J. Central epinephrine Inhibition of Corticosterone Release in Rat. *Life Science*, 28:2389-2394 (1981).

ROTSZTEJN, W.H., BENOIST, L., BESSON, J., BERAUD, G., BLUET-PAJOT, M., KORDON, C., ROSSELIN, G., DUVAL, J. Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the release of adenohipophyseal hormones from purified cells obtained by unit

density sedimentation. *Neuroendocrinology* 31:282-286 (1980).

ROTSZTEJN, W.H., DUSSAILLANT, M., NOBOU, F., ROSSELIN, G. Rapid glucocorticoid inhibition of vasoactive intestinal peptide-induced cyclic AMP accumulation and prolactin release in rat pituitary cells in cultur. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7584-7588 (1981).

RUBIN, R.P. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacological Reviews*, 22:389-428 (1970).

SAAVEDRA, J.M., KVETNANSKY, R., and KOPIN, I.J. Adrenaline, noradrenaline and dopamine levels in specific brain stem areas of acutely immobilized rats. *Brain Research*, 160:271-280 (1979).

SAKAI, S., BOWMAN, P.D., YANG, J., McCORMICK, K., NANDI, S. Glucocorticoid Regulation of Prolactin receptors on Mammary cells in culture. *Endocrinology*, 104:1447-1449 (1979).

SAKAKURA, M., TAKEBE, K., NAKAGAWA, S. Inhibition of luteinizing Hormones Secretion Induced by synthetic LRH by Long-term Treatment with Glucocorticoids in human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 40:774-779 (1975).

SAKELLARIS, P.C., VERNIKOS-DANELIS, J. Increased rate of response of the pituitary-adrenal system in rats adapted to chronic stress. *Endocrinology*, 97:597-602 (1975).

SAMSON, W.K., LUMPKIN, M.D., McCANN, S.M. Evidence for a physiological role for oxytocin in the control of prolactin secretion. *Endocrinology*, 119:554-560 (1986).

SAPOLSKY, R.M., and KREY, L.C. Stress-Induced Suppression of Luteinizing Hormone Concentrations in Wild Baboons: Role of Opiates. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 66:722-726 (1988).

SAUTER, A., GOLDSTEIN, M., ENGEL, J., UETA, K. Effect of insulin on central catecholamines. *Brain Research*, 260:330-333 (1983).

SAWYER, C.H. Stimulation of ovulation in the rabbit by the intraventricular injection of epinephrine or norepinephrine. *Anat. Record.*, 112:385-396 (1952).

SCAPAGNINI, U., VAN LOON, G.R., MOBERG, G.P., and GANONG, W.F. Effect of  $\alpha$ -methyl-p-tyrosine on the circadian variation of plasma corticosterone in rats. *European Journal of Pharmacology*, 11:266-268 (1970).

SCAPAGNINI, V., VAN LOON, G.R., MOBERG, G.P., PREZIOSI, P. and GANONG, W.F. Evidence for Central Norepinephrine-Mediated Inhibition of ACTH Secretion in the Rat. *Neuroendocrinology*, 10:155-160 (1972).

SCAPAGNINI, V., ANNUNZIATO, L., LOMBARDI, G., OLIVER, C.H., and PREZIOSI, P. Time-course of the effect of  $\alpha$ -methyl-p-tyrosine on ACTH secretion. *Neuroendocrinology*, 18:272-276 (1975).

SCHULZ, R., WILHELM, A., PIRKE, K.M., GRAMSCH, C., and HERZ, A.  $\beta$ -endorphin and dynorphin control serum luteinizing hormone level in immature female rats. *Nature*, 294:757-759 (1981).

## *Estrés y gonadotropinas*

SEGGIE, J.A., BROWN, G.M. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin and growth hormone in the rat following handling or exposure to novel environment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 53:629-637 (1975).

SEGGIE, J., and BROWN, G.M. Profiles of Hormone Stress Response: Recruitment or Pathways Specificity. En: "Brain Peptides and Hormones", R. Collu et al. (ed) Raven Press N.Y., 277-285 (1982).

SEIZINGER, B., HOLLT, V. *In vitro* biosynthesis and N-acetylation of  $\beta$ -endorphin in pars intermedia of the rat pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96:535-543 (1980).

SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 6:117-230 (1946).

SELYE, H. Stress in health and disease. Butterworths, Reading 1976.

SHANGOLD, M.M., GATZ, M.L., THYSEN, B. Acute effects of exercise on plasma concentrations of prolactin in testosterone in recreational women runners. *Fert. Steril.*, 35:699-702 (1981).

SHEN, P.J., CLARKE, I.J., CANNY, B.J., FUNDER, J.W., SMITH, A.I., Arginine vasopressin and corticotropin-releasing factor: binding to ovine anterior pituitary membranes. *Endocrinology*, 127:d2085-2089 (1990).

SHIMATSU, A., KATO, Y., OHTA, H., TOJO, K., KABAYAMA, Y., INOVE, T., YANAIHARA, N., IMURA, H. Involvement of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in prolactin secretion induced by serotonin in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175:414-416 (1984).

SHIN, S.H. Physiological Evidence for the Existence of Prolactin Releasing Factor: Stress-Induced Prolactin Secretion Is not Linked to Dopaminergic Receptors. *Neuroendocrinology*, 31:375-379 (1980).

SHIOMI, H., AKIL, H. Pulse-chase studies of the POMC (beta-endorphin system in the pituitary of acutely and chronically stressed rats. *Life Sciences*, 31:2185-2188 (1982).

SHIOMI, H., WATSON, S.J., KELSEY, J.E., and AKIL, H. Pretranslational and postranslational Mechanism for regulating  $\beta$ -endorphin-Adrenocorticotropin of the Anterior pituitary lobe. *Endocrinology*, 119:1793-1799 (1986).

SIECK, G., RAMALEY, J.H. Effect of early handling upon puberty: correlations with adrenal stress responsiveness. *Physiology & Behaviour*, 15:487-498 (1975).

SIGGINS, G.R., GRUOL, D., ALDENHOFF, J. and PITTMAN, Q. Electrophysiological actions of corticotropin-releasing factor. *Federations Proceedings*, 44:237-242 (1985).

SIRINATHSINGHJI, D.J.S., REES, L.H., RIVIER, J., VALE, W. Corticotropin-releasing factor is a potent inhibitor of sexual receptivity in the female rat. *Nature*, 305:232-235 (1983).

SIRINATHSINGHJI, D.J.S. Modulation of lordosis behaviour in female rat by corticotropin-releasing factor,  $\beta$ -endorphin and gonadotropin releasing hormone in the mesencephalic central gray. *Brain Research*, 336:45-55 (1985).

SMYTH, E.R., JOHNSON, J., WEICK, R.F., LEVINE, S. and DAVIDSON, J.M. Inhibition of Reproductive System Immature Rats by Intracerebral Implantation of Cortisol. *Neuroendocrinology*, 8:94-106 (1971).

SMYTH, D.F., ZAKARIAN, S. Selective processing of  $\beta$ -endorphin in regions of porcine pituitary. *Nature*, 288:613-615 (1980).

SMYTHE, G.A., BRADSHAW, J.E., VINING, R.F. Hypothalamic monoamine control of stress-induced adrenocorticotropin release in the rat. *Endocrinology*, 113:1062-1071 (1983).

SMYTHE, G.A., GRUNSTEIN, H.S., BRADSHAW, J.E., NICHOLSON, M.V., COMPTON, P.J. Relationships between brain noradrenergic activity and blood glucose. *Nature*, 308:65-67 (1984).

SMYTHE, G.A., BRADSHAW, J.W., GLEESON, R.M., NICHOLSON, M.V. Dopamine  $\beta$ -OHase inhibition acutely stimulates rats hypothalamic noradrenaline and dopamine neuronal activity as assessed from metabolic ratios and circulating glucose and ACTH responses. *Life Sciences*, 37:841-847 (1985).

SPINEDI, E., CRAIG, A.J., CHISARI, A., and NEGRO-VILAR, A. Role of Central Epinephrine on the Regulation of Corticotropin-Releasing Factor and Adrenocorticotropin Secretion. *Endocrinology*, 122:1977-1983 (1988).

STONE, E.A., McCARTY, R. Adaptation to stress: tyrosine hydroxylase activity and catecholamine release. *Neuroscience Biobehaviour Review*, 7:29-34 (1983).

SUDA, T., YAJIMA, F., TOMORI, N., SUMITOMO, T., NAKAGAMI, Y., USHIYAMA, T., DEMURA, H., and SHIZUME, K. Inhibitory effect of norepinephrine on immunoreactive corticotropin-releasing factor release from the rat hypothalamus *in vitro*. *Life Sciences*, 40:1645-1649 (1987).

SUTER, D., and OROSZ, G. Effect of treatment with cortisol *in vivo* on secretion of gonadotropins *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 41:1091-1096 (1989).

SUTTON, R.E., KOOB, G.F., LE MOAL, M., RIVIER, J., VALE, W. Corticotropin-releasing factor: produces behavioral activation in rats. *Nature*, 297:331-335 (1982).

SWANSON, L.W., SAWCHENKO, P.E., RIVIER, J. and VALE, W. Organization of ovine corticotropin releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: An immunocytochemical study. *Neuroendocrinology*, 36:165-186 (1983).

SWEEP, C.G.J., and WIEGANT, V.M. Release of  $\beta$ -endorphin-immunoreactivity from rat pituitary and hypothalamus *in vitro*: Effects of isoproterenol, dopamine, corticotropin-releasing factor and arginine<sup>8</sup>-vasopressin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 161:221-228 (1989).

SYLVESTER, P.W., CHENG, H.T., MEITES, J. Effects of morphine and naloxone on phasic release of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 164:207-211 (1980).

SYLVESTER, P.W., AYLSWORTH, C.F., MEITES, J. Evidence that endogenous opioid peptides (EOP) mediate steroid inhibition of luteinizing hormone (LH) release". *Federal Proceedings*, 40:388 (1981).

### *Estrés y gonadotropinas*

TACHE, Y., DU RUISSEAU, P., TACHE, J., SEYLE, H., COLLU, R. Shift in adenohipofyseal activity during Chronic Intermittent Immobilization of rats. *Neuroendocrinology*, 22:325-336 (1976).

TACHE, Y., DU RUISSEAU, P., DUCHARME, J.R., COLLU, R. Pattern of adenohipofyseal hormone changes in male rats following chronic stress. *Neuroendocrinology*, 26:208-219 (1978).

TACHE, Y., BROWN, M., COLLU, R. Effects of neuropeptides on adenohipofyseal hormone response to acute stress in male rats. *Endocrinology*, 105:220-224 (1979).

TACHE, Y., DUCHARME, J.R., CHARPENET, G., HAOUR, F., SAEZ, J., COLLU, R. Effect of chronic intermittent immobilization stress on hypofyse-gonadal function of rats. *Acta Endocrinologica, Copenhagen*, 93:168-174 (1980).

TACHE, Y., GOTO, Y., GUNION, M., VALE, W., RIVIER, J., BROWN, M. Inhibition of gastric acid secretion in rats by intracerebral injection of corticotropin-releasing factor. *Science*, 222:935-937 (1983).

TANAKA, M., KOHNO, Y., NAKAGAWA, R., TOSHIMA, N., NAGASAKI, N. Changes in the levels of noradrenaline and MHPG-SO<sub>4</sub> in the discrete brain areas of the rat by immobilization stress. *Neurochemistry Research*, 6:102-105 (1981).

TANAKA, M., KOHNO, Y., NAKAGAWA, R., IDA, Y., IIMORI, K., TSUDA, A., NAGASAKI, N. Naloxone enhances stress-induced increases in noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. *Life Sciences*, 30:1663-1669 (1982a).

TANAKA, M., KOHNO, Y., NAKAGAWA, R., IDA, Y., TAKEDA, S., NAGASAKI, N. Time-Related Differences in Noradrenaline Turnover in Rat Brain Regions by Stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 16:315-319 (1982).

TAPP, W.N., MITTLER, J.C., NATELSON, B.H. Effects of Naloxone on corticosterone Response to stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 14:149-151 (1981).

TERASAWA, E., KROOK, C., HEI, D.L., GEARING, M., SCHULTZ, N.J. and DAVIS, G.A. Norepinephrine is a possible neurotransmitter stimulating pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 123:1808-1816 (1988).

THIERRY, A. M., JAVOY, F., GLOWINSKI, J., and KETY, S.S. Effects of stress on the metabolism of norepinephrine, dopamine and serotonin in the central nervous system of the rat. I: Modifications of norepinephrine turnover. *Journal of Pharmac. exp. Ther.*, 163:163-171 (1968).

THOMPSON, R.C., SEASHOLTZ, A.F., HERBERT, E. Rat corticotropin-releasing hormone gene: sequence and tissue-specific expression. *Molecular Endocrinology*, 1:363-366 (1987).

THORELL, J.L y JOHANSON, B.G. Enzymatic iodination of polypeptides with <sup>131</sup>I to high specific activity. *Biochem Biophys Acta* 251:363-366 (1971).

TILDERS, F.J.H., BERKENBOSCH, F., VERMES, I., LINTON, E.A., SMELIK, P.G. Role of epinephrine and vasopressin in the control of the pituitary-adrenal response to stress. *Federal Proceedings*, 44:155-160 (1985).

TOLIS, G., HICKEY, J., and GUYDA, H. Effects of morphine on serum growth hormone, cortisol, prolactin, and thyroid stimulating hormone in man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 41:797-808 (1975).

TSAGARAKIS, S., HOLLY, J.M.P., REES, L.H., BESSER, G.M., GROSSMAN, A. Acetylcholine and Norepinephrine Stimulate the Release of Corticotropin-Releasing Factor from the Rat Hypothalamus *in vitro*. *Endocrinology*, 123:1962-1965 (1988).

UEDA, H., GOSHIMA, Y., and MISU, Y. Presynaptic mediation by  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenoceptors of endogenous noradrenaline and dopamine release from slices of rat hypothalamus. *Life Sciences*, 33:371-376 (1983).

ULISSE, S., FABBRI, A., and DUFAU, M.L. Corticotropin-releasing factor receptors and actions in rat Leydig cell. *Journal of Biol. Chem.*, 264:2156- 2159 (1989).

ULISSE, S., FABBRI, A., TINAJERO, J.C., and DUFAU, M.L. A novel mechanism of action of corticotropin releasing factor in rat Leydig cells. *Journal Biol. Chem.*, 265:1964-1968 (1990).

U'PRICHARD, D.C., BECHTEL, W.D., ROUOT, B.M., SNYDER, S.H. Multiple apparent alpha-noradrenergic receptor binding sites in rat brain: effect of 6-hydroxydopamine. *Molecular Pharmacology*, 16:47-60 (1979).

VALE, W., SPIESS, J., RIVIER, C., RIVIER, J. Characterization of a 41 residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotropin and  $\beta$ -endorphin. *Science*, 213:1394-1397 (1981).

VALE, W., RIVIER, C., BROWN, M.R., SPIESS, J., KOOB, G., SWANSON, L., BILEZIKJIAN, L., BLOMM, F., RIVIER, J. Chemical and Biological characterization of corticotropin releasing factor. *Recent. Prog. Horm. Res.* 39:245-249 (1983a).

VALE, W., VAUGHAN, J., SMITH, M., YAMAMOTO, G., RIVIER, J. and RIVIER, C. Effects of Synthetic Ovine Corticotropin-Releasing Factor, Glucocorticoids, Catecholamines, Neurohypophysial Peptides, and Other Substances on Cultured Corticotropic Cells. *Endocrinology*, 113:1121-1133 (1983b).

VAN VUGT, D.A., SYLVESTER, P.W., AYLWORTH, C.F., MEITES, J. Comparison of the acute effects of dynorphin and beta-endorphin on prolactin release in the rat. *Endocrinology*, 108:2017-2018 (1981).

VAN VUGT, D.A., SYLVESTER, P.W., AYLWORTH, C.F., and MEITES, J. Counteraction of Gonadal Steroid Inhibition of Luteinizing Hormone Release by Naloxone. *Neuroendocrinology*, 34:274-278 (1982).

VERMES, I., MULDER, G.H., SMELIK, P.G., and TILDERS, F.J.M. Differential control of  $\beta$ -endorphin/ $\beta$ -lipotropin secretion from anterior and intermediate lobes of the rat pituitary gland *in vitro*. *Life Sciences*, 27:1761-1768 (1980).

VERMES, I., TILDERS, F.J.H., and STOOFF, J.C. Dopamine Inhibits the Release of Immunoreactive  $\beta$ -Endorphin From Rat Hypothalamus *In Vitro*. *Brain Research*, 326:41-46 (1985).

VERNIKOS, J., DALLMAN, M.F., BONNER, C., KATZEN, A., SHINSAKO, J. Pituitary-adrenal function in rats chronically exposed to cold. *Endocrinology*, 110:413-421 (1982).

- VIJAYAN, E., and McCANN, S.M. Re-evaluation of the role of catecholamines in control of gonadotropin and prolactin release. *Neuroendocrinology*, 25:150-165 (1978).
- VREEBURG, J.T.M., DE GREEF, W.J., OOMS, M.P., VAN WOUW, P., WEBER, R.F.A. Effects of adrenocorticotropin and corticosterone on the negative feedback action of testosterone in the adult male rat. *Endocrinology*, 115:977-987 (1984).
- WADE, S. Corticosterone availability in male rats at rest and during shock avoidance: differences among individuals, temporal patterns and effects of dexamethasone. *Journal of Endocrinology*, 103:187-194 (1984).
- WARD, I.L. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behaviour of males. *Science* 175:82-85 (1972).
- WARD, I.L., WEISZ, J. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science* 207: 328-330 (1980).
- WARREN, M.P. The effects of exercise on pubertal progression and reproductive function in girls. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 51:1150-1157 (1980).
- WEBER, E., EVANS, C.J., BARCHAS, J.D. Acetylated and monoacetylated forms of  $\beta$ -endorphin in rat brain pituitary. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*, 103:698-705 (1981).
- WEBER, R.F.A., DE GREEF, W.J., KONING, J. DE VREEBURG, J.T.M. LHRH and dopamine levels in hypophysial stalk plasma and their relationship to plasma gonadotrophins and prolactin levels in male rats bearing a prolactin-and adrenocorticotrophin-secreting tumor. *Neuroendocrinology*, 36:205-210 (1983).
- WEINDENFELD, J., SIEGEL, R.A., CONFORTI, N., CHOWERS, I. Effects of systemically administered indomethacin on basal and stress-induced ACTH and corticosterone secretion in the male rat. *Neuroendocrinology* 31:81-84 (1980).
- WEINDENFELD, J., FELDMAN, S. Effect of hypothalamic norepinephrine depletion on median eminence CRF<sub>1-41</sub> content and serum ACTH in control and adrenalectomized rats. *Brain Research* 542:201-204 (1991).
- WELSH, T.H., BAMBINO, T.H., and HSUELJ, A.J.W. Mechanism of Glucocorticoid-Induced Suppression of Testicular Androgen Biosynthesis *in vitro*. *Biology of Reproduction* 27:1138-1146 (1982).
- WHITNALL, M.H. Stress selectively activates the vasopressin-containing subset of corticotropin-releasing hormone neurons. *Neuroendocrinology* 50:702-707 (1989).
- WILCOX, J.N. & ROBERTS, J.L. Estrogen decreases rat hypothalamic proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 117:2392-2396 (1985).
- WILKINSON, C.W., SHINSAKO, J., DALLMAN, M.F. Return of Pituitary-Adrenal Function after Adrenal Enucleation or transplantation Diurnal Rhythms and responses to Ether. *Endocrinology* 109:162-169 (1981).
- YOUNG, E.A. Induction of the intermediate lobe pro-opiomelanocortin system with chronic swim stress and  $\beta$ -adrenergic modulation of this induction. *Neuroendocrinology* 52:405-414 (1990).