

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**



**TESIS DOCTORAL**

**INHIBICIÓN POR ESTRADIOL DE EFECTOS HEPÁTICOS  
ESPECÍFICOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS  
Y LA HORMONA DEL CRECIMIENTO**

**ANTONIO JESÚS LÓPEZ GUERRA**

Las Palmas de Gran Canaria, 1994

13/1994-95  
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el Doctorando las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO "COM LAUDE" POR UNANIMIDAD Las Palmas de G. C., a 19 de Diciembre de 1994.  
El Presidente: Dr. D. Jesús Ángel Fernández Tresguerres,



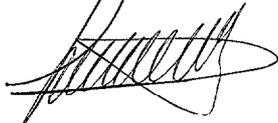
El Secretario: Dr. D. Juan Carlos Díaz Chico,



El Vocal: Dr. D. Juan Bernal Carrasco,



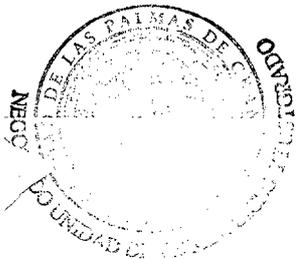
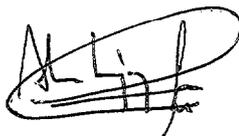
El Vocal: Dr. D. Juan José Cabrera Galván,



El Vocal: Dr. D. Leandro Fernández Pérez,



El Doctorando: D. Antonio Jesús López Guerra,





# UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DOCTORADO EN MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO:

MECANISMOS DE ACCIÓN HORMONAL

TITULO DE LA TESIS:

**"INHIBICIÓN POR ESTRADIOL DE EFECTOS  
HEPÁTICOS ESPECÍFICOS DE LAS HORMONAS  
TIROIDEAS Y LA HORMONA DEL CRECIMIENTO"**

Tesis doctoral presentada por D. Antonio Jesús López Guerra

Dirigida por el Dr. Ricardo Chirino Godoy

El Director

El Doctorando

Las Palmas de Gran Canaria, 4 de Noviembre de

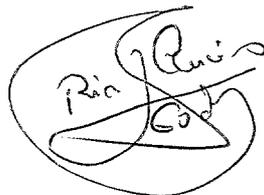
1997
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
LAS PALMAS DE G. CANARIA
Nº Documento..... 339.251
Nº Copia..... 339.260

**D. RICARDO CHIRINO GODOY, PROFESOR TITULAR INTERINO DE FISIOLÓGÍA DEL DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación titulado *"INHIBICIÓN POR ESTRADIOL DE EFECTOS HEPÁTICOS ESPECÍFICOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS Y LA HORMONA DEL CRECIMIENTO"*, ha sido realizado por D. Antonio Jesús López Guerra en el Laboratorio de Fisiología del mencionado Departamento bajo su dirección y asesoramiento técnico y, una vez revisada la presente Memoria la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a cuatro de Noviembre de mil novecinetos noventa y cuatro.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature is stylized and appears to read 'Ric Chirino Godoy'.

Fdo.: Ricardo Chirino Godoy

**A mis padres**  
**A Manoli**  
**A Antonio y a Gonzalo**

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
1.1. Hormona de Crecimiento e Hígado.	2
1.1.1 El Receptor de GH.	6
1.1.2 Mecanismos de señalización de la GH en hepatocitos.	8
1.1.3 Acciones de la GH sobre el hígado.	8
1.2. Hormonas Tiroideas e Hígado.	11
1.2.1 El Receptor Nuclear de Hormonas Tiroideas.	12
1.2.2 Efectos de las Hormonas Tiroideas sobre la secreción de GH.	17
1.2.3 Efectos de las Hormonas Tiroideas sobre el Hígado.	18
1.3. Hormonas Sexuales e Hígado.	20
1.3.1 Efecto de los Estrógenos sobre proteínas hepáticas.	20
1.3.2 Regulación endocrina del Receptor de Estrógenos.	23
1.4. Lugar de unión de baja afinidad para glucocorticoides (LAGS):	
Perspectiva histórica.	26
1.4.1 Perfil farmacológico del LAGS.	29
1.4.2 Propiedades bioquímicas del LAGS.	30
1.4.3 Ontogenia del LAGS.	33
1.4.4 Regulación endocrina del LAGS.	34
1.4.5 Participación de otras hormonas en la regulación endocrina del LAGS.	40
<b>2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.</b>	<b>43</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>45</b>
3.1. Reactivos	45
3.2. Animales.	45
3.2.1 Condiciones generales.	45
3.2.2 Anestesia.	46
3.2.3 Manipulación de animales.	46
3.2.4 Administración de Hormonas.	48
3.3. Tampones.	48

*Índice*

3.4.	Extracción del tejido.	49
3.5.	Fraccionamiento celular: Obtención de citosol y microsomas.	49
3.6.	Ensayo del RG citosólico y de los LAGS microsomales.	50
3.7.	Ensayo del RE.	51
3.8.	Determinación de Estradiol sérico por RIA.	53
3.9.	Determinación de la concentración de proteínas.	53
3.10.	Determinación de la concentración máxima de sitios de unión (Bmax) y de la constante de disociación (Kd).	54
3.11.	Estudio estadístico.	54
4.	<b>RESULTADOS.</b>	43
4.1.	Ontogenia del LAGS.	55
4.2.	Efecto de la administración de GH sobre la concentración de LAGS en la cepa Lewis enana.	59
4.3.	Efecto de diversos tratamientos endocrinos sobre la expresión de LAGS en ratas Lewis y Lewis enana hipotiroideas.	62
4.4.	Expresión de LAGS en machos y hembras de diferentes cepas.	70
4.5.	Estudio del Dimorfismo sexual en la expresión de LAGS.	73
4.6.	Efecto de la ovariectomía antes y después de la pubertad.	78
4.7.	Efecto de la orquidectomía antes y después de la pubertad.	83
4.8.	Efecto del estradiol en machos adultos intactos.	86
4.9.	Efecto del estradiol en machos orquidectomizados antes de la pubertad.	89
4.10.	Efecto del estradiol en machos adultos orquidectomizados después e la pubertad.	92
4.11.	Efecto antagónico de la testosterona y el estradiol.	98
4.12.	Efecto del estradiol en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados.	103
4.13.	Efecto de la progesterona sobre la expresión de LAGS en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados.	108
4.14.	Capacidad del tamoxifeno para bloquear el efecto inhibitor del estradiol.	111

*Indice*

4.15. Efecto del estradiol en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados tratados con hGH.	114
4.16. Efecto del estradiol en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados tratados con hGH y hormonas tiroideas.	117
4.17. Efecto del estradiol sobre el receptor de estradiol en machos hipotiroideos y orquidectomizados tratados con GH y hormonas tiroideas.	122
<b>5. DISCUSION.</b>	<b>129</b>
5.1. Papel de las Hormonas Tiroideas y de la GH en la regulación endocrina de los LAGS.	129
5.2. Estudio del dimorfismo sexual en la expresión de LAGS.	133
5.3. A modo de epílogo, ¿Cuál es el papel que desempeñan las hormonas sexuales femeninas en el macho?	143
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	<b>147</b>
<b>7. AGRADECIMIENTOS.</b>	<b>151</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>153</b>

# INTRODUCCION

El hígado es un órgano sometido a una gran variedad de influjos hormonales. Ello es posible porque las células hepáticas expresan receptores para una amplia gama de hormonas y factores de crecimiento, los cuales median las respuestas específicas de las células hepáticas a cada una de estas hormonas y factores.

Uno de los múltiples papeles que el hígado desempeña dentro de la fisiología es su participación como órgano endocrino. En este sentido, es bien sabido que el hígado es capaz de producir y verter a la sangre diversos factores de crecimiento. Quizá los más investigados sean los Insulin-Like Growth Factors (IGFs), de los cuales se han descrito dos tipos. Aunque estos factores son producidos por muchos tejidos, en donde actuarían por vía paracrina, los niveles plasmáticos de IGF-I proceden mayoritariamente de su síntesis hepática, y esta síntesis está sometida a una regulación multihormonal. De todas ellas, es la hormona de crecimiento la que parece jugar un papel preponderante en la síntesis de IGF-I. A su vez, los niveles plasmáticos de IGF-I regulan a la baja la secreción de hormona del crecimiento. Ello ha dado pie a la hipótesis de que el hipotálamo, la hipófisis y el hígado forman un eje neuroendocrino.

Además del IGF-I, otras muchas proteínas hepáticas están sujetas a regulación multihormonal. Hace ahora seis años que nuestro grupo ha venido trabajando en la caracterización bioquímica y en la regulación endocrina de una proteína microsomal hepática, capaz de captar diversos esteroides pertenecientes a diferentes familias, con una menor afinidad que la exhibida por los respectivos

receptores, pero con una mayor capacidad de fijación. Esta proteína está regulada por los glucocorticoides, las hormonas tiroideas y la hormona del crecimiento. En esta memoria se pretende profundizar, tanto en el papel aislado que estas hormonas desempeñan en su regulación, como en el dimorfismo sexual al que está sometida, intentando desentrañar el modo en que el estradiol, en circunstancias fisiológicas, interfiere en dicha regulación.

### **1.1. HORMONA DE CRECIMIENTO E HÍGADO.**

La Hormona de Crecimiento (GH) es un polipéptido de 22 kDa que, en el hombre posee 191 aminoácidos dispuestos en una sola cadena, en la que existen dos puentes disulfuro. La GH de rata presenta un 66% de homología con la humana y es tan sólo un aminoácido más corta. La GH es sintetizada y secretada por la hipófisis y esta secreción es, en principio, controlada por dos péptidos hipotalámicos de efectos opuestos: la Somatostatina que inhibe la secreción de GH (Brazeau et al., 1973) y el Factor Liberador de Hormona del Crecimiento (GRF), el cual estimula la liberación de GH (Szabo et al., 1982). Tanto en el humano como en la rata, pero especialmente en esta última, la síntesis y secreción de GH además está fuertemente influenciada por las hormonas tiroideas y por los glucocorticoides, las cuales actúan sinérgica y directamente a nivel de la expresión génica de la GH (Wegnez et al., 1982; Martinoli y Pelletier, 1989).

A su vez, la GH es capaz de regular su propia secreción mediante la estimulación de la secreción de Somatostatina (Berelowitz et al., 1.981a; Tannenbaum, 1.980) y también a través de la estimulación de la secreción hepática del IGF-I, el cual es capaz de actuar sobre las células somatotrópicas inhibiendo la acción estimuladora del GRF (Berelowitz et al., 1.981b).

La secreción de GH no es continua a lo largo del día, sino que tiene lugar de forma episódica y siguiendo un patrón definido y diferente según el sexo y la edad. Así, en la rata, hasta los 22 días de edad, tanto los niveles plasmáticos como el patrón de secreción de GH es similar en ambos sexos. A partir de los 30 días de edad el patrón de secreción comienza a cambiar, de forma que en la rata macho adulta, la secreción de GH está gobernada por un ritmo circadiano en el cual se producen picos de secreción de GH aproximadamente cada 3.3 horas (Tannenbaum y Martin, 1976; Edén, 1979). Por su parte, las hembras presentan un ritmo con picos de mayor frecuencia -de uno a dos picos cada dos horas- pero de menor amplitud. Los niveles de GH entre picos son más altos en la hembra que en el macho.

Este dimorfismo sexual que caracteriza a la secreción de GH también se ha relacionado con la síntesis y liberación hipotalámica de los dos neuropéptidos anteriormente mencionados: el GRF y la Somatostatina (Frohman y Jansson, 1985). Se han usado diversos métodos para clarificar la verdadera importancia que estos neuropéptidos pueden tener sobre el patrón de secreción de GH. Así, Wherenberg (1.986) demostró que la amplitud de los picos de secreción de GH, pero no su

frecuencia, se veían incrementados durante la infusión continua de GRF. Otros autores, generaron un perfil masculino de secreción de GH en hembras intactas mediante la infusión intermitente de Somatostatina (Clark et al., 1988a), demostrando además, que la liberación de GH después de detener la infusión de Somatostastina dependía de la presencia de GRF (Clark et al., 1988b).

Tomando estos trabajos en conjunto, parece claro que en ambos sexos, la GH regula su propia secreción a través de un mecanismo de reatrolimentación en el que el aumento de la secreción de Somatostatina y la disminución de la secreción de GRF que acontecen durante los períodos de baja secreción de GH, están inducidos por el pico precedente de ésta (Carlsson et al., 1990).

Se ha demostrado la presencia de ARNm de Somatostatina en las ratas macho desde los 10 días de vida y, a diferencia de la hembras, persiste durante el desarrollo, incrementándose antes de la pubertad para disminuir a partir de ésta (Argente et al., 1991). Los niveles de ARNm de GRF son también mayores en el macho que en la hembra, aunque las diferencias en cuanto al sexo comienzan a hacerse evidentes a partir de los 30 días de edad (Gabriel et al., 1989). Por ello, no es extraño que la secreción de GH tras un estímulo con GRF u otros productos sea mayor en el macho que en la hembra (Krieg et al., 1986). Sin embargo, la administración de Glutamato monosódico inmediatamente después del nacimiento, con el fin de producir un deterioro específico de la producción de GRF sin afección de la producción de Somatostatina, consigue reducir a tan sólo un 10% la

secreción de GH en ambos sexos, pero con reducción de la frecuencia de los picos sólo en las hembras (Maiter et al., 1991a). Todos estos datos sugieren que la secreción de GRF es más continua en las hembras, lo cual explicaría los elevados niveles de GH que presentan la hembras en los períodos entre picos.

Como queda patente por lo hasta ahora mencionado, el modelo de secreción de GH debe estar fuertemente condicionado por las hormonas sexuales. Esta afirmación está corroborada por los numerosos trabajos que hasta el presente se han publicado en este sentido, relacionando las hormonas sexuales con la GH y con sus efectos sobre proteínas hepáticas específicas.

Se sabe que la administración de estrógenos a una rata macho y de andrógenos a una rata hembra, tiende a feminizar y masculinizar respectivamente el patrón de secreción de GH (Mode et al., 1982). También la orquidectomía neonatal produce feminización de la secreción de GH, aunque si a estos machos se les trata neonatalmente con andrógenos se vuelve a tener picos con la amplitud de los machos normales (Jansson et al., 1987). A pesar de ello, en otros trabajos se ha demostrado que la orquidectomía sólo o seguida de la administración de testosterona no tiene influencia sobre el contenido hipotalámico de GRF (Maiter et al., 1991b). Otras investigaciones han demostrado que el tratamiento con testosterona en machos orquidectomizados en la edad adulta es capaz de prevenir la importante caída del nivel de ARNm de GRF que de manera natural acontece en los pocos días siguientes a la orquidectomía, lo cual no ocurre cuando se usa

estrógenos en lugar de testosterona. De ello se puede concluir que los estrógenos no tienen efectos sobre el hipotálamo de la rata macho (Zeitler et al., 1990). Por otra parte, cuando se administra estradiol radiactivo a hembras ovariectomizadas, una hora después éste se localiza en el 90% de las células secretoras de GH y en el 35% de las secretoras de GRF (Shirasu et al., 1990).

Estos experimentos se complementan con el realizado por Hertz y colaboradores en 1989, en el que usando célula de hipófisis en cultivo que provenían de ratas gonadectomizadas antes de la pubertad, demuestra cómo la secreción de GH en respuesta al GRF y a la Somatostatina ante las hormonas sexuales es diferente según sea el sexo de las células hipofisarias, de forma que la testosterona es capaz de incrementar la secreción de GH sólo cuando las células hipofisarias son de macho, mientras que los estrógenos son capaces de disminuir la secreción de GH sólo cuando las células hipofisarias provienen de una hembra. Todos estos hallazgos en conjunto, apuntan a la idea actual de que las hormonas sexuales contribuyen a crear patrones de secreción de GH diferentes, tanto mediante efectos sobre la síntesis y secreción de GRF y Somatostatina como mediante influencia directa sobre la hipófisis (Legraverend et al., 1992).

### 1.1.1 EL RECEPTOR DE GH.

Los lugares de unión para la GH se expresan mayoritariamente en el hígado, aunque su presencia ha sido descrita en otros tejidos como páncreas, cerebro o testículo pero siempre en mucha menor concentración (Kelly et al., 1991). El Receptor de

GH ha sido clonado en numerosas especies incluida el hombre y la rata. Se trata de una proteína de unos 120 kDa que muestra alta homología con el receptor de prolactina, lo cual no reviste ninguna sorpresa dado que desde hace tiempo se conoce que la GH humana (hGH) es capaz de unirse con alta afinidad tanto al receptor de prolactina como al receptor de GH de la rata (Boutin et al., 1988).

En la rata, al igual que en el hombre, el receptor de GH (GH-R) se halla localizado en la membrana plasmática y estructuras membranosas del interior celular. Esto, probablemente, se debe a la corta vida media y a la rápida síntesis de este receptor (Picard et al., 1984, Baxter, 1985). El papel de la GH en la regulación de su propio receptor es variable, así, una marcada elevación de la GH se asocia con una baja expresión del receptor de GH, como ocurre en el ayuno, en la insuficiencia renal o en la diabetes inducida por streptozotocina, en la cual el tratamiento con Insulina restaura parcialmente los niveles (Baxter et al., 1980), sin embargo, un efecto paradójico aparece en la rata hipofisectomizada, y por tanto carente de GH, en la que aparece un aumento de los lugares de unión de GH en las membranas de hepatocitos (Picard y Postel-Vinay, 1984).

Los estrógenos también intervienen en la regulación del GH-R, pues en las hembras, después de la pubertad, la capacidad de unión de la GH a su receptor hepático se incrementa con respecto a los machos, y la preñez incluso llega a aumentarla en diez veces (Maes et al., 1983).

### 1.1.2 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LA GH EN HEPATOCITOS.

La fosforilación sobre un residuo de tirosina del receptor de GH parece ser el primer evento que acontece tras la unión de la GH a su receptor (Foster et al, 1988). Esta asociación de actividad tirosina quinasa con el receptor de GH ha sido demostrada en diversos modelos celulares, como células de hepatoma, linfocitos y adipocitos (Stred et al, 1990), lo cual sugiere que la actividad tirosina quinasa juega un importante papel en el mecanismo de señalización de la GH.

Por otra parte, la administración de GH a cultivos primarios de hepatocitos es capaz de incrementar la formación de Diacilglicerol (Johnson et al, 1990), y el hecho de que el diacilglicerol sea un potente estimulador de la actividad de la proteína quinasa C junto con las observaciones de que los inhibidores de esta proteína bloquean los efectos de la GH en adipocitos (Smal et al, 1989), ha hecho pensar en un posible papel mediador de la proteína quinasa C de la actividad inductora de la GH sobre algunos isoenzimas hepáticos del citocromo P-450. Todo ello indica que en los hepatocitos la GH puede tener más de un mecanismo de señalización para dar lugar a la transcripción génica (Tollet et al, 1991).

### 1.1.3 ACCIONES DE LA GH SOBRE EL HIGADO.

Múltiples y variadas son las funciones que la GH desarrolla sobre este órgano. Quizá, una de las más importantes consista en la inducción de la síntesis hepática de IGF-I. Este péptido, llamado también somatomedina C, es quien se encarga de

llevar a cabo muchas de las acciones que en su día fueron atribuídas a la GH, como, por ejemplo, la promoción del crecimiento. A su vez el IGF-I actuaría sobre la hipófisis, frenando la secreción de GH. Esto ha dado pie a la hipótesis de un eje neuroendocrino, formado por el hipotálamo, la hipófisis y el hígado. La mayor parte del IGF-I circulante se origina en el hígado (Moller et al., 1991), pero su acción puede también realizarla sin llegar a la sangre mediante un mecanismo paracrino (Daughaday y Rothwein, 1989). Por otra parte, existe una proteína sérica capaz de fijar IGF-I (Carlsson et al., 1990), lo cual complica el conocimiento de los niveles verdaderamente activos de hormona libre.

La importancia del patrón de secreción sexo-específico de la GH sobre los niveles séricos de IGF-I y el crecimiento corporal no es del todo conocido. Se sabe que los niveles séricos de IGF-I y el crecimiento corporal están más incrementados en las ratas macho hipofisectomizadas que se tratan con cuatro dosis diarias de GH que en aquellas que la reciben en infusión continua (Maiter et al., 1988). Este efecto estimulador de la GH sobre la producción hepática de IGF-I, puede, no obstante, ser bloqueado por un tratamiento con dexametasona en la rata hipofisectomizada, al mismo tiempo que es capaz de reducir la abundancia de ARNm de IGF-I. (Luo y Murphy, 1989).

Además de esta acción, la GH participa en la regulación de algunas isoformas del citocromo P-450, especialmente de aquellas que presentan un dimorfismo sexual en su regulación. Es el distinto patrón de secreción de la GH, previamente

comentado, quien gobierna la expresión de estas proteínas (Mode et al., 1989). Otra proteína sexualmente diferenciada es el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), el cual es expresado a una alta concentración en la rata macho, y de manera similar a algunas isoenzimas del citocromo P-450 su expresión depende del patrón masculino de secreción de GH (Ekberg et al., 1989).

El receptor de LDL es una proteína hepática que posee al menos una doble regulación hormonal. Esto es porque en ratas normales, la administración de dosis elevadas de Etinilestradiol es capaz de elevar entre cinco y diez veces la concentración de este receptor y de su ARNm. Sin embargo, cuando a ratas hipofisectomizadas se las trata con estrógenos, el incremento del receptor de LDL no es significativo, y para que lo sea, es necesario administrar al mismo tiempo GH (Rudling et al., 1992).

Por último, la GH también participa en la expresión de otras proteínas hepáticas de entre las que cabe destacar la  $\alpha_{2u}$ globulina. La  $\alpha_{2u}$ globulina es una proteína secretada por el hígado de la rata macho que comienza a expresarse a partir de los 40 días de edad alcanzando su máximo nivel a los 75-80 días. A partir de los cinco meses comienza a declinar su producción y aproximadamente a los dos años ya casi no existe síntesis hepática (Roy et al., 1983). Esta proteína es dependiente de andrógenos, hormonas tiroideas, glucocorticoides, GH e insulina (Roy et al., 1973, Mira y Castaño, 1989). Los glucocorticoides son el grupo con mayor poder inductor, seguido de las hormonas tiroideas, y usadas en combinación ambas se

potencian. La GH por su parte posee un potente efecto inductor que es manifiesto en situaciones de hipotiroidismo, lo cual sugiere que la acción de las hormonas tiroideas como inductoras de la  $\alpha_{2u}$ globulina está mediada por la GH (Shapiro y Sachchidananda, 1982; Shapiro, 1983). Esta hipótesis está además apoyada en un trabajo contemporáneo a estos, en el que usando el mismo modelo de rata hipotiroidea los autores comprueban cómo la administración de GH es por sí misma capaz de elevar los niveles hepáticos de ARNm de la  $\alpha_{2u}$ globulina (Chatterjee et al., 1983).

## 1.2. HORMONAS TIROIDEAS E HÍGADO.

Es ya un concepto clásico que las hormonas tiroideas actúan estimulando la síntesis de proteínas específicas en una gran variedad de tejidos, tanto durante el desarrollo, como en la edad adulta.

La acción de las hormonas tiroideas se lleva a cabo mediante la interacción de la forma activa de estas hormonas, que es la  $T_3$ , con un receptor nuclear específico presente en las células diana. El complejo hormona receptor luego actúa sobre determinados genes con la correspondiente inducción de ARNm. Dependiendo del tipo de célula y del estado de desarrollo, se inducen o se reprimen determinadas proteínas, es decir, que la respuesta a las hormonas tiroideas es específica de cada tipo de célula. Esto puede explicar el porqué la hormonas tiroideas generan efectos

tan amplios y diferentes sobre metabolismo intermediario, músculo, hueso, corazón, sistema nervioso, etc. Es una característica importante de la acción de las hormonas tiroideas, que algunas de las proteínas que inducen son, o bien hormonas o factores de crecimiento, o bien receptores, o bien enzimas que intervienen en procesos de producción, degradación o liberación de segundos mensajeros intracelulares.

La biosíntesis de las hormonas tiroideas ocurre en el epitelio especializado de la glándula tiroides, mediante un proceso en el que interviene una peroxidasa que cataliza la iodinación de algunos residuos de tirosina de una glicoproteína llamada Tiroglobulina, generándose así las monoiodotirosinas (MIT) y las diiodotirosinas (DIT). Posteriores acoplamientos entre dos DIT generan la  $T_4$  y entre un DIT y un MIT producen la  $T_3$ .

### 1.2.1 RECEPTOR NUCLEAR DE HORMONAS TIROIDEAS.

El mecanismo de acción de las hormonas tiroideas incluye una primera etapa de conversión intracelular de la hormona  $T_4$ , dominante en cuanto a secreción, hacia la  $T_3$ , biológicamente más activa. La conversión ocurre con participación de desiodinasas intracelulares, que son de dos tipos con diferente afinidad por  $T_4$ , y que tienen cierta especificidad tisular: el tipo I es localizado principalmente en tiroides, hígado y riñón, es inhibido por el PTU, y tiene menos afinidad por  $T_4$  que el tipo II, presente en cerebro, hipófisis y grasa parda (Oppenheimer et al., 1987). Se supone que la función de las desiodinasas es regular la concentración local de  $T_3$

a través de la velocidad de conversión de  $T_4$  en  $T_3$ . Las diferencias en el contenido y propiedades de las desiodinasas puede ser importante para determinar la velocidad de respuesta a la  $T_4$  en distintos tejidos.

La acción de las hormonas tiroideas es predominantemente nuclear. No obstante, existen numerosas evidencias que apuntan hacia acciones extragenómicas de las mismas. Entre ellas cabe citar la descripción de mecanismos de transporte mitocondrial y nuclear para hormonas tiroideas, así como la existencia de lugares de unión para las mismas en la membrana plasmática, o incluso en las lipoproteínas de baja densidad, cuyo significado es aún incierto (Ashizawa et al., 1992).

Las acciones nucleares de las hormonas tiroideas están mediadas por receptores nucleares (RT). En 1972 se demostró la existencia de lugares de unión nuclear para hormonas tiroideas (Shadow et al., 1972), y posteriormente se llevó a cabo su caracterización exhaustiva (Bernal et al., 1978). La  $K_d$  de los RT está en torno a  $10^{-10}$  M para  $T_3$ , y presenta una afinidad por distintos compuestos relacionados con las hormonas tiroideas que es sensiblemente semejante a su actividad biológica ( $TRIAC > L-T_3 > L-T_4 > rT_3$ ). El contenido de RT de los diversos tejidos es bajo, incluso en aquellos que responden muy activamente a las hormonas tiroideas, calculándose en torno a 10.000 moléculas de RT por célula de hígado o adenohipófisis. Al contrario que los receptores de glucocorticoides, con el que comparte numerosas semejanzas, la concentración de RT en citosol es muy baja, hallándosele preferentemente asociado estrechamente a la cromatina (Pascual et al., 1982; Casanova et al., 1984).

El RT existe en las células en dos formas predominantes, de 57 y 47 kDa, que reflejan a su vez la expresión de dos genes distintos. La secuencia de aminoácidos de ambas formas es conocida, y ha permitido clasificar a los RT en la denominada superfamilia de receptores nucleares, que agrupa los de hormonas esteroideas, vitamina D<sub>3</sub>, retinol, y algunas otras proteínas cuyos ligandos son por ahora desconocidos (receptores huérfanos). Esta familia incluye también el oncogén erb-A, relacionado estructuralmente con el RT, y único oncogén conocido de la familia de receptores nucleares.

La estructura de los RT es semejante a la del resto de los componentes de la superfamilia. Incluye varias regiones importantes, cuyas funciones han podido ser conocidas por análisis mutacional del ADN complementario que codifica el RT. Las más importantes regiones conocidas son: la zona de unión a la hormona, que abarca una amplia zona del extremo C-terminal de la molécula; la zona de unión al ADN, que está formada por dos dedos de zinc, en los que cada átomo de zinc agrupa tetraédricamente cuatro residuos de cisteína en la parte central de la molécula; una zona de localización nuclear, importante porque en su ausencia el receptor aparece en el citoplasma, y que es vecino a la zona de unión al ADN; un dominio de dimerización, que es responsable de la formación de dímeros y heterodímeros, formas activas de interacción RT-ADN. Finalmente, el RT tiene una región transactivadora, responsable de llevar a cabo la interacción proteica que se resuelve últimamente en la activación de la expresión génica (Evans , 1988).

En la interacción entre ADN y el receptor parece determinante una zona denominada "P-box" que es una secuencia de cinco aminoácidos, común para un número amplio de miembros de la familia. Otra zona "D-box" en el dominio de unión al ADN está localizada entre las dos primeras cisteínas del segundo dedo de zinc, y se supone que participa definiendo el espacio que debe quedar entre las "P-box" de los dos receptores que forman el dímero de RT activo, o, en su caso, del heterodímero. Esto es importante, porque las secuencias de aminoácidos de las "P-box" y de nucleótidos de los elementos de respuesta hormonal son muy similares entre receptores de la misma familia, por lo que resulta difícil explicar la especificidad en el reconocimiento de los respectivos genes. En cambio, la combinación de ligeras diferencias de secuencias entre "P-box" y "D-box" dan lugar a posibilidades muy restringidas de acceder al ADN de dímeros o heterodímeros distintos de los que corresponden a cada elemento de respuesta hormonal de cada gen regulado por hormonas de la familia de receptores nucleares (Umesono et al., 1991).

Además de la existencia de dos formas predominantes de RT (alfa y beta), codificadas por dos genes distintos, existe una notable diversidad entre ambos subtipos debida al procesamiento alternativo del ARNm que codifica estas proteínas principales. La abundancia de RT de diferentes tipos varía de tejido a tejido y, también, durante el desarrollo y la edad adulta. Las hormonas tiroideas causan una disminución notable del contenido tisular de receptores, aunque existen diferencias entre los diferentes subtipos de RT. Sin embargo, en adenohipófisis existe una

regulación positiva de los RT  $\beta 1$ , por las hormonas tiroideas, en tanto que los otros subtipos disminuyen. Se ha querido ver en esta regulación única para la hipófisis una correlación con la disminución que causan en la secreción de TSH (Jameson y De Groot, 1994).

Las hormonas tiroideas, especialmente la  $T_3$ , se unirían a sus receptores en el núcleo de la célula, y a continuación el complejo reconocería unas secuencias específicas de bases que conforman los elementos de respuesta tiroideos. Estas secuencias se encuentran en la vecindad de las regiones promotoras de los genes regulados por las hormonas tiroideas, tanto si éstas activan como si desactivan la expresión de dichos genes. Los RT se unen a los elementos de respuesta tiroideos como dímeros de RT o como heterodímeros con los receptores de retinol. La acción inductora de la expresión génica incluye la participación de otros elementos nucleares para llevar a cabo la fijación del complejo iniciador de la transcripción (Jameson y De Groot, 1994).

Los eventos transcripcionales causan un rápido cambio en los niveles de ARN mensajero que codifica para la proteína dependiente de hormonas tiroideas. Existe una larga lista de proteínas cuya síntesis es inducida por parte de las hormonas tiroideas, que abarca un amplísimo espectro de acciones celulares. También existe un grupo numeroso de proteínas cuya síntesis es específicamente reprimida por las hormonas tiroideas. Entre las primeras, destaca la producción de hormonas por la hipófisis, como la GH, oxitocina o péptido natriurético atrial; numerosos enzimas

(málico, glucoquinasa, etc.), proteínas plasmáticas como el angiotensinógeno, transportadores iónicos y receptores adrenérgicos. Entre las segundas, la TSH, el receptor de hormona tiroidea, y el receptor de EGF (Jameson y De Groot, 1994). .

Las hormonas tiroideas también causan importantes efectos fisiológicos indirectos, como la estimulación de la producción hepática de IGF-1, debida al efecto que éstas tienen sobre la secreción de GH. Muchos de los efectos de las hormonas tiroideas son sinérgicos con otras hormonas, especialmente con glucocorticoides (síntesis de GH), y también con la GH, como se verá más adelante en el desarrollo de esta memoria.

### 1.2.2 EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA SECRECIÓN DE GH.

Las hormonas tiroideas ejercen un control sobre la hipófisis al actuar sobre la secreción no sólo de TSH, sino también de GH. Uno de los primeros trabajos en los que aparece este control, se debe a Tsai y Samuels (1974), en el que demostraron en cultivos celulares de hipófisis que las células productoras de GH sintetizaban hasta diez veces más cantidad de esta hormona cuando eran estimuladas con concentraciones fisiológicas de  $T_3$ . Este incremento se vio que era paralelo al incremento de ARNm de la GH y que era potenciado por los glucocorticoides (Samuels et al., 1977; Spindler et al., 1982).

### 1.2.2 EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL HÍGADO.

Las hormonas tiroideas ejercen una amplia variedad de funciones sobre el hígado, de entre las que destacan la estimulación de la expresión de proteínas específicas tales como la Spot<sub>14</sub> o la enzima málica.

La enzima málica es una enzima clave en la biosíntesis de lípidos ya que convierte el malato en piruvato. La síntesis de la enzima málica es regulada por la T<sub>3</sub> y por factores metabólicos. Esta actividad enzimática está muy deprimida en situaciones de hipotiroidismo y se incrementa de 10 a 12 veces tras la administración de T<sub>3</sub>. El efecto de esta hormona se lleva a cabo directamente a nivel génico estimulando la síntesis de ARNm de esta enzima. Asimismo, la inducción de la enzima málica está sujeta a factores dietéticos. Una dieta lipogénica, rica en carbohidratos, incrementa el efecto máximo de la T<sub>3</sub>. Este efecto ha sido denominado amplificación de la inducción de la enzima por hormonas tiroideas. La diabetes o el glucagón provocan la represión de la enzima. En este sentido, es conveniente reseñar que en experimentos desarrollados *in vitro* la insulina y los glucocorticoides ejercen un efecto permisivo sobre la acción de la T<sub>3</sub>.

La Spot<sub>14</sub> es una proteína citosólica de 18 kDa, inicialmente identificada en autorradiografías de proteínas separadas de hígado, de ahí su nombre. Aunque su

función es desconocida, su rápida y dramática respuesta a la  $T_3$  ha causado intenso estudio de su regulación. La administración de  $T_3$  causa un importante incremento en el ARNm de esta proteína al cabo de tan sólo 20 minutos, aumentando hasta 15 veces su concentración de 4 a 24 horas más tarde de la administración de la hormona. Esta respuesta es amplificada si la rata recibe una dieta lipogénica, rica en carbohidratos, lo que induce a pensar que de alguna manera podría estar relacionada con el metabolismo lipídico.

Además de estos efectos más o menos específicos, las hormonas tiroideas participan conjuntamente con otras hormonas, fundamentalmente la GH y los glucocorticoides, en la regulación de la expresión de una amplia variedad de proteínas hepáticas. Así, estas tres hormonas actuarían regulando la expresión del receptor hepático de estrógenos, del receptor de la LDL, del propio IGF-I, o de la  $\alpha_{2u}$ globulina. En general, ha sido bien estudiada la participación de estas tres hormonas en la expresión de estas proteínas, y los datos de que se disponen en la actualidad tienden a dar a la GH un papel preponderante, aunque para su acción se requiere el concierto de las hormonas tiroideas.

Por último, la participación de los glucocorticoides parece ser más bien permisiva, creando el ambiente adecuado para que las otras dos hormonas puedan actuar adecuadamente.

### **1.3. HORMONAS SEXUALES E HÍGADO.**

#### **1.3.1 EFECTO DE LOS ESTROGENOS SOBRE PROTEINAS HEPATICAS.**

Los estrógenos ejercen sus funciones a través del Receptor de Estrógenos (RE). El hígado no está clásicamente considerado como un órgano diana para los estrógenos, aunque contiene RE en baja concentración. Los estrógenos afectan de manera importante la síntesis de varias proteínas hepáticas, algunas veces de manera parcialmente directa, como en el caso del receptor de la Lipoproteína de Baja Densidad (LDL) y del angiotensinógeno; y otras veces sólo regulan de forma indirecta esas proteínas por cuanto actúa sobre otros factores, tales como la GH.

El receptor de LDL es importante para la regulación del nivel sérico de colesterol, mediante la extracción de la mayor parte del colesterol circulante. De hecho, tras la administración de altas dosis de estradiol o de etinilestradiol se consigue una inducción de 5 a 10 veces del receptor hepático de LDL que se acompaña de una drástica reducción de los niveles séricos de colesterol. Este efecto no se observa en las ratas hipofisectomizadas o en las inmaduras, pues en estos modelos los niveles hepáticos de RE son bajos, sin embargo, si a estas ratas se las trata con GH (que incrementa los niveles de RE) al mismo tiempo que se las trata con etinilestradiol, se consigue el mismo efecto que en las ratas maduras y no hipofisectomizadas, con la consiguiente elevación del nivel de receptor de LDL (Rudling et al, 1992). En conejos de ambos sexos, también es posible inducir un aumento de hasta 8 veces del ARNm de las LDL, usando Etinilestradiol a dosis farmacológicas (5 y 10 mg por Kg de peso) (Ma et al., 1986).

Se conoce desde hace tiempo que el tratamiento con estrógenos incrementa la síntesis y secreción de angiotensinógeno por el hígado, tanto en la rata adulta como en el hombre, tanto *in vivo* como en hígados perfundidos. Sin embargo, en las ratas hipofisectomizadas o inmaduras -donde hay un bajo nivel de RE- no hay inducción de angiotensinógeno en respuesta a los estrógenos. En ratas macho adultas, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de angiotensinógeno están sujetos a un control multihormonal en el que intervienen los glucocorticoides, los andrógenos y el propio estradiol. En un trabajo de Klett et al. (1992), se demostró la implicación de los glucocorticoides, pues el tratamiento con 7 mg/Kg de peso de Dexametasona, produjo un incremento a las 24 horas de hasta tres veces. Los estrógenos, aplicados en forma de Estradiol Valerato (7 mg/Kg de peso), también originan inducción, aunque en menor grado que los glucocorticoides.

En lo que se refiere a las proteínas mencionadas, probablemente los efectos de los estrógenos son en parte directos, mientras que otras proteínas puede estar sólo reguladas mediante efectos indirectos de los estrógenos, por cuanto existe factores que se ven afectados por la secreción de estrógenos, como por ejemplo la secreción de GH (Norstedt et al., 1981). Así, la falta de respuesta a los estrógenos que se aprecia en las ratas hipofisectomizadas puede deberse a la baja expresión de RE y también a la poca secreción de GH. Ello hace difícil discriminar los efectos directos del estradiol y los que se deben a la baja secreción de GH que acontece durante el tratamiento con estrógenos. De hecho, muchos efectos de los estrógenos sobre proteínas hepáticas pueden ser reproducidos dando GH en infusión continua (Mode et al., 1981; Mode y Norstedt, 1982).

Otra entidad hepática que está regulada por estrógenos es una proteína urinaria conocida como  $\alpha_{2u}$ globulina. Ésta está presente sólo en los machos y es fuertemente inhibida por los estrógenos incluso en presencia de potentes inductores como la Dihidrotestosterona, que es capaz de inducirla en las hembras. Este efecto represor fue descrito inicialmente como independiente del receptor de andrógenos (Roy et al., 1975). Por otra parte, la castración reduce de forma importante la expresión de  $\alpha_{2u}$ globulina y los niveles vuelven a recuperarse tras a administración de Dihidrotestosterona, la cual origina un aumento de los niveles de ARNm de  $\alpha_{2u}$ globulina. En un trabajo posterior publicado por Kurtz et al. (1976), se demuestra que efectivamente el estradiol es capaz de competir con el receptor de andrógenos y mediante este mecanismo ejercer su efecto represor.

Sobre el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y su receptor los estrógenos también ejercen efectos reguladores. Esto ha sido estudiado tanto a nivel de útero como en células en cultivo de cáncer de mama. En útero, la administración de estradiol a ratas hembras inmaduras produce un incremento de hasta tres veces del receptor de EGF de manera específica y sin que se vea afectado por la administración de otras hormonas como la dexametasona, la progesterona o la dihidrotestosterona (Mukku y Stancel, 1984). En cultivo de células MCF 7 se ha demostrado una relación inversa entre el RE y el receptor de EGF (Lee et al., 1989).

La síntesis de IGF-I está también influenciada por los estrógenos. Murphy et al. (1988), demostraron que en la rata hembra ovariectomizada e hipofisectomizada

los niveles séricos de IGF-I eran menores si se las trataba con GH y dosis bajas de estradiol que con GH sola.

### 1.3.2 REGULACION ENDOCRINA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS.

El Receptor de Estrógenos (RE) está ubicado dentro de la superfamilia de receptores esteroideos/tiroideos. El RE humano está compuesto de 595 aminoácidos mientras que el de rata posee cinco aminoácidos más. Entre ambos existe un 88% de homología. El RE hepático tiene una particular ontogenia, pues en la rata inmadura es expresado en muy baja concentración, y ésta se incrementa de 5 a 10 veces al llegar a la pubertad, en cambio en tejido uterino está presente a alta concentración en la rata inmadura. Es interesante resaltar que el incremento del nivel de RE ocurra al mismo tiempo que comienza a madurar el patrón de secreción de GH.

En la regulación endocrina del RE intervienen diversas hormonas, como los Glucocorticoides, las Hormonas Tiroideas y la GH. La regulación por glucocorticoides se puso de manifiesto tras un trabajo publicado por Norstedt et al., en 1981, en el que se demostraba que la adrenalectomía en ratas hembras ovariectomizadas disminuía los niveles del RE hepáticos. En un trabajo posterior de Freyschuss et al., en 1991, se demostró que la adrenalectomía no acompañada de ovariectomía carecía de efecto sobre los niveles de RE, de lo que se podía pensar que los glucocorticoides no debían tener un papel principal en la regulación del RE. Por otra parte, si la adrenalectomía se combina con la tiroidectomía el resultado es

una disminución de los niveles de RE similar a la descrita por Chamness et al. en 1975, en las ratas hipofisectomizadas. La restauración de los niveles de RE en el modelo adrenalectomizado y tiroidectomizado se consigue mediante un tratamiento combinado de betametasona y  $T_3$  pero no así cuando estas hormonas se administran por separado, sugiriéndose, por tanto, que el efecto directo de los glucocorticoides es limitado sobre la expresión de RE, actuando probablemente como sinérgicos de la secreción de GH (Norstedt et al., 1981).

En cuanto a la regulación del RE por las Hormonas Tiroideas, se sabe que tras la tiroidectomía se manifiesta una disminución tiempo-dependiente del RE tanto en hígado como en riñón, pero no en útero. En este mismo modelo, el tratamiento con  $T_3$  ( $1\mu\text{g}/\text{dia}$ ) es capaz de restaurar completamente el nivel de RE, sin embargo, la dosis de  $T_3$  parece ser crítica sobre la mayor o menor expresión de RE, pues dosis claramente suprafisiológicas (de  $50\mu\text{g}/\text{dia}$ ) se muestran incapaces de restaurar completamente el nivel de RE en los animales tiroidectomizados, e incluso es capaz de disminuirlo en las ratas intactas y en las ovariectomizadas (Eriksson y Freyschuss, 1988).

Por otra parte, la ovariectomía consigue duplicar la expresión de RE hepático, sin embargo, cuando se combina con la tiroidectomía, el efecto que se obtiene es similar al de la tiroidectomía sola, de lo que se puede deducir que se necesita una normal función tiroidea para que la ovariectomía induzca una regulación al alza del

RE. Nuevamente, aparece la duda de si el efecto de las hormonas tiroideas es directo o está mediado por la GH: la respuesta fue aportada por Freyschuss y Eriksson en 1988 quienes observaron un incremento de RE tras el tratamiento con hormonas tiroideas de ratas hembras hipofisectomizadas, sin que se apreciaran efectos adicionales al tratar a estas mismas ratas con estradiol.

Las situaciones de hipertiroidismo también manifiestan efectos sobre el RE que nos sirven para aclarar si la acción de las hormonas tiroideas sobre el RE es directa, indirecta o de ambos tipos. En el modelo de rata adrenalectomizada y tiroidectomizada, la administración conjunta de glucocorticoides y  $T_3$  produce efectos similares dosis-dependiente; así, dosis altas de  $T_3$  ( $20 \mu\text{g}/\text{dia}$ ), en combinación con betametasona, es capaz de incrementar el RE al mismo nivel que lo hace la dosis baja de  $T_3$  ( $1 \mu\text{g}/\text{dia}$ ), también en combinación con betametasona. Sin embargo, entre ambos tipos de dosis existe una importante diferencia, y es que la dosis baja de  $T_3$  no produce disminución del nivel plasmático de GH, mientras que el hipertiroidismo originado por las dosis altas sí lo origina (Miki et al., 1992). Esto apoya la hipótesis de que las dosis altas de  $T_3$  pueden tener un efecto directo sobre la síntesis del RE, mientras que las dosis bajas pueden parcialmente incrementarlo a través de la estimulación de la secreción de GH (Freyschuss et al., 1991).

Esta idea se corroboró posteriormente al comprobar Freyschuss et al., en 1994, que en las ratas hipofisectomizadas, las altas dosis de  $T_3$  producían la duplicación

tanto del RE como de su ARNm, mientras que en este modelo la dosis baja no generaba ningún incremento. Se puede, por tanto, creer que la regulación del RE por las hormonas tiroideas es doble, por una parte directa y por otra parte mediada por la GH.

El mejor modelo para conocer la implicación de la GH en la regulación del RE es la rata hipofisectomizada, carente de GH y con unos niveles muy bajos de RE. La administración continua de GH mediante bomba de infusión a ratas hembras hipofisectomizadas logra restaurar parcialmente los niveles de RE, sin embargo, cuando esta misma dosis se administra en dos inyecciones diarias no se aprecia este efecto (Norstedt, 1982). Parece claro pues, que no sólo es importante la hormona, sino también el modo de administración, lo cual lleva consigo la imitación de un patrón sexual determinado de secreción de GH.

#### **1.4. LUGAR DE UNIÓN DE BAJA AFINIDAD PARA GLUCOCORTICOIDES (LAGS): PERSPECTIVA HISTÓRICA.**

La existencia en el hígado de dos lugares de unión para glucocorticoides es conocida desde finales de los años sesenta. Uno de ellos sería el receptor de glucocorticoides (RG), de localización citoplásmica y nuclear, cuyo estudio excede el propósito de la presente Introducción. El otro lugar fue demostrado por primera vez por Mayewsky y Litwack (1969) en el que detallan la existencia de un lugar de

unión para [<sup>3</sup>H]Cortisol en membranas hepáticas, siendo su abundancia mayor en el retículo endoplásmico liso. Este lugar de unión presentaba una afinidad para el [<sup>3</sup>H]Cortisol menor que la exhibida por el RG, pero poseía una mayor capacidad de fijación. Estas dos propiedades unidas a su localización eminentemente membranal, hicieron considerar a estos autores que este sitio de unión y el RG eran dos entidades independientes.

Tras esta primera descripción, se produjo un vacío de investigación al respecto, tal vez motivado por el hecho de que los investigadores consideraron de mayor interés centrarse en el estudio del RG. Así, hay que remontarse hasta el año 1978, para encontrar en la literatura un nuevo trabajo sobre esta entidad microsomal. En dicho trabajo, Parchman et al. hacen un estudio de la fijación nuclear de glucocorticoides y demuestran que las membranas nucleares son capaces de captar este tipo de esteroides. Este lugar de captación nuclear poseía una ontogenia distinta de la exhibida por el RG (Giannopoulos, 1975; Feldman, 1974), de manera que era muy escasa o nula durante las primeras cuatro semanas de vida del animal, para a continuación comenzar a aumentar de concentración, hasta hacerse máxima a los tres meses de edad.

Siguiendo con el hilo argumental de este lugar de fijación nuclear de glucocorticoides, en 1984, Kauffman y Shaper publicaron un elegante trabajo en el que demostraban que el mismo no guardaba relación con el Receptor nuclear de glucocorticoides. Esto lo hicieron mediante el uso de dos ligandos radiactivos del

RG, la [<sup>3</sup>H]Dexametasona ([<sup>3</sup>H]DEX) y la [<sup>3</sup>H]Triancinololna acetónido ([<sup>3</sup>H]TA). Mediante el uso de ambos, pudieron demostrar que la fijación nuclear de [<sup>3</sup>H]DEX era mucho mayor que la de [<sup>3</sup>H]TA, y que esta fijación de [<sup>3</sup>H]DEX estaba confinada básicamente a la envuelta nuclear. Por ello, estos autores pudieron demostrar la existencia de dos lugares de unión de glucocorticoides al núcleo celular. Uno de ellos sería el propio RG, que capta tanto [<sup>3</sup>H]DEX como [<sup>3</sup>H]TA, y el otro sería el lugar de unión de la envuelta nuclear, que sólo capta [<sup>3</sup>H]DEX. Asimismo, estos autores demostraron que la adrenalectomía disminuía de forma significativa la captación de [<sup>3</sup>H]DEX por envueltas nucleares aisladas.

De forma paralela a los estudios de fijación de glucocorticoides por las envueltas nucleares, se siguieron produciendo trabajos sobre este lugar en microsomas de hígado. En 1981, Ambellan et al. ahondaron en su caracterización bioquímica y perfil farmacológico, y ya en 1983, Omrani et al. demostraron el importante efecto depresor de la adrenalectomía sobre este lugar microsomal de unión.

Puesto que la envuelta nuclear se continúa sin solución de continuidad con el retículo endoplásmico, la coincidencia en los datos anteriormente expuestos hablan en favor de la hipótesis de que el lugar de unión microsomal para glucocorticoides es en realidad el mismo que se encuentra también presente en la envuelta nuclear.

Desde finales de los años ochenta y hasta nuestros días, nuestro conocimiento del LAGS se ha visto enormemente ampliado, merced al esfuerzo de diversos grupos

de investigación, entre ellos el nuestro. Así, se han estudiado exhaustivamente sus propiedades bioquímicas, su perfil farmacológico, su ontogenia, su localización intracelular, y su regulación endocrina. A continuación, se detallan los hallazgos más significativos en cada uno de estos campos.

#### 1.4.1 PERFIL FARMACOLOGICO DEL LAGS.

El LAGS tiene un amplio perfil farmacológico. En este sentido, es capaz de captar:

- Glucocorticoides, mostrando afinidad en orden descendente por Prednisolona, Cortisol, Dexametasona, Corticosterona. Esta afinidad varía entre 20 y 100 nM. Curiosamente, el LAGS carece de afinidad por el potente glucocorticoide Acetónido de Triancinolona, comúnmente usado en el estudio del RG (Ambellan, 1981, Omrani et al. 1983, Kauffman y Shaper 1984 , Chirino et al. 1989).
- Progestágenos, especialmente por la progesterona y ya con mucha menor afinidad por el R5020, lo que diferencia a esta entidad del Receptor de Progesterona (Chirino et al. 1990, Yamada et al. 1990).
- Estrógenos. El LAGS carece de afinidad por estrógenos naturales tales como el estradiol, el estriol o la estrona, y por estrógenos no esteroideos tales como el dietilestilbestrol, o incluso por antiestrógenos como el Tamoxifeno. Sin embargo, sí es capaz de ligar con relativa afinidad ( $K_d \approx 200$  nM) estrógenos 17  $\alpha$ -alquil derivados, tales como el etinilestradiol o el mestranol (Fernández et. al 1994b). El hecho de que el LAGS reconozca a estos derivados y no el estradiol, sugiere que este grupo alquílico juega un papel

clave en este proceso de reconocimiento.

- Andrógenos. El LAGS carece de afinidad por andrógenos naturales tales como la testosterona, la dihidrotestosterona, la androsterona, o la dehidroepiandrosterona, y por andrógenos sintéticos tales como el R1881. Esta propiedad descarta que el LAGS pudiera ser una forma del receptor de andrógenos. Sin embargo, el LAGS manifiesta afinidad por algunos andrógenos 17  $\alpha$ -alquil derivados, tales como el estanozolol y el danazol y, ya en menor medida, por la fluoximesterona o el mestaline, comúnmente utilizados en el tratamiento de ciertas enfermedades como el edema angioneurótico familiar y como drogas de abuso por parte de ciertos atletas. Tal y como se comentó en el apartado anterior, es este radical alquílico quien posiblemente juegue un papel clave en la interacción de estos esteroides con el LAGS. Curiosamente, el modo de acción del estanozolol y danazol sobre el LAGS parece distinto al que desarrollan otros esteroides (inhibición competitiva), puesto que ellos son capaces de desarrollar una inactivación irreversible del LAGS a través de un patrón alostérico negativo (Fernández et al. 1994a).

#### 1.4.2 PROPIEDADES BIOQUIMICAS DEL LAGS.

La fijación específica de [<sup>3</sup>H]DEX a microsomas hepáticos es un proceso saturable, en el rango de concentración apropiado (de 10 a 500 nM). La fijación inespecífica, medida en presencia de un exceso de 200 veces de DEX no marcada, da una línea recta, lo que indica que es un proceso no saturable y proporcional a la

concentración de [<sup>3</sup>H]DEX usada. La representación de Scatchard de esta fijación específica es una línea recta, lo que indica que la [<sup>3</sup>H]DEX se une a un único lugar de unión ( $p < 0.001$ ), con una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $100 \pm 6$  nM y una máxima capacidad de fijación ( $B_{max}$ ) de  $13 \pm 2$  pmol/mg proteína. Curiosamente, la afinidad para la [<sup>3</sup>H]DEX exhibida por este lugar es cincuenta veces menor que la del RG, pero su capacidad, normalizada en cuanto a concentración proteica, es unas cincuenta veces mayor.

El LAGS está localizado en la fracción microsomal del fraccionado celular hepático. Cuando los microsomas se someten a separación, se observa que la mayor concentración de LAGS aparece en los microsomas lisos, que se corresponden, aproximadamente, con el retículo endoplásmico liso (Chirino et al. 1989, Mayewsky y Litwack 1969). Asimismo, los núcleos purificados mediante centrifugación en alta concentración de sacarosa poseen actividad LAGS que está confinada a la envuelta nuclear (Kauffman y Shaper 1984).

Mediante el uso de tampones de alta fuerza iónica, se ha podido demostrar que el LAGS es una entidad constitutiva de membrana, y que no representa una contaminación debida a la manipulación del tejido. La incubación de los microsomas con proteasas tales como tripsina o proteinasa K abate la fijación de [<sup>3</sup>H]DEX a los microsomas, lo que indica que el LAGS es una proteína con su lugar de unión al esteroide situado en la superficie externa ("citosólica") de la membrana (L. Fernández, comunicación personal) .

El uso de detergentes ha permitido lograr la solubilización del LAGS. Diversos detergentes se han mostrado muy eficaces; de entre ellos, el tritón X-100, el nonidet P-40 y el CHAPS se han mostrado como los mejores. El LAGS puede ser, asimismo, solubilizado sin perder actividad mediante el deoxicolato sódico, un detergente capaz de inactivar al citocromo P-450.

Mediante estudios de partición de fases mediante el detergente tritón X-114, se ha podido demostrar que el LAGS queda retenido en su mayor parte en la fase orgánica, lo que indica que esta proteína es de naturaleza hidrofóbica, característica ésta que comparten muchas proteínas constitutivas de membrana (L. Fernández, comunicación personal).

Un aspecto que se consideró interesante abordar fue el de estudiar la vida media del LAGS. La administración de cicloheximida, un potente inhibidor de la síntesis proteica, a ratas pudo demostrar que el LAGS tiene una vida media corta, menor de 24 horas. Esto lo diferencia de otros receptores para hormonas esteroides, cuya vida media es mucho más larga, situándose en torno a los cinco días (Chirino et al. 1990).

Por último, en lo que se refiere a la distribución tisular del LAGS, esta proteína es expresada mayoritariamente por el hígado, en donde alcanza una concentración de aproximadamente 12-14 picomoles por miligramo de proteína microsomal. El riñón

y la placenta también lo expresan, pero en mucha menor concentración. Por último, su actividad es muy baja o indetectable en otros órganos o tejidos tales como bazo, músculo, cerebro, corazón, pulmón, intestino o cerebro.

#### 1.4.3 ONTOGENIA DEL LAGS.

Desde los inicios de los años setenta se conocía la ontogenia del RG (Giannopoulos, 1975; Feldman, 1974). Por ello, y en un intento por diferenciar aún más al LAGS del RG se consideró de interés estudiar la expresión del LAGS a lo largo de la vida del animal.

Mientras que el RG ya es expresado desde la vida fetal y mantiene unos niveles relativamente constantes a lo largo de la vida extrauteria, el LAGS no es expresado antes de las cuatro semanas de vida. A partir de aquí comienza a aumentar de concentración, hasta hacerse máxima en torno a los tres meses de edad. Luego, su concentración declina paulatinamente, de manera que a los seis meses de edad, ésta es aproximadamente la mitad de la observada a los tres meses.

A partir de los seis meses de edad, la concentración de LAGS se mantiene relativamente constante, para luego volver a disminuir en la etapa final de vida del animal, esto es, a los 24 meses de edad (Chirino et al. 1989, Parchman et al. 1978).

Esta ontogenia del LAGS no es ni mucho menos novedosa. Una gran variedad de proteínas hepáticas, entre las que cabe citar algunas isoenzimas del citocromo P-450, la  $\alpha_2$ globulina, el receptor de estrógenos hepático, o el Insulin-Like Growth Factor I, muestran una ontogenia similar. Todas estas proteínas presentan una característica común: están sujetas a regulación multihormonal, y es precisamente esta regulación la responsable de que su expresión fluctúe de una forma tan llamativa a lo largo de la vida.

La ontogenia del LAGS claramente apuntaba hacia una regulación multihormonal del mismo, y ello nos hizo estudiarla de una forma exhaustiva.

#### 1.4.4 REGULACION ENDOCRINA DEL LAGS.

Tal y como se comentó antes, la ontogenia del LAGS sugería que estaba sujeto a una compleja regulación endocrina. En una primera aproximación, se decidió investigar el papel que jugaba la glándula adrenal en dicha regulación, debido a la capacidad exhibida por el LAGS para captar glucocorticoides. La adrenalectomía provocó una reducción del contenido de LAGS de un 50%, lo que claramente indicaba que la adrenal estaba implicada en su regulación.

La adrenal es un órgano relativamente complejo, con un origen embriológico doble. La médula adrenal deriva del tejido nervioso y se encarga de producir y verter a la sangre catecolaminas. La corteza adrenal deriva del tejido mesodérmico y se

encarga de sintetizar diversas hormonas entre las que se cuentan los glucocorticoides, los mineralocorticoides y los andrógenos adrenales. Si la adrenal participaba en la regulación del LAGS, la siguiente pregunta a responder sería: ¿a través de qué hormona ejerce tal influencia? La respuesta a tal pregunta surgió del hecho de que la inyección de un glucocorticoide -el acetato de corticosterona- a dosis fisiológicas a ratas adrenalectomizadas fue capaz de revertir completamente el efecto depresor que la adrenalectomía tenía sobre el nivel de LAGS. Por todo ello, pudo concluirse que los glucocorticoides estaban implicados en la regulación endocrina del LAGS (Chirino et al. 1991).

La privación de glucocorticoide disminuía en un 50% los niveles de LAGS. Ello daba pie a la posibilidad de que otras hormonas también participaran en su regulación. Por ello, se decidió investigar el papel que otros órganos endocrinos podían ejercer sobre dicha expresión.

La castración del animal careció de efectos apreciables sobre la expresión de LAGS, descartándose así el posible papel que las hormonas sexuales masculinas pudieran ejercer sobre él. Por contra, el hipotiroidismo inducido por propiltiouracilo (PTU) tuvo un poderoso efecto depresor sobre la expresión de LAGS. Así, a las cuatro semanas de tratamiento con PTU, la concentración de LAGS era de aproximadamente un 10% de la exhibida por los animales intactos.

El efecto depresor del PTU sobre la concentración de LAGS podía ser debido, bien a un efecto directo de esta droga sobre el hígado, o bien a la intensa inhibición de la producción de hormonas tiroideas que provoca. La respuesta a este dilema vino tras la observación de que la administración de  $T_3$  a ratas en tratamiento con PTU fue capaz de restablecer plenamente el nivel de LAGS (Chirino et al. 1991).

Tomando en consideración todos los resultados anteriormente comentados, puede concluirse que las hormonas tiroideas y los glucocorticoides participan en la regulación del LAGS, siendo la influencia de las primeras de mayor magnitud que la de las segundas.

En un intento por conocer en mayor profundidad la regulación endocrina del LAGS, se decidió usar la rata hipofisectomizada como modelo experimental más idóneo. Este animal presenta un importante déficit de secreción de hormonas periféricas tales como los glucocorticoides, las hormonas tiroideas, y las hormonas sexuales, amén de un déficit de secreción de hormonas hipofisarias que no participan en la regulación de esas glándulas endocrinas, tales como la hormona de crecimiento o la prolactina.

En los animales hipofisectomizados, la expresión de LAGS era nula, lo cual indicaba claramente que esta expresión estaba completamente bajo control hipofisario. La administración separada de acetato de corticosterona o de  $T_3$  tuvo sólo un ligero

efecto positivo sobre la expresión de LAGS. Sin embargo, cuando ambas hormonas se administraron en combinación, se asistió a una recuperación completa del nivel de LAGS. Estos resultados concuerdan con aquellos comentados previamente y refuerzan la hipótesis de que las hormonas tiroideas y los glucocorticoides actúan sinérgicamente regulando la expresión hepática de LAGS (Chirino et al. 1991).

En una serie de experimentos realizados administrando hormonas hipofisarias y gonadotropinas en animales hipofisectomizados, se observó que ninguna de ellas provocaba respuesta alguna, salvo la hormona de crecimiento (GH), que tenía un ligero efecto estimulador. Por ello, decidimos estudiar el efecto que la GH podía tener en la regulación del LAGS, pero además, habían otros dos motivos adicionales que no se debían pasar por alto:

- Muchas proteínas hepáticas son reguladas por la GH, actuando en combinación con los glucocorticoides y las hormonas tiroideas. A modo de ejemplo, baste citar al receptor de estrógenos, o al IGF-I.
- Las hormonas tiroideas y los glucocorticoides son esenciales para una adecuada secreción de GH en la rata. Así, el hipotiroidismo o la adrenalectomía deprimen considerablemente su secreción.

En una primera aproximación, se decidió estudiar el efecto de la administración de GH a animales hipotiroideos. Este modelo se seleccionó debido a su bajo contenido

en LAGS. La administración de GH a estos animales elevó significativamente el contenido de LAGS, de manera que estos llegaron a alcanzar un valor en torno al 60% de los animales control. Los resultados de este experimento fueron considerados como altamente promisorios, ya que demostraban a las claras el papel de la GH en la regulación endocrina del LAGS (Chirino et al. 1994).

La siguiente etapa consistió en investigar el papel de la GH en animales hipofisectomizados. Los hallazgos más significativos obtenidos en ellos pueden resumirse en los siguientes:

- La administración aislada de hormonas tiroideas, glucocorticoides o GH a ratas hipofisectomizadas, sólo tuvo un tenue efecto sobre el nivel de LAGS
- La administración conjunta de glucocorticoide y de hormonas tiroideas fue capaz de restaurar por completo el nivel de LAGS.
- La administración conjunta de GH y de glucocorticoide elevó significativamente el nivel de LAGS. Por ello, podía concluirse que ambas hormonas actuaban sinérgicamente regulando la expresión de LAGS.
- La administración de GH, hormonas tiroideas y glucocorticoide abatía la expresión de LAGS, de manera que su nivel volvía a ser muy bajo.

El efecto comentado en último lugar, no dejaba de ser paradójico. Por una parte, se sabía que los glucocorticoides participaban coordinadamente en la regulación del LAGS. Por otra parte, se sabía que la administración de GH a ratas hipotiroideas

también elevaba esta concentración. Por último, la GH y los glucocorticoides ejercían un efecto sinérgico en la expresión de LAGS en ratas hipofisectomizadas. Así pues, si las tres hormonas parecían tener un efecto estimulador de la expresión de LAGS, entonces ¿por qué las hormonas tiroideas y la GH se comportaban como antagonistas cuando se administraban conjuntamente?

Un caso similar de antagonismo entre las hormonas tiroideas y la GH había sido publicado recientemente, y hacía referencia a la regulación de la expresión del IGF-I. A dosis fisiológicas de  $T_4$ , ésta y la GH se comportaban como agonistas. Cuando se les administraba a las ratas una dosis suprafisiológica de  $T_3$ , se producía una importante inhibición de la expresión (Wolf et al.; 1989).

Puesto que la dosis de hormonas tiroideas usadas por nosotros ( $2,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) podía ser la responsable de este efecto antagónico, se decidió realizar el siguiente experimento que, dada su complejidad, se comentará de una forma detallada:

- Se utilizaron 50 ratas hipofisectomizadas. Todas ellas fueron tratadas con una dosis diaria de acetato de corticosterona ( $1 \text{ mg}/100 \text{ g.}$ ) durante 7 días.
- De estas cincuenta ratas, 25 se trataron con GH ( $100 \mu\text{g}/\text{día}$ , repartidos en tres dosis), y las otras 25 recibieron vehículo.
- Tanto las 25 ratas tratadas con GH como las tratadas con vehículo, se subdividieron en grupos de 5, que fueron tratadas con un rango de concentración de  $T_3$ , desde 0 hasta  $2,5 \mu\text{g}/100 \text{ g.}$  de peso.
- Los animales fueron tratados en estas condiciones durante una semana, y

fueron sacrificados en la mañana del octavo día, unas ocho horas después de la última inyección de GH.

Los resultados de este experimento pueden sumarse en los siguientes:

- En ausencia de GH, las dosis bajas de  $T_3$  carecieron de efecto inductor alguno. Este sólo pudo ser observado con dosis de  $T_3$  iguales a superiores a  $2,5 \mu\text{g}/100 \text{ g.}$  de peso.
- En presencia de GH, las dosis bajas de  $T_3$  demostraron poseer efecto estimulante de la inducción, mientras que las dosis iguales o superiores a  $0,5 \mu\text{g}/100 \text{ g.}$  demostraron capacidad para antagonizar el efecto estimulante de la GH.

Estos resultados inducen a pensar que los glucocorticoides, las hormonas tiroideas y la GH, en condiciones fisiológicas, actúan sinérgicamente, regulando la expresión de LAGS. Por el contrario, un exceso de  $T_3$  en presencia de GH, tendría un efecto frenador (Chirino et al. 1994). Un caso similar ocurre con la expresión hepática del IGF-I, tal y como fue comentado anteriormente.

#### 1.4.5 PARTICIPACION DE OTRAS HORMONAS EN LA REGULACION ENDOCRINA DEL LAGS.

Además de la regulación endocrina anteriormente comentada, se han llevado a cabo por nuestro Laboratorio otras investigaciones conducentes a desentrañar el papel que otras hormonas puedan tener en la expresión de LAGS.

Un candidato que se consideró de interés estudiar fue el IGF-I. Este factor es producido por el hígado bajo la influencia de la GH, de las hormonas tiroideas y los glucocorticoides. Puesto que, tanto su ontogenia como su regulación endocrina es similar a la exhibida por el LAGS, nos planteamos estudiar si no sería el IGF-I la vía final común en la regulación del LAGS. Para ello, decidimos estudiar la expresión de LAGS en dos situaciones en las que la expresión de IGF-I está muy disminuía, sin menoscabo de la secreción de GH, glucocorticoides u hormonas tiroideas. Las situaciones elegidas fueron el ayuno y la diabetes.

- El ayuno de 24 horas acarrea un importante déficit de secreción de IGF-I. No obstante, el nivel de LAGS en los animales que se mantuvieron en ayunas por 48 horas sólo descendió ligeramente con respecto al grupo alimentado.
- La diabetes inducida por estreptozotocina causa una importante disminución de la secreción hepática de IGF-I. En nuestra experimentación, los animales diabéticos presentaban unos niveles normales de LAGS.

Estos dos hallazgos aquí comentados, nos inducen a creer que el IGF-I carece de participación en la expresión de LAGS; por ello, parece plausible suponer que el efecto de la GH, glucocorticoides y hormonas tiroideas es un efecto directo, en el que no parece intervenir ningún mediador.

Otro aspecto que también se investigó fue el posible efecto inductor de diversos esteroides en la expresión de LAGS. El modelo inicial utilizado fue la rata recién destetada. Estos animales fueron tratados con altas dosis de diversos esteroides



pertenecientes a todas las categorías hormonales. Ninguno de ellos, a excepción del estradiol, demostró capacidad inductora.

Este efecto inductor del estradiol a dosis altas (1 mg/100 g. de peso), pudo ponerse de manifiesto, no sólo en ratas inmaduras, sino también en ratas hipotiroideas e hipofisectomizadas, lo que induce a pensar en un efecto directo de este esteroide sobre el hígado, e independiente del status endocrino del animal (Chirino et al. 1992). Más recientemente, ha podido demostrarse que el efecto estimulante del estradiol es una característica común a todos los estrógenos ensayados, y requiere altas dosis del esteroide y al menos tres días de tratamiento para poderse poner de manifiesto (Fernández et al. 1994b).

# PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Los experimentos sobre regulación endocrina del LAGS se habían desarrollado en ratas Sprague-Dawley. Mediante el uso de diversas manipulaciones endocrinas, y de distintos tratamientos hormonales, pudo llegarse a demostrar qué hormonas participaban en su regulación. Sin embargo, tanto la rata hipotiroidea como la hipofisectomizada presentaban más de un déficit hormonal; así la rata hipotiroidea era no sólo deficiente en hormonas tiroideas, sino también en GH, y la rata hipofisectomizada presentaba además déficit de glucocorticoides, amén de otras hormonas.

De lo anteriormente comentado, resulta evidente que estos modelos utilizados, si bien permitieron desentrañar la regulación endocrina, no permitían evaluar el efecto que tenían estas hormonas por separado, o su influencia en otros aspectos de la regulación de los LAGS tales como su ontogenia. Por tales motivos, se plantearon los objetivos del presente trabajo, y que pueden esquematizarse en los siguientes:

- 1.- Delimitar el papel aislado que desarrollan la GH y las hormonas tiroideas en la regulación de la expresión de los LAGS. Para ello, debían realizarse estudios en otros modelos animales, distintos a los anteriores comentados, tales como la rata enana, que presenta un déficit aislado de GH.
- 2.- Estudiar la expresión de LAGS en ratas hembra de otras razas, al objeto de estudiar si también exhibían una expresión tan variable de LAGS o, por el

contrario, presentaban unos niveles más homogéneos.

- 3.- Investigar la posible existencia de un dimorfismo sexual en el control de la expresión de LAGS y, caso de haberlo, investigar las causas del mismo.
  
- 4.- Investigar la expresión de LAGS en diversos modelos experimentales conjuntamente con otros parámetros de interés que pudieran influir en dicha expresión.

# MATERIAL Y METODOS

### 3.1. REACTIVOS.

Los radioligandos empleados fueron:

- [<sup>3</sup>H] Dexametasona (Actividad específica = 35-50 Ci/mmol) (New England Nuclear, Boston, MA).
- [<sup>3</sup>H] Estradiol (Actividad específica = 96 Ci/mmol) (New England Nuclear, Boston, MA).
- <sup>125</sup>I-Estradiol, para radioinmunoensayo. (Coat-A-Count, Los Angeles, CA).

El líquido de centelleo usado fue:

- Fórmula 989 (NEN, Boston, MA) para la [<sup>3</sup>H] Dexametasona.
- Hisafe II (LKB, Pharmacia) para el [<sup>3</sup>H] Estradiol.

La hormona de crecimiento humana fue gentilmente donada por los laboratorios Serono (Milán, Italia).

El resto de los reactivos mencionados en esta memoria eran de grado analítico y al igual que el resto de las hormonas, fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri).

### 3.2. ANIMALES.

#### 3.2.1 CONDICIONES GENERALES.

Para el desarrollo de los experimentos incluidos en esta memoria, se utilizaron ratas de ambos sexos de la especie *Rattus Norvegicus*, variedad albina, razas Sprague-

Dawley, Wistar, Lewis y mutante enana derivada de Lewis, criadas en el Animalario del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de G.C. Los animales fueron criados con sus respectivas madres hasta los 22 días de edad. A partir de esta fecha fueron separados por sexos y se alimentaron con dieta especial para ratas (Letica) y agua "ad libitum". Se mantuvieron en condiciones controladas, tanto de temperatura (22° C) como de luz (ciclos de 12 horas luz-oscuridad).

Las ratas fueron usadas en diferentes estadios de su vida, clasificándose en grupos según la edad en el momento de comenzar los diferentes experimentos. El sacrificio de los animales se realizó por decapitación.

### 3.2.2 ANESTESIA.

Cuando se realizó alguna intervención quirúrgica en animales de 10 ó más días de edad, fueron anestesiados bajo una atmósfera saturada de éter etílico. En animales de menos de 10 días de edad la anestesia se llevó a cabo mediante hipotermia sobre una superficie de hielo.

### 3.1.3 MANIPULACIÓN DE ANIMALES.

El estado hipotiroideo fue logrado mediante la administración en el agua de bebida de propiltiouracilo (PTU) al 0.05% durante al menos 21 días.

La ovariectomía se realizó por la ruta dorsal, mediante una incisión lateral longitudinal de piel y músculos sobre la fosa renal, tras los cual se aborda la

cavidad retroperitoneal y de ella se extrae a través del corte en músculo y piel el ovario y parte de la trompa, que se liga y posteriormente se corta su extremo ovárico extrayéndose el ovario, grasa periovárica y una pequeña parte de la trompa. Por último, se suturan por planos músculo (con sutura reabsorbible) y piel (con agrafes metálicos los animales de más de 20 días y con sutura reabsorbible los de menor edad).

La orquidectomía en animales de 10 ó más días, fue realizada por la vía escrotal. En primer lugar se corta el escroto y a continuación el peritoneo, y mediante una ligera presión sobre el abdomen los testículos salen al exterior por el lugar del corte; a continuación, la arteria y vena espermáticas y el conducto deferente son ligados y cortados por su extremo testicular, con lo que el testículo y el epidídimo quedan separados y se retiran. El cierre se realiza por planos, primero se cierra el peritoneo con catgut y a continuación la piel del escroto con agrafes metálicos o sutura reabsorbible en los animales de menor edad.

En el caso de los animales de menos de 10 días, la orquidectomía se realizó por la vía abdominal, usando la técnica descrita por Pfeiffer, mediante un corte transversal infraumbilical para acceder a la cavidad abdominal, de donde se extraen los testículos y se separan mediante un corte de sus anclajes anatómicos. El cierre se realiza en un solo plano con sutura reabsorbible.

A determinados grupos experimentales se les implantó una cápsula de silastic (marca Dow Corning, modelo Medical Grade Tubing), de 2.5 cm de longitud y

0.062 pulgadas de diámetro interno y 0.125 pulgadas de diámetro externo. El cierre de las cápsulas se consiguió con adhesivo de silicona Tipo A de la misma marca.

### **3.2.4 ADMINISTRACIÓN DE HORMONAS.**

Todas las hormonas fueron administradas por vía subcutánea. Su pauta de administración y la duración de los tratamientos se especifican en la sección de Resultados. Los esteroides fueron disueltos en aceite vegetal (Corn Oil, Sigma). La  $T_3$  fue disuelta en 0.1 N de NaOH a una concentración de 2 mg/ml y en el momento de la inyección se diluyó en solución salina. La Hormona de Crecimiento fue disuelta en solución salina. Los animales control recibieron aceite vegetal o solución salina, según los casos. Los implantes de las cápsulas se realizaron por vía subcutánea en el tercio superior del dorso de las ratas.

### **3.3. TAMPONES.**

Los tampones usados para el procesamiento de las muestras fueron:

- Tampón TMMDS: 50 mM de Tris-ClH, 10 mM de Molibdato sódico, 5 mM de Cloruro magnésico, 2 mM de Ditiotretitol y 0.25 M de Sacarosa, pH: 7.5.
- Tampón TE: 10 mM de Tris-ClH y 1.5 mM de EDTA, pH: 7.5.

### **3.4. EXTRACCIÓN DEL TEJIDO.**

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Sus hígados fueron rápidamente extraídos, lavados en solución salina helada, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C hasta el día de la experimentación. El tiempo de almacenamiento nunca excedió de las dos semanas, aunque tiempos de almacenamiento superiores no provocaron ninguna modificación de los parámetros aquí estudiados. Por tal motivo, y dada la comodidad de su uso, se utilizó este sistema de forma rutinaria, especialmente cuando el número de ratas a procesar era elevado.

### **3.5. FRACCIONAMIENTO CELULAR: OBTENCIÓN DE CITOSOL Y MICROSOMAS.**

Todo el proceso se llevó a cabo a 0-4 °C. Las muestras de hígado fueron descongeladas y homogeneizadas en cinco volúmenes de tampón TMMDS utilizando un homogenizador del tipo Potter-Elvehjem teflón-vidrio (B. Braum, Melsungen, Alemania). Los homogeneizados así obtenidos fueron centrifugados a 13.000 x g durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5, utilizando para ello un rotor de ángulo fijo modelo SE-12, con el fin de precipitar los núcleos y las mitocondrias. Los sobrenadantes obtenidos tras esta centrifugación fueron nuevamente centrifugados, ahora a 105.000 x g durante 60 minutos en una ultracentrífuga Beckman L-7 y utilizando para ello un rotor de ángulo fijo modelo 70

Ti. Los sobrenadantes de esta centrifugación (citosoles) fueron cuidadosamente aspirados de cada tubo con la ayuda de una pipeta Pasteur para así eliminar la capa de lipoproteínas sobrenadantes. Una vez tomado un volumen adecuado de citosol, los tubos se invertían con el fin de eliminar el citosol remanente. El precipitado se reconstituía en cinco volúmenes de tampón TMMDS frío y nuevamente se centrifugaba a 105.000 x g durante 60 minutos. El sedimento de esta última centrifugación se resuspendía en TMMDS frío, y en un volumen tal que la concentración final de proteínas fuera de 2-4 mg/mL. Esta suspensión microsomal fue la utilizada para ensayos de intercambio con hormona radiactiva y la consecuente cuantificación de LAGS.

### **3.6. ENSAYO DE RG CITOSÓLICO Y DE LAGS MICROSOMALES.**

Se incubaron alícuotas de citosol o microsomas (100  $\mu$ L en ambos casos) con [ $^3$ H]Dexametasona disuelta en tampón TMMDS durante 18 horas a 0-4 °C. La concentración final de la Dexametasona radiactiva fue de 10 a 150 nM para las muestras de microsomas y de 0.5 a 50 nM para las muestras de citosol. En estos tubos se medía la unión total del ligando a los LAGS y al RG. De forma paralela, se realizaban series conteniendo, además del esteroide tritiado, un exceso de 200 veces de esteroide frío (no radiactivo), al objeto de determinar la fijación no específica. Al final de la incubación, cada tubo recibió 200  $\mu$ L de una suspensión de Carbón activo con Dextran-T70 (DCC) en tampón TMMDS, de manera que la concentración final de ambos fue de 0.8 y 0.08% respectivamente. Rápidamente

los tubos se agitaban y permanecían incubándose en frío durante 10 minutos, posteriormente se centrifugaban a 3.000 x g durante 10 minutos en la centrífuga Sorvall RC-5 utilizando un rotor horizontal modelo HS-4 con el fin de sedimentar el DCC. Del sobrenadante se tomaban alícuotas que se mezclaban en un vial con el líquido de centelleo (Fórmula 989), se agitaban, se dejaban estabilizar durante dos horas y por último se contaban en un Contador de Centelleo (Liquid Scintillation Analysis, Packard 2500 TR).

En el caso de muestras procedentes de ratas que habían sido tratadas con algún esteroide, tanto los citosoles como los microsomas, fueron pretratadas con DCC antes de la incubación con [<sup>3</sup>H] Dexametasona, con el fin de disminuir al máximo la concentración de hormona en la muestra, ya que, evidentemente, su presencia podía dar lugar a interferencias con el ensayo de intercambio.

### **3.7. ENSAYO DE RE.**

Todo el método se realiza a una temperatura de 0-4 °C. A cada muestra de citosol se le añade, en agitación constante, la mitad de su volumen de una solución saturada de Sulfato Amónico en tampón TE helado, lo cual da una saturación final de sulfato amónico del 33%. Esta solución de citosol con sulfato amónico se mantiene en agitación constante y a 0-4 °C durante 45 minutos. Luego se centrifuga a 14.000 x g durante 15 minutos, usando para ello una centrífuga

refrigerada marca Beckman modelo GS-15R y un rotor de ángulo fijo modelo F 2402. A continuación, se desechan los sobrenadantes de la centrifugación anterior y el precipitado se resuspende en tampón TE y en un volumen tres veces menor que el volumen de citosol original. Estas muestras ya se usan para el ensayo de intercambio.

Para este ensayo de intercambio, se incubaron alícuotas de estos citosoles (100  $\mu$ L) con [<sup>3</sup>H] Estradiol disuelto en tampón TE y en presencia de 0.1% de albúmina, durante 18 horas a 0-4 °C. La concentración final del Estradiol radiactivo fue de 0.5 a 10 nM. En estos tubos se medía la unión total del RE al [<sup>3</sup>H] Estradiol. De forma paralela, se realizaron series conteniendo, además del esteroide tritiado, un exceso de 200 veces de esteroide frío (no radiactivo), al objeto de determinar la fijación no específica. Al final de la incubación, cada tubo recibió 200  $\mu$ L de una suspensión de Carbón activo con Dextran-T70 (DCC) en tampón TE, de manera que la concentración final de ambos fue 0.5 y 0.05% respectivamente. Rápidamente, los tubos se agitaron y permanecieron incubándose en frío durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 minutos en la centrífuga Sorvall RC-5 utilizando un rotor horizontal modelo HS-4 con el fin de sedimentar el DCC. Del sobrenadante se tomaban alícuotas que se mezclaban en un vial con el líquido de centelleo (Hisafe II). Se agitaban, se dejaban estabilizar durante dos horas y por último se contaban en el Contador de Centelleo.

Cuando las muestras procedían de ratas que habían sido tratadas con algún

esteroide, fueron pretratadas con DCC (0.8 y 0.08 % final) antes de la precipitación con sulfato amónico, con el fin de reducir lo más posible la concentración de hormona de la muestra.

### **3.8. DETERMINACIÓN DE ESTRADIOL SÉRICO POR RIA.**

Los niveles plasmáticos de Estradiol se midieron usando un *kit* comercial (Coat-A-Count Estradiol, Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, CA) de alta especificidad para estradiol en suero de rata. Las muestras se obtuvieron por centrifugación de sangre venosa coagulada, para así obtener el suero. El límite inferior de detección de este sistema era de 8 pg/mL y se basaba en la competición del estradiol de las muestras con el estradiol radiactivo por un anticuerpo unido a la fase sólida. La realización práctica se hizo siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **3.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.**

La determinación de proteínas se realizó siguiendo el método de Lowry et al. (1951).

### **3.9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÁXIMA DE SITIOS DE UNIÓN (Bmax) Y DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN (Kd).**

Ambos parámetros se calcularon según el Análisis de Scatchard (1949), que aún sigue siendo el método más usado para el estudio de la interacción hormona-receptor.

### **3.10. ESTUDIO ESTADÍSTICO.**

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó mediante el programa de ordenador InStat (GraphPad Software). El estudio comparativo de los resultados obtenidos entre más de dos grupos de experimentación, se llevó a cabo mediante análisis de la varianza (test ANOVA). Las comparaciones entre dos muestras, a partir de los resultados obtenidos con el test ANOVA, se realizaron mediante el test de Student-Newman-Keuls. Cuando se compararon tan sólo dos grupos, se usó el test *t* de Student. La significación estadística sólo se consideró como positiva cuando fue obtenida una  $p < 0.05$  o inferior.

# RESULTADOS

#### **4.1. ONTOGENIA DEL LAGS.**

De lo expuesto en la Introducción de esta memoria, resulta evidente que la GH participa, junto con los glucocorticoides y las hormonas tiroideas en la regulación endocrina del LAGS. Esta regulación pudo ponerse de manifiesto utilizando fundamentalmente ratas hipotiroideas (que presentan un importante déficit de secreción, tanto de hormonas tiroideas como de GH) y ratas hipofisectomizadas (que presentan déficit de secreción de las dos hormonas anteriormente comentadas, además de hormonas sexuales y prolactina). Estos modelos experimentales, aunque valiosos, presentaban un grave inconveniente: en ninguno de ellos existía un déficit aislado de secreción, tanto de GH como de hormonas tiroideas, por lo cual era sumamente difícil aventurar, el papel que jugaban cada una de estas hormonas por separado.

Una posible solución a este inconveniente surgió de la introducción en nuestra investigación de un modelo animal recientemente descrito, caracterizado por una mutación en ratas de la cepa Lewis, que manifiesta un déficit aislado de GH, mientras que el resto de los parámetros endocrinos se hallan dentro del rango de la normalidad (Charlton et al, 1.988). Estas ratas, denominadas Lewis Dwarf (enanitas), presentan un tamaño y un peso que equivale aproximadamente a la mitad de los exhibidos por sus congéneres normales.

Puesto que las ratas Lewis enanas sólo presentan un déficit aislado de secreción de GH, consideramos de interés estudiar la expresión de LAGS en esta cepa, y

comparar esos valores con los mostrados por ratas Lewis intactas, ya que ello nos permitiría ahondar en el papel específico de la GH en la regulación del LAGS. A tal efecto, se diseñó el siguiente experimento, en el que se midió la concentración de LAGS en ratas Lewis y Lewis enanas a lo largo de la vida del animal, desde el nacimiento hasta los seis meses de edad. A efectos comparativos, también se incluyeron en este experimento ratas Sprague-Dawley.

Los resultados están resumidos en la Figura 1. En ella se puede apreciar que en las tres cepas estudiadas (Sprague-Dawley, Lewis y Lewis enanas), la expresión de LAGS presenta una ontogenia similar, siendo su nivel prácticamente indetectable antes de las cuatro semanas de vida, para luego comenzar a ascender y alcanzar un pico entre los 2 y 3 meses. Tras esto, los niveles comienzan a decaer lentamente. Estos resultados permiten concluir que la GH no parece ser la responsable de las fluctuaciones en la concentración de LAGS a lo largo de la vida.

Sin embargo, los resultados de este experimento ponen de manifiesto las grandes diferencias de concentración de LAGS entre las ratas Lewis y las ratas Lewis enanas. Así, a los tres meses de edad, la concentración de LAGS en las ratas Lewis es casi tres veces superior a la exhibida por las ratas enanas ( $p < 0.01$ ). Puesto que los parámetros endocrinos, a excepción de la secreción de GH, son normales en la rata enana, resulta fácil concluir que la GH, si bien no parece influir en la ontogenia del LAGS, sí que resulta indispensable para que éstos alcancen la concentración expresada en la cepa Lewis.

Un último hallazgo obtenido en este experimento y que resulta interesante comentar, es la diferencia de concentración de LAGS existente entre las ratas Lewis y Sprague-Dawley. Así, a los tres meses de edad, la concentración de LAGS en la cepa Lewis es casi el doble que la exhibida por las ratas Sprague-Dawley ( $p < 0.05$ ). La razón de esta diferencia es, por ahora, desconocida.

Paralelamente a la determinación de LAGS, se hizo la cuantificación de RG en los mismos grupos de animales. Tal y como cabía esperar, no se objetivaron diferencias en la concentración de RG, ni a lo largo del intervalo de edad estudiado, ni en relación con la cepa estudiada (datos no mostrados).

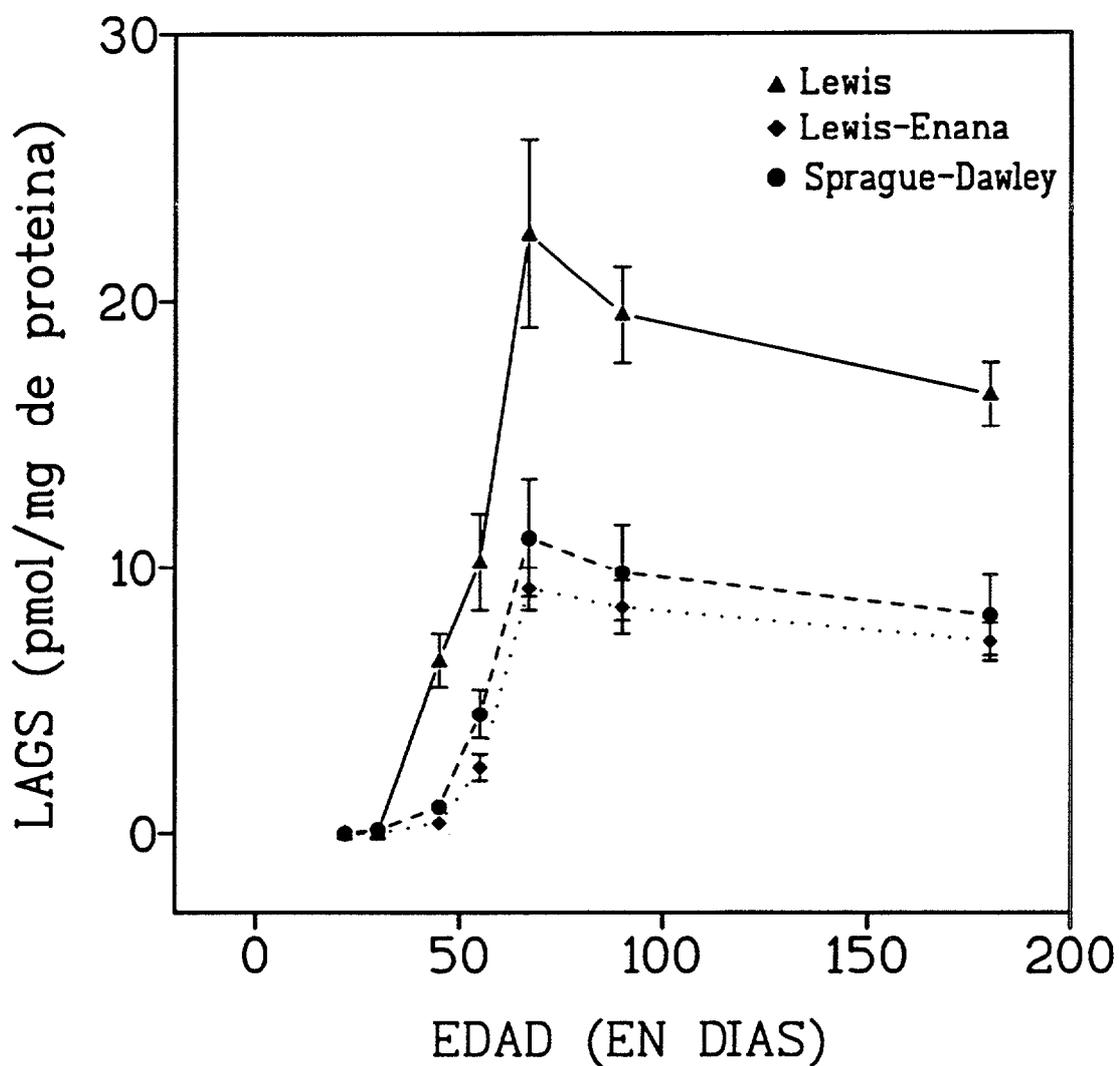


Figura 1. Ontogenia de LAGS en ratas macho de las cepas Lewis, Lewis enana y Sprague-Dawley. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

#### 4.2. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE hGH SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE LAGS EN LA RATA LEWIS ENANA.

Al estudiar la ontogenia del LAGS en las cepas Lewis y Lewis enana, habíamos observado que los machos enanos expresaban unos niveles de LAGS que eran aproximadamente un 40% de aquellos mostrados por los machos Lewis normales. La única diferencia que parece existir entre ambas cepas radica en los niveles de producción y secreción de la GH, pues en las ratas enanas el nivel plasmático de esta hormona es tan sólo un 5% del exhibido por las rats Lewis no enanas.

Por ello, podía suponerse *a priori* que era este déficit de GH el causante de la baja expresión de LAGS. Para demostrar tal posibilidad, se realizó el siguiente experimento, en el cual grupos de ratas macho Lewis enanas fueron tratados durante una semana con diferentes dosis de hGH, desde 0 (grupo control) hasta 150  $\mu\text{g}/\text{día}$ , repartidos en tres dosis diarias, lo cual está descrito por diversos autores como "patrón masculino" de administración de GH, en contraposición al suministro continuado de GH mediante implante de bombas osmóticas o "patrón femenino" (Mode et al., 1.982; Jansson et al., 1.985). Las ratas fueron sacrificadas ocho horas después de la última administración de hGH.

Los resultados de este experimento se recogen en la Figura 2. Tal y como puede observarse, la administración de hGH elevó significativamente la concentración de LAGS de una forma lineal en función de la dosis administrada. Aunque con la dosis

### *Resultados*

más alta de hGH usada nunca se llegó a obtener los niveles de LAGS expresados por los machos Lewis no enanos, el trazado ascendente de la curva induce a pensar que sí se aumenta la dosis de hGH o el tiempo de su administración, los niveles entre ambas cepas tenderían a igualarse.

Tomados los resultados de este experimento en conjunto con los del anterior, parece razonable concluir que la GH, si bien no parece influir en la ontogenia del LAGS, sí que resulta imprescindible para que éste alcance una concentración similar en las cepas Lewis y Lewis enana.

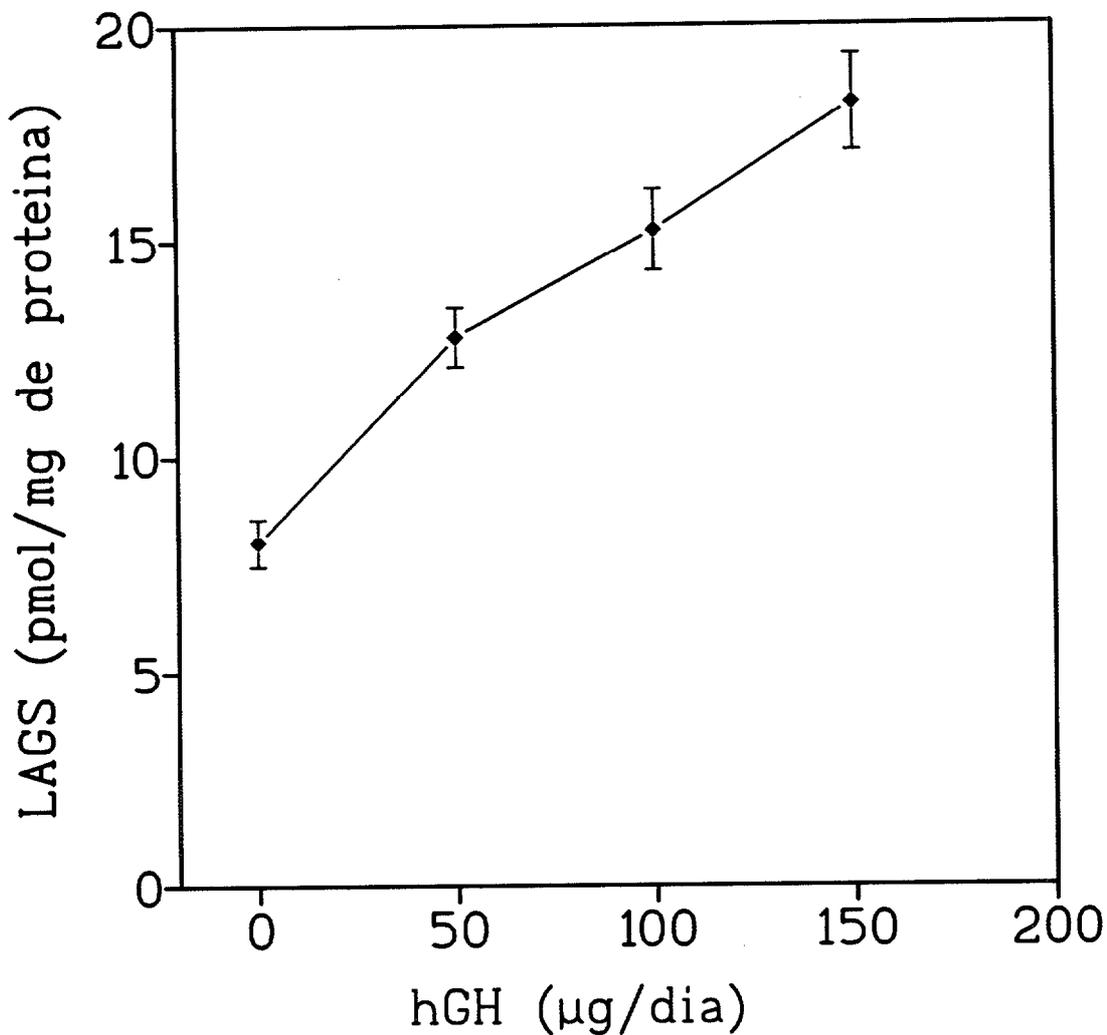


Figura 2. Curva dosis respuesta de la expresión de LAGS por hGH en ratas macho Lewis enanas de 2-3 meses de edad. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

### **4.3. EFECTO DE DIVERSOS TRATAMIENTOS ENDOCRINOS SOBRE LA EXPRESION DE LAGS EN RATAS LEWIS Y LEWIS ENANAS HIPOTIROIDEAS.**

De los resultados del experimento anterior, y merced al uso de una cepa de ratas deficiente en GH, pudo vislumbrarse el efecto aislado que esta hormona ejercía sobre la expresión de LAGS. Sin embargo, la investigación con estas ratas aún podía ser de utilidad para esclarecer el papel de otras hormonas, concretamente, las hormonas tiroideas. Conocido ya el papel de la GH, el desarrollo de hipotiroidismo en estos animales podría hacernos profundizar en el papel aislado de las hormonas tiroideas.

Por ello nos planteamos el siguiente experimento, en el que ratas macho adultas de la cepa Lewis enana se hicieron hipotiroideas mediante la administración de Propiltiouracilo (PTU) en el agua de bebida, a una concentración de 0.5 g / litro. El PTU, es un potente inhibidor, tanto de la síntesis de hormonas tiroideas como de la conversión periférica de  $T_4$  en  $T_3$  (Nunez, 1.988; Visser, 1.988), de manera que con el uso de este fármaco se origina un estado hipotiroideo similar al que se obtiene por medio de la ablación quirúrgica del tiroides.

El PTU, fue administrado durante cuatro semanas, salvo en el caso de un grupo que fue sacrificado a las tres semanas para comprobar que el efecto del PTU era el esperado. De los grupos restantes, excepto un grupo control, todos los demás

recibieron algún tratamiento hormonal sustitutorio durante la última semana de tratamiento con PTU.

Los tratamientos hormonales consistieron en: hGH (100  $\mu\text{g}$ /rata/día, repartidos en tres dosis),  $T_3$  a dos dosis diferentes (0,1 o 2,5  $\mu\text{g}$ /100 g peso/día), y la combinación de hGH más las dosis ya especificadas de  $T_3$ . Cada grupo de experimentación contó con los adecuados controles, que sólo recibieron el vehículo apropiado.

Los resultados de este experimento se pueden apreciar en la Figura 3. Destaca, en primer lugar, el intenso efecto que provoca el PTU sobre el nivel de LAGS en estas ratas Fig. 3a). Así, tras tres semanas de tratamiento su valor desciende a tan sólo un 10% del control ( $p < 0.001$ ), y a las cuatro semanas de tratamiento con PTU, estos valores son ya indetectables.

En este modelo animal, el tratamiento con hGH (Fig. 3b) fue capaz de elevar los niveles de LAGS de forma significativa ( $p < 0.01$ ). Esto ocurrió tanto en ausencia de  $T_3$  como en su presencia y con ambas dosis ensayadas. Por otra parte, el tratamiento aislado con  $T_3$ , a la dosis de 0,1  $\mu\text{g}$ /100 g./día, careció de efecto sobre la inducción de LAGS, pero la dosis de 2.5  $\mu\text{g}$ /100 g./día, logró no sólo restituir los niveles de LAGS, sino que incluso los duplicó con respecto al control, sin tratamiento con PTU ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, cuando se administró la  $T_3$  a esta dosis conjuntamente con la hGH, el nivel de LAGS descendió y se hizo similar al de las ratas intactas, no tratadas con PTU.

Todo esto parece indicar que los niveles de LAGS se mantienen gracias a una complicada interrelación entre las hormonas tiroideas y la GH, de manera que la dosis baja de  $T_3$  por sí misma no es capaz de elevar los niveles de LAGS y esto sólo ocurre si además se administra hGH, obteniéndose en este caso unos valores similares a los obtenidos al administrar sólo hGH. En cambio, cuando se administra dosis altas de  $T_3$  conjuntamente con hGH, ésta parece tener un cierto papel inhibitorio sobre el efecto originado por la  $T_3$ , pues se aprecia entre ambos grupos una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). El antagonismo observado entre la hGH y la  $T_3$ , cuando ésta última es ensayada a una alta dosis, confirma hallazgos precedentes realizados por nuestro laboratorio en ratas hipofisectomizadas (Chirino et al., 1994).

Paralelamente, se realizó un experimento similar usando como modelo animal la cepa Lewis. Los resultados están representados en las Figuras 3c y 3d. En ellas se aprecia en primer lugar cómo el efecto del PTU, aunque importante, no es tan dramático como el observado en las ratas enanas. Así, a las tres semanas de tratamiento con PTU, las ratas Lewis sólo exhibieron una reducción del 50% en los niveles de LAGS ( $p < 0.05$ ), y a las cuatro semanas, este descenso fue sólo del 70% ( $p < 0.01$ ), mientras que, como se recordará del experimento anterior, las ratas enanas en este tiempo presentaban unos niveles casi indetectables. La razón de esto tal vez debemos buscarla en el déficit tan acusado de secreción de GH que muestran las ratas enanas, lo cual hace que el efecto del PTU sobre la expresión de LAGS sea más intenso que en el caso de las ratas Lewis.

En estas ratas, la administración de T<sub>3</sub> a dosis bajas, fue capaz de elevar significativamente la concentración de LAGS ( $p < 0.05$ ). La combinación de esta dosis de T<sub>3</sub> con la hGH tuvo un efecto sinérgico, ya que la concentración de LAGS se incrementó significativamente con respecto al grupo tratado sólo con T<sub>3</sub>. Por otra parte, destaca cómo el efecto de la T<sub>3</sub> a dosis alta no origina una duplicación de los niveles de LAGS, lo que sí ocurría con la rata enana. Esto probablemente se deba a que esta dosis de T<sub>3</sub> provoca a su vez inducción de la secreción de GH (Martinolli y Pelletier, 1.989), la cual a su vez manifiesta así su efecto antagónico con las hormonas tiroideas sobre la expresión de LAGS.

En último lugar, es de destacar el diferente efecto que las dosis bajas de T<sub>3</sub> provocaron en la rata Lewis, en donde se observó un incremento significativo del nivel de LAGS, con respecto a las ratas Lewis enanas, en donde no provocó ningún efecto. Ello podría ser debido a la presencia de GH en las primeras, que potenciaría el efecto de las hormonas tiroideas.

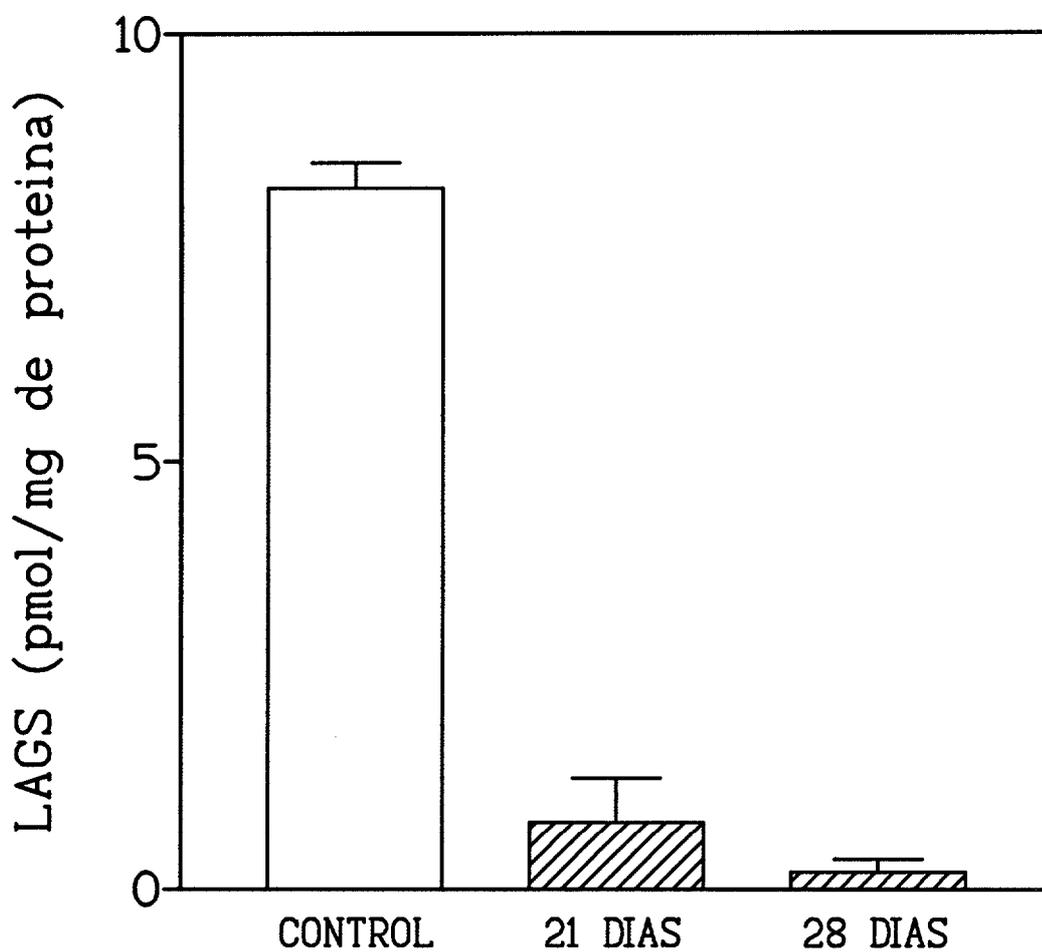


Figura 3a. Efecto del Hipotiroidismo sobre la expresión de LAGS en ratas macho Lewis enana. Cada barra representa la media  $\pm$  E.S. de al menos cinco experimentos individuales.

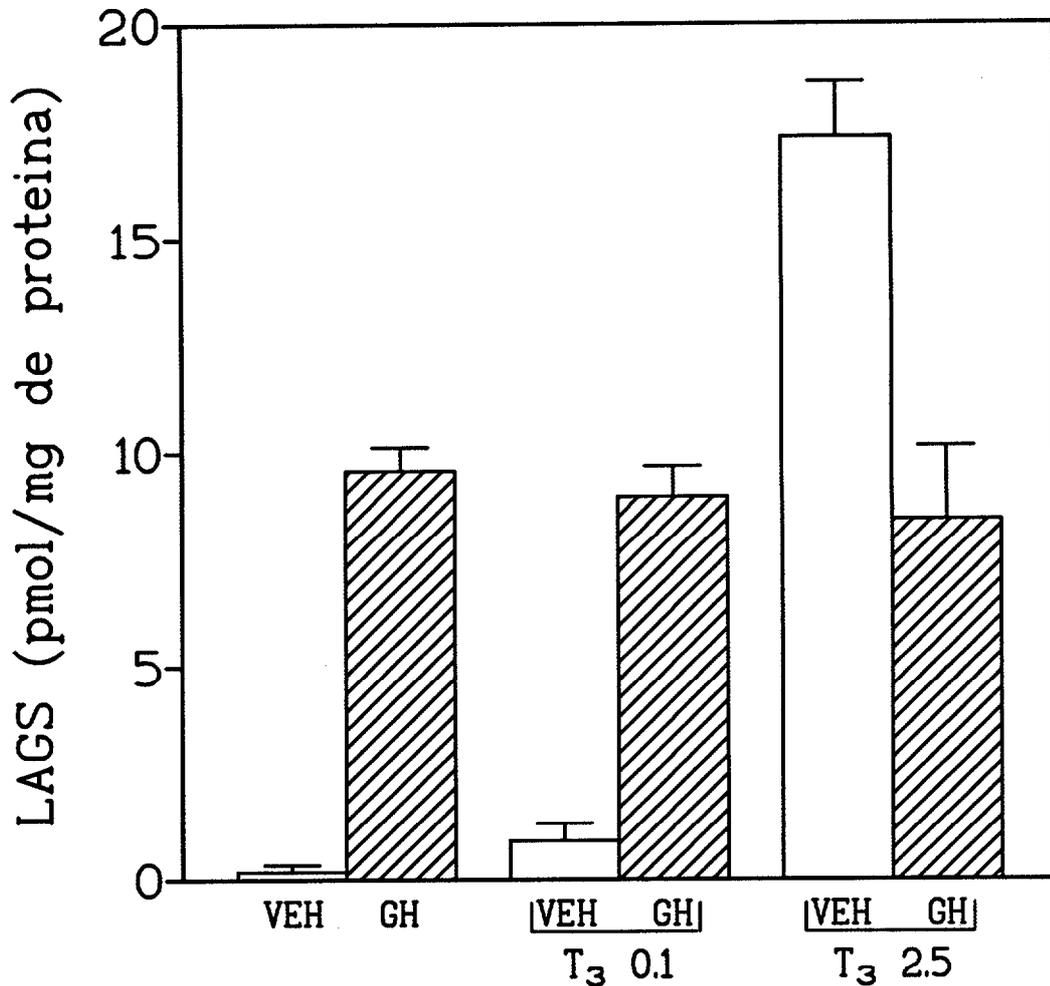


Figura 3b. Efecto de diversos tratamientos hormonales sobre el nivel de LAGS en ratas Lewis enanas hipotiroideas. Grupos de ratas Lewis enanas fueron tratadas durante la última semana en tratamiento con PTU con Hormona de Crecimiento (GH) y con Triiodotironina (T<sub>3</sub>) a las dosis especificadas. Cada barra representa la media  $\pm$  E.S. de al menos cinco experimentos individuales.

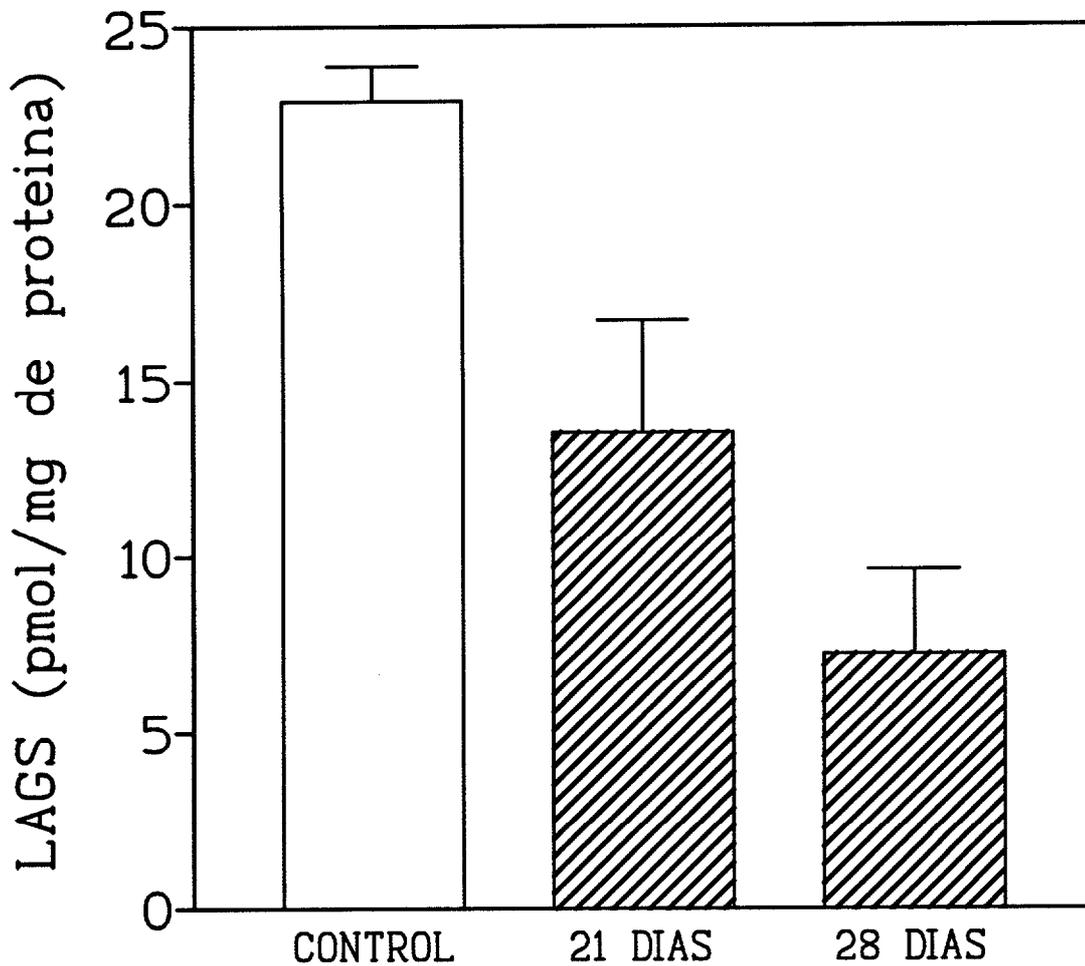


Figura 3c. Efecto del Hipotiroidismo sobre la expresión de LAGS en ratas macho Lewis. Grupos de ratas Lewis fueron tratadas con PTU durante los tiempos especificados. Cada barra representa la media  $\pm$  E.S. de al menos cinco experimentos individuales.

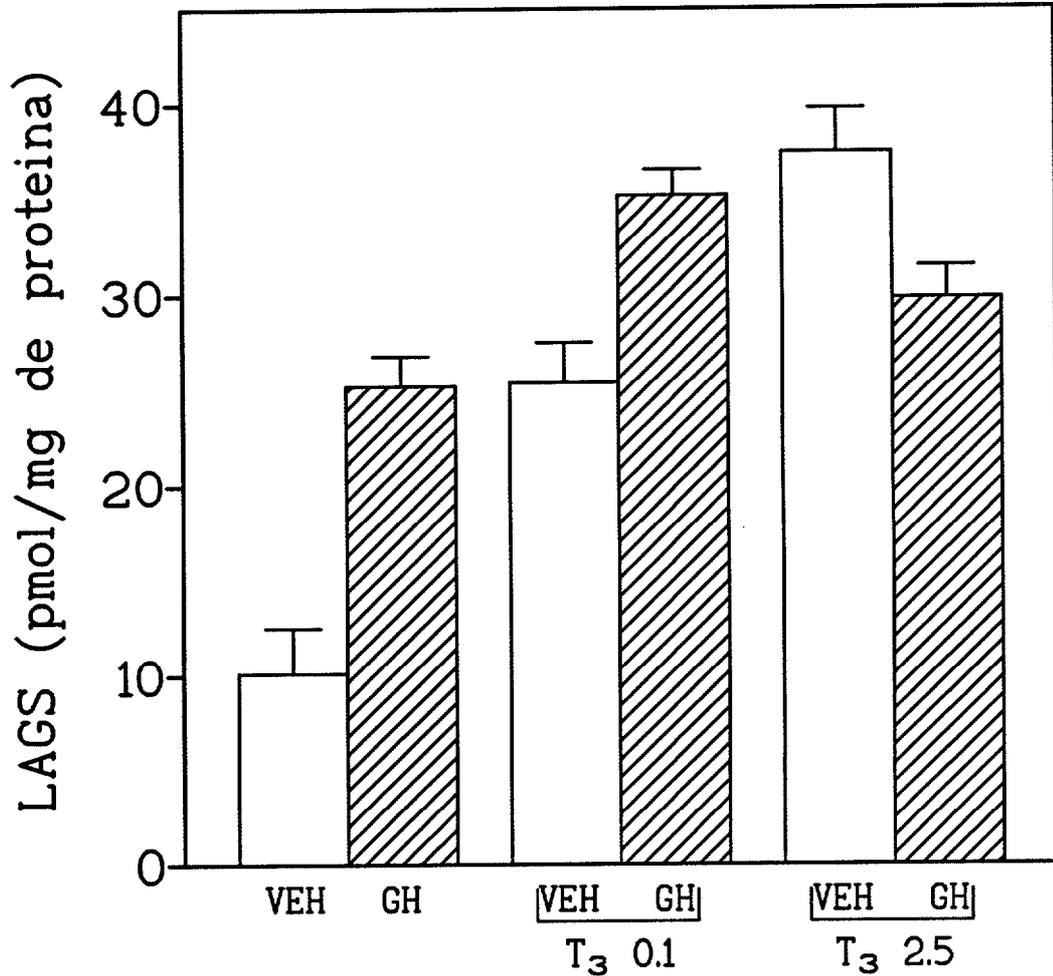


Figura 3d. Efecto de diversos tratamientos hormonales sobre la reposición de el LAGS en ratas Lewis hipotiroideas. Grupos de ratas Lewis fueron tratadas durante la última semana en tratamiento con PTU con Hormona de Crecimiento (GH) y con Triiodotironina (T<sub>3</sub>), a las dosis especificadas. Cada barra representa la media  $\pm$  E.S. de al menos cinco experimentos individuales.

#### **4.4. EXPRESIÓN DE LAGS EN MACHOS Y HEMBRAS DE DIFERENTES CEPAS.**

Conociendo los resultados de la ontogenia en los machos de las cepas Lewis y Sprague-Dawley, y habida cuenta de las importantes diferencias en relación a la concentración de LAGS entre estas dos cepas, decidimos investigar la expresión de LAGS en otra cepa también de amplia distribución en muchos laboratorios como es la cepa Wistar. Los resultados comparativos de la expresión de LAGS en ratas de tres meses de edad pertenecientes a las tres cepas, se muestran en la Figura 4. En ella puede observarse que, tanto la cepa Wistar como la Lewis presentan una concentración similar de LAGS, significativamente superior a la mostrada por la cepa Sprague-Dawley ( $P < 0.05$ ).

De experimentos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio, sabíamos que las ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, presentaban un comportamiento errático en cuanto a la expresión de LAGS, hasta tal punto que, mientras en un alto porcentaje de ellas la concentración de LAGS era muy baja o incluso nula, otras exhibían unos niveles que casi llegaban a alcanzar el valor normal exhibido por los machos adultos. Esta enorme variabilidad no podía ser explicada por cambios en algún estado fisiológico tal como el ciclo estral. No obstante, se consideró de interés estudiar si en las hembras de las otras cepas en estudio ocurría lo mismo. Por ello, se decidió hacer el siguiente experimento, en el que se estudió la concentración de LAGS en ratas hembra Sprague-Dawley, Wistar, Lewis y Lewis Dwarf de tres meses de edad.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 4. En ella puede observarse que en ninguna de las tres cepas estudiadas aparecen unos niveles de LAGS que puedan compararse con los de los machos. Las hembras Sprague-Dawley presentaron una expresión muy variable de LAGS, tal y como se comentó previamente. Sin embargo, las restantes cepas presentaron una concentración de LAGS bastante homogénea y que fue, en todos los animales estudiados, mínima o incluso indetectable.

Como cabía esperar, el estudio estadístico comparativo de machos y hembras de la misma cepa y de la misma edad arrojó siempre una alta significación estadística ( $P < 0.001$ ).

Los resultados tan dispares obtenidos con la expresión de LAGS entre ratas machos y hembras Lewis y Wistar, demuestran claramente la existencia de un dimorfismo sexual en la expresión de LAGS. Sin embargo, lo que ocurre con las hembras Sprague-Dawley no ha podido ser explicado satisfactoriamente, a pesar del considerable esfuerzo que se ha realizado. Tanto la menor concentración de LAGS en los machos Sprague-Dawley como la presencia errática en hembras continúa siendo una incógnita por resolver.

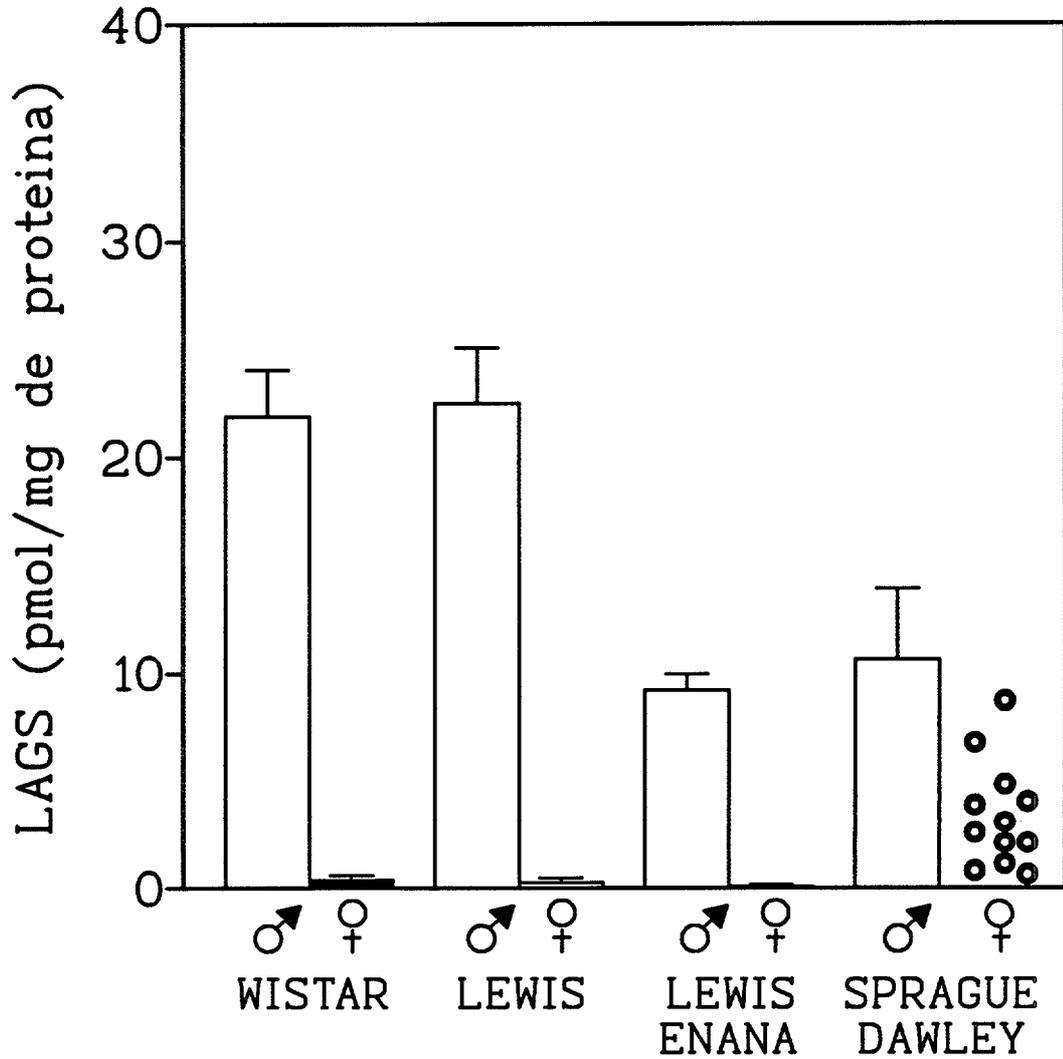


Figura 4. Expresión de LAGS en machos y hembras adultos de las cepas Wistar, Lewis, Lewis enana y Sprague-Dawley. Cada barra representa la media  $\pm$  E.S. de al menos seis experimentos individuales.

#### **4.5. ESTUDIO DEL DIMORFISMO SEXUAL EN LA EXPRESIÓN DE LAGS**

Tras los resultados del experimento anterior, parecía evidente que la expresión de LAGS estaba fuertemente influenciada por el sexo, al menos en las cepas Lewis y Wistar. Este patrón dimórfico de expresión no es en absoluto novedoso, ya que ha sido descrita la existencia de una cierta variedad de proteínas hepáticas que sólo son expresadas por uno de los dos sexos, por ejemplo, la  $\alpha_{2u}$ -globulina, que es específica del macho (Sippel et al., 1.975), o ciertas isoenzimas del citocromo P-450, que son expresadas por uno u otro sexo. (McClellan-Green et al., 1.989; Zaphiropoulos et al., 1.990), pero no por ambos a la vez.

El origen de este patrón dimórfico de expresión hay que buscarlo en el hipotálamo. Justo tras el nacimiento del animal, la impregnación hipotalámica por hormonas sexuales provoca profundos cambios en el patrón ulterior de secreción de algunas hormonas hipofisarias. En este sentido, baste recordar la marcada diferencia existente entre el patrón de secreción de las gonadotropinas hipofisarias entre el macho y la hembra. Otro patrón de secreción que también se altera es el de la GH. Esta hormona se segrega en el macho de una forma pulsátil, con picos de secreción cada 3-3.3 horas, lo que provoca enormes variaciones en la concentración plasmática de esta hormona. En la hembra por el contrario, la secreción de GH se realiza de una forma más continua, lo que hace que sus concentraciones plasmáticas no estén sujetas a tanta fluctuación y mantengan siempre unos niveles superiores a los del macho. Justamente, este dimorfismo

sexual en la secreción de GH ha sido involucrado en la expresión dependiente del sexo de ciertas proteínas hepáticas, tales como algunos citocromos P-450.

Desde hace tiempo se sabe que este dimorfismo sexual fisiológico puede alterarse artificialmente si se somete al animal a una gonadectomía en el momento del nacimiento y se le administra una solución "depot" de la hormona sexual del otro sexo (estradiol para machos, testosterona para hembras). En estas circunstancias, las hembras presentarían un patrón "masculino" de secreción de gonadotropinas y de GH, mientras que los machos exhibirían un patrón de secreción típicamente "femenino".

Por todo ello, decidimos realizar un experimento encaminado a generar un cambio del sexo hipotalámico, al objeto de tratar de modificar este patrón dimórfico de expresión de LAGS. Para este experimento se usaron ratas Lewis recién nacidas de ambos sexos que fueron operadas durante las primeras 24 horas de vida. Se establecieron tres grupos de animales por cada sexo, de manera que el primer grupo fue pseudogonadectomizado, y sirvió como grupo control. El segundo grupo fue gonadectomizado y al mismo tiempo fue tratado con una dosis alta de la hormona sexual contraria a su sexo (0.5 mg de Propionato de Testosterona/rata hembra; 0.15 mg de Propionato de Estradiol/rata macho, disueltos en propilenglicol). Al tercer grupo se le realizó también una gonadectomía bilateral y se le inyectó tan sólo el vehículo, a la misma dosis que el grupo anterior. Tras ésto, los animales fueron devueltos con sus madres para continuar su desarrollo.

El sacrificio y posterior cuantificación de los niveles de LAGS se realizó a los 67 días de vida. Sólo fueron aceptadas en el experimento aquellos animales que presentaban atrofia de próstata y vesículas seminales (caso de los machos), o ausencia de apertura vaginal y atrofia uterina severa (caso de las hembras).

Los resultados de este experimento se aprecian en la Figura 5 y de ella cabe destacar dos aspectos interesantes:

- En lo que respecta a las hembras, la gonadectomía fue capaz de producir un aumento de la expresión de LAGS en relación al grupo control ( $P < 0.001$ ), haciéndose su concentración similar a la observada en los machos gonadectomizados a la misma edad. Este tipo de respuesta no se vio adicionalmente influenciada por la inyección de Propionato de Testosterona, puesto que las ratas hembras gonadectomizadas y tratadas con esta hormona o con vehículo, presentaron unos niveles similares de LAGS.
- Con respecto a los resultados obtenidos en machos, la gonadectomía sola o en combinación con Benzoato de Estradiol no fue capaz de abatir el nivel de LAGS, sino que por el contrario los llegó a elevar aún más. ( $p < 0.05$ ). Este dato induce a pensar que la presencia de hormonas testiculares desde el momento del nacimiento impiden una mayor expresión de LAGS en la edad adulta. Aunque podemos presuponer que el cambio de sexo hipotalámico ocurrió, pues al comparar la ganancia de peso entre los machos ( $162 \pm 7$ ,  $n=7$ ) y las hembras ( $172 \pm 12$ ,  $n=9$ ) gonadectomizados y tratados con la hormona contraria a su sexo, no se apreciaron las diferencias

que normalmente se observarían entre machos y hembras intactos al llegar a esta edad (Somana et al., 1.978).

Los resultados anteriores demuestran que sí bien la GH parece necesaria para que la rata exprese unos niveles de LAGS altos, en cambio el modelo de secreción de esta, ya sea según un patrón masculino o femenino, no influye de manera importante en el hecho en sí de la mayor o menor expresión. Este dato corrobora experimentos previos realizados en ratas Sprague-Dawley, donde la administración de hGh mediante bombas osmóticas o por tres dosis diarias produjeron niveles de LAGS similares (datos no mostrados).

Descartada la importancia de un determinado patrón de secreción de GH a la hora de expresar más o menos cantidad de LAGS, centramos nuestra atención en la influencia de la ovariectomía, pues es otra variable introducida en este experimento y a la que cabe atribuir el efecto encontrado. Conocíamos que esta manipulación realizada al nacimiento era capaz de hacer que las hembras expresasen LAGS en cantidad similar a la de los machos gonadectomizados, pero lógicamente nos preguntamos si este efecto era reproducible sólo si se realizaba antes de las 24 horas de vida o por el contrario, podía seguirse observando en etapas más tardías de la vida del animal.

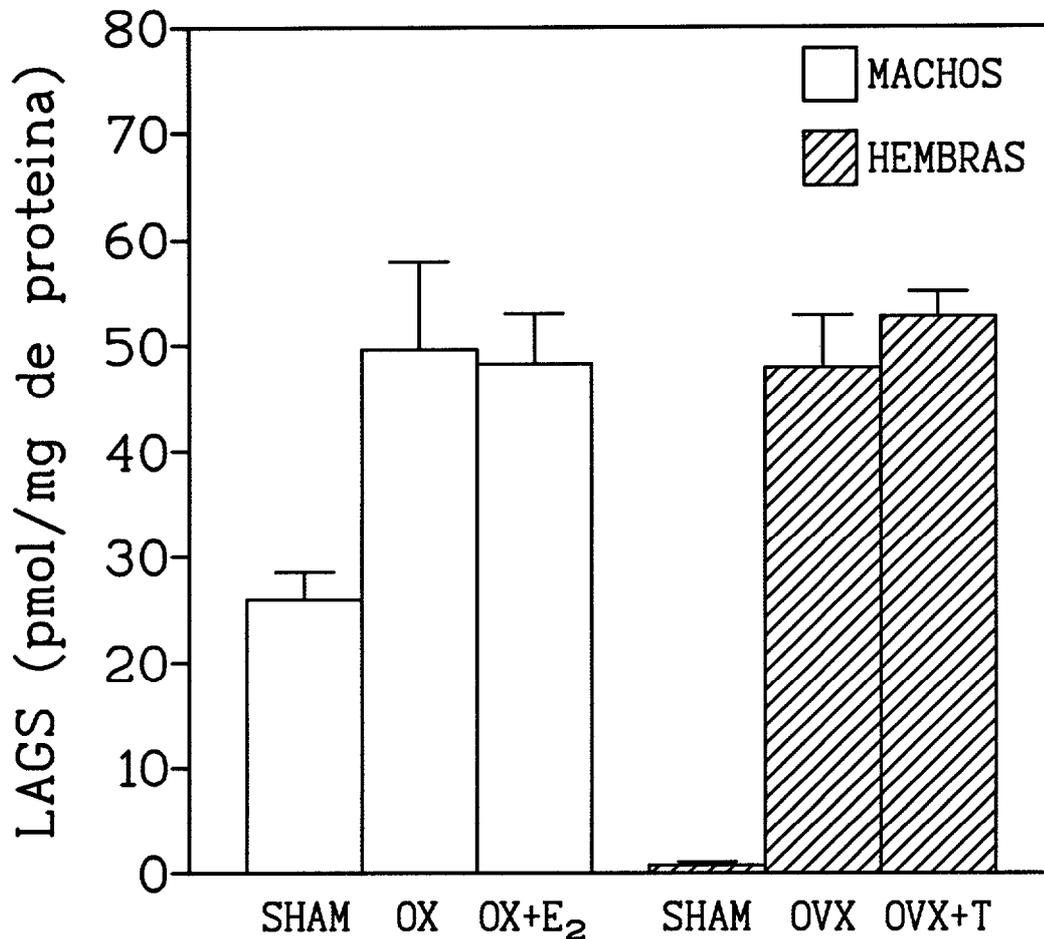


Figura 5. Estudio del dimorfismo sexual en la expresión de LAGS. Grupos de ratas macho fueron pseudogonadectomizadas (Sham), gonadectomizadas e inyectadas con vehículo (OX) o gonadectomizadas e inyectadas con Propionato de Estradiol (OX + E<sub>2</sub>) en el primer día de vida. Grupos de ratas hembras recibieron el mismo tratamiento, pero uno de los grupos recibió Propionato de Testosterona en lugar de Estradiol (Sham, OVX y OVX+T, respectivamente). El sacrificio se realizó a los 67 días.

#### **4.6. EFECTO DE LA OVARIECTOMÍA ANTES Y DESPUÉS DE LA PUBERTAD.**

A partir de los datos del experimento anterior, parecía lógico creer que las hormonas ováricas podían poseer un papel frenador de la expresión de LAGS, ya que la ovariectomía, al menos en las etapas tempranas de la vida, ejercía un poderoso efecto estimulante sobre la expresión de el LAGS, efecto que podía ser directo, y no mediado por los profundos cambios hipotalámicos en la secreción de GH que acompañaba a dicha ablación quirúrgica.

Al objeto de intentar demostrar si la ausencia de hormonas femeninas, y no el cambio del patrón de secreción hipotalámica de GH, era el responsable de esta desrepresión de la expresión de LAGS, consideramos de interés desarrollar el siguiente experimento, en el cual grupos de ratas hembras de la cepa Lewis fueron ovariectomizadas en distintos momentos de la vida, concretamente a los días 10, 22, 38, 42, 46 y 60 días de vida. De forma adicional, y a efectos estadísticos, se incluyó un grupo control, pseudoovariectomizado, para cada edad. Si tenemos en cuenta que la pubertad en la rata acontece en torno a los 42 días de edad, podemos considerar que habían grupos ovariectomizados en la etapa prepuberal y otros que fueron operados en la etapa peripuberal o pospuberal. Todos los grupos fueron sacrificados a los 70 días de edad, excepto el grupo ovariectomizado a los 60 días que lo fue a los 80. En estas dos épocas conocíamos por la ontogenia que eran de un alto nivel de expresión de LAGS.

Los resultados se aprecian en las Figuras 6a y 6b. En ellas se advierte en primer lugar que los grupos pseudooperados en ningún caso presentaron unos niveles de LAGS superiores a 1 pmol / mg de proteína, repitiéndose una vez más ese dimorfismo sexual previamente descrito si los comparamos con los grupos ovariectomizados ( $p < 0.001$ ). En segundo lugar, queda patente que la ovariectomía realizada antes de la pubertad siempre se manifiesta efectiva, alcanzándose unos niveles de LAGS en estas ratas hembras similares a los del macho o superiores. En tercer lugar, las ratas que fueron ovariectomizadas a partir de los 42 días, manifiestan unos niveles de LAGS claramente inferiores a los exhibidos por ratas ovariectomizadas en etapas más tempranas.

El estudio estadístico pormenorizado mostró que en los animales ovariectomizados antes de la época de la pubertad, es decir antes de los 40 días, existe una diferencia significativa ( $p < 0.001$ ), con respecto al control, mientras que en el grupo de 42 días la significación estadística fue más reducida ( $p < 0.05$ ). Por último, en los grupos que fueron ovariectomizados a los 46 y 60 días, ya no hay significación estadística respecto al control.

Los resultados de este experimento nos parecieron muy interesante, pues es poco común que se puedan apreciar mecanismos que en pocos días sean capaces de ejercer una poderosa señal, que de alguna manera impida que en la rata hembra Lewis adulta se exprese esta proteína hepática.

### *Resultados*

Cuando se ovariectomiza a una rata hembra antes de la pubertad, la primera y más importante consecuencia es que no se produce la maduración sexual de la rata, y esto es porque no llegan nunca a producirse hormonas de origen ovárico, necesarios para el desarrollo de la madurez sexual, pero además, desde nuestro punto de vista, podían ser los estrógenos los que estuvieran implicados en la no expresión de LAGS en la rata hembra adulta intacta, pues en el momento en que el LAGS comenzaría a ser detectado, que es justo después de la pubertad, es cuando se eleva el nivel de estrógenos circulantes y este quizás sea el responsable de que el hígado de la rata hembra no exprese LAGS. Sobre esta hipótesis de trabajo continuamos nuestros experimentos siguientes.

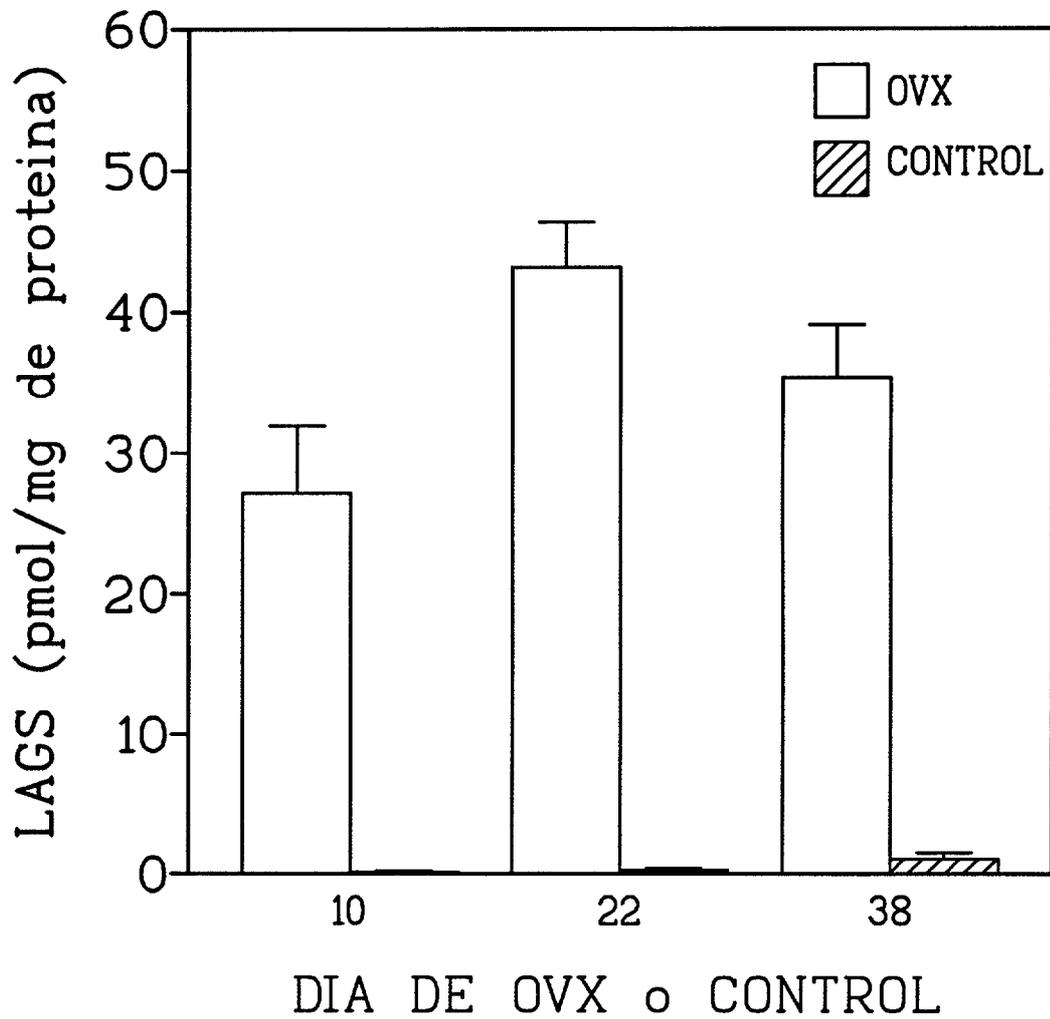


Figura 6.a Efecto de la ovariectomía sobre la expresión de LAGS. Grupos de ratas hembras fueron ovariectomizadas (OVX) o pseudooperadas (CONTROL) a los 10, 22 y 38 días de vida. Sacrificio a los 70 días de edad.

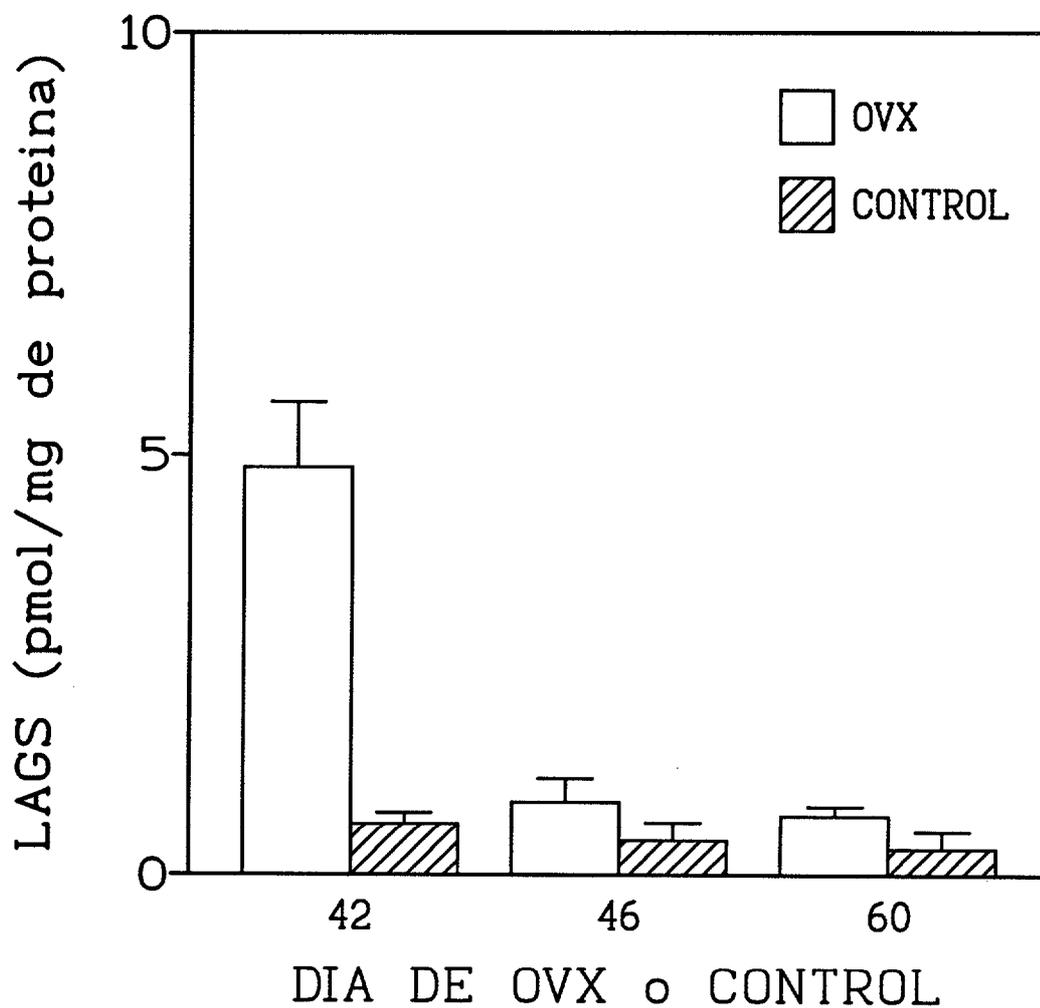


Figura 6b. Efecto de la ovariectomía sobre la expresión de LAGS. Grupos de ratas hembras fueron ovariectomizadas (OVX) o pseudooperadas (CONTROL) a los 42, 46 y 60 días de vida. En los dos primeros grupos es sacrificio se realizó a los 70 días de edad, y en el último a los 80.

#### **4.7. EFECTO DE LA ORQUIDECTOMÍA ANTES Y DESPUÉS DE LA PUBERTAD.**

El efecto de la gonadectomía en la rata hembra, antes y después de la pubertad parecía evidente. Sin embargo, y después de los resultados obtenidos en los experimentos de cambio de sexo hipotalámico, en los que se apreció como la orquidectomía, realizada durante las primeras 24 horas de vida, era capaz de duplicar los niveles de LAGS al llegar a la edad adulta, nos intrigaba qué significado podía tener la gonadectomía en la rata macho, y si el efecto era diferente antes y después de la pubertad, implicando así también en la regulación endocrina a alguna hormona de origen testicular, como la Testosterona,

Por ello nos planteamos el siguiente experimento, en el cual grupos de ratas Lewis macho fueron orquidectomizadas a diferentes edades, concretamente a los 1, 10, 22, 40 y 80 días, y al mismo tiempo se pseudooperaron los correspondientes controles. Las ratas orquidectomizadas antes de la pubertad fueron sacrificadas a los 70 días, mientras que en el caso de las gonadectomizadas a los 80 días, el sacrificio se realizó a los 100 días.

Los resultados obtenidos y que se muestran en la Figura 7, revelan que la gonadectomía en el macho fue capaz de elevar el contenido de LAGS de forma significativa ( $P < 0.05$ ), en todos los grupos orquidectomizados antes de la pubertad, en cambio la gonadectomía realizada después de esta época no parece tener ningún efecto sobre la expresión de LAGS. Este efecto es en cierto sentido

### *Resultados*

similar al encontrado en las hembras, pues en ambos casos la gonadectomía realizada después de la pubertad no modifica los niveles de LAGS con respecto a los animales gonadectomizados de su mismo sexo. Este efecto no puede ser debido al patrón de secreción de GH, pues este no cambia si la gonadectomía se realiza a los 10 ó 20 días de vida, más bien se debe buscar el origen de este efecto en los esteroides sexuales, aunque tampoco puede descartarse la participación hipofisaria en este proceso.

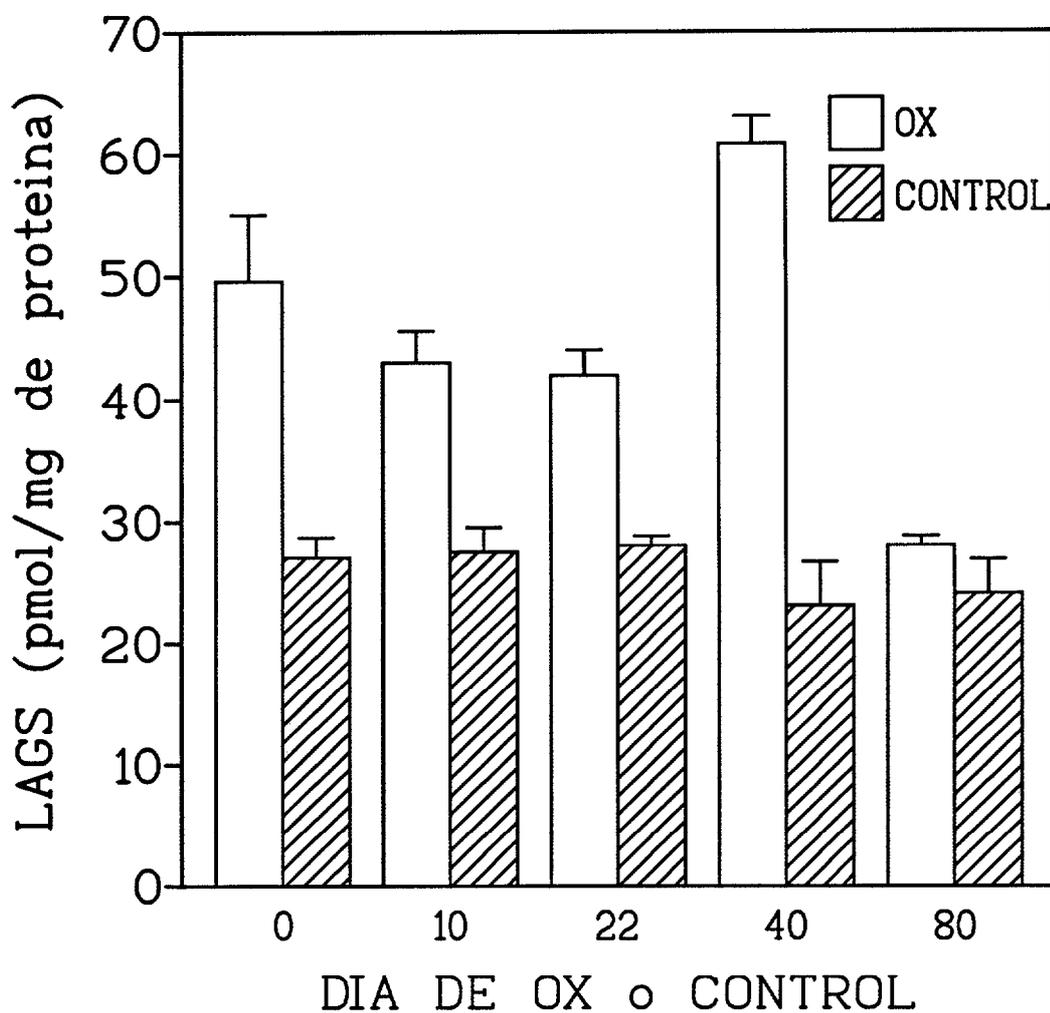


Figura 7. Efecto de la orquidectomía sobre la expresión de LAGS. Grupos de ratas machos fueron orquidectomizados (OX) o pseudooperados (CONTROL) a los 0, 10, 22, 40 y 80 días de vida. El sacrificio se realizó a los 70 días de edad, excepto el del último grupo que lo fue a los 100 días.

#### **4.8. EFECTO DEL ESTRADIOL EN MACHOS ADULTOS INTACTOS.**

Llegados a este punto, se podía pensar que las hormonas sexuales masculinas, debían tener alguna implicación en la regulación endocrina del LAGS, pues su presencia antes de la pubertad impedía que los niveles de LAGS en la edad adulta se viesen aumentados, en cambio su ausencia en la edad adulta no parecía influir de manera notoria sobre el nivel de LAGS. Las hormonas ováricas sí que estaban implicadas de forma importante e interesante, pues la presencia de ovarios impedía en las hembras la aparición de LAGS al mismo nivel que se expresaba en los machos. No es este un mecanismo extraño, pues se sabe que en el caso de algunas Isoenzimas del citocromo P-450, durante la época postnatal los esteroides sexuales masculinos imprimen la huella necesaria para que en la edad adulta se expresen estas isoenzimas, y que dejan de hacerlo si la rata macho es gonadectomizada al nacimiento (Mode et al., 1.981; Waxman et al., 1.985).

Por estas razones, nos planteamos un experimento en el que se debía usar como modelo la rata macho Lewis adulta en la que existiese una cantidad constante de Estradiol en el plasma, de manera que su influencia sobre el hígado fuera contínua, tal y como lo harían las hembras no gonadectomizadas antes de la pubertad. La solución elegida fue implantar en las ratas de este experimento una cápsula de silastic conteniendo una solución depot del esteroide, con lo cual se produce una liberación continua del mismo y proporciona así unos niveles plasmáticos estables. El Estradiol se usó en forma de Benzoato de Estradiol (BE), y se depositó en

capsulas de silastic, de manera que cada cápsula contenía 25  $\mu\text{g}$  de BE. También se usó en este experimento Testosterona en cápsulas de silastic y también en forma de solución depot, concretamente como Propionato de Testosterona (PT) a razón de 500  $\mu\text{g}$ /cápsula.

Se usaron ratas maduras intactas que se dividieron en cuatro grupos, uno cuya cápsula contenía sólo vehículo (aceite de maiz), como control; un segundo grupo que contenía BE a la concentración indicada; un tercer grupo conteniendo PT y el cuarto con dos cápsulas cada una con un esteroide sexual diferente a la misma concentración anterior. El sacrificio se realizó tres semanas después de implantadas las cápsulas.

Los resultados se pueden apreciar en la Figura 8. En ella cabe destacar en primer lugar, que la PT no parece tener ningún efecto sobre la expresión de LAGS, y en segundo lugar, que el grupo implantado con BE tampoco reveló diferencias con respecto al grupo control, por lo que de tener algún efecto el BE éste no se manifiesta cuando están presentes las gónadas.

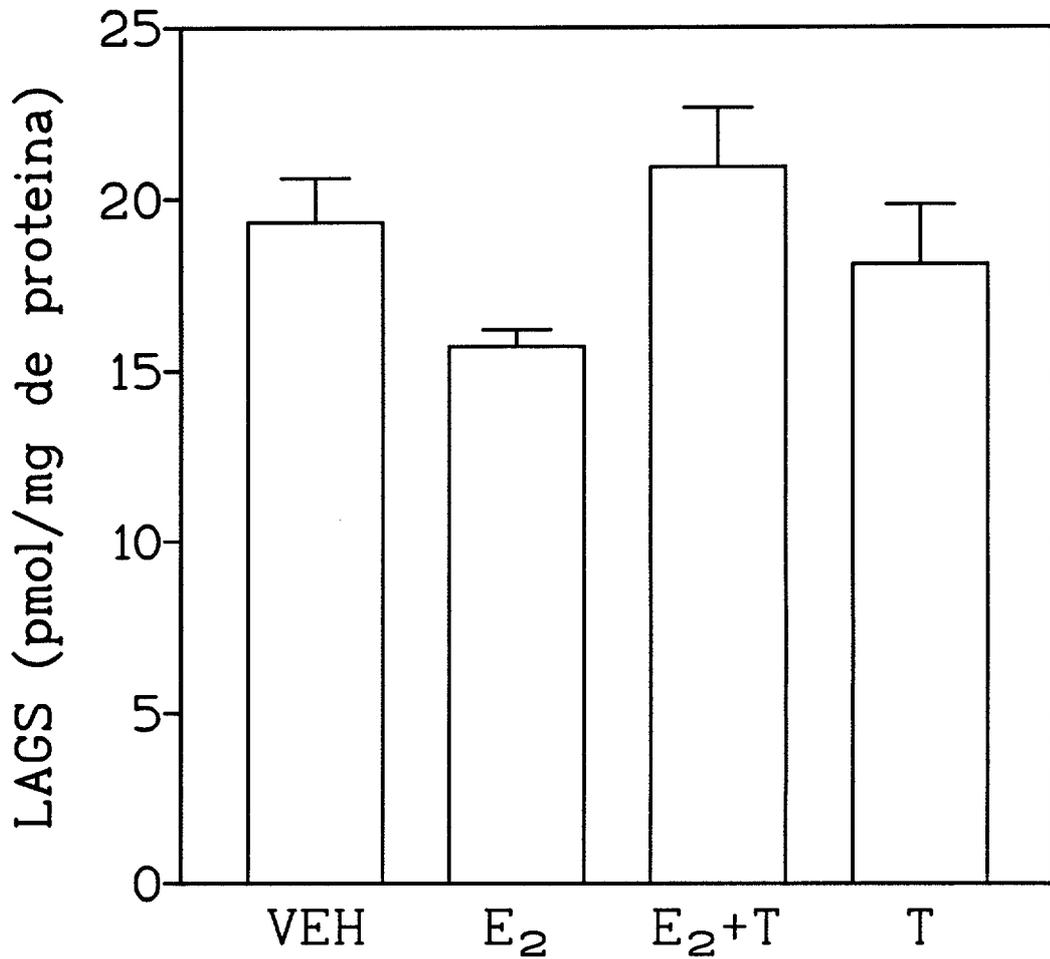


Figura 8. Efecto del estradiol en machos adultos intactos. A grupos de ratas machos adultas se les implantó durante 21 días una cápsula conteniendo vehículo (VEH), Benzoato de Estradiol (E<sub>2</sub>), Propionato de Testosterona (T), Benzoato de Estradiol y Propionato de Testosterona (E<sub>2</sub>+T, cada uno en una cápsula).

#### **4.9. EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAGS EN MACHOS ORQUIDECTOMIZADOS ANTES DE LA PUBERTAD.**

A pesar de los resultados anteriores, nos continuaba pareciendo interesante el hecho de que la gonadectomía en las hembras, antes de la pubertad, fuese capaz de elevar el nivel de LAGS en la edad adulta de estas ratas. Pero, sobre todo llamaba la atención que no ocurriese lo mismo cuando se realizaba la gonadectomía después de la pubertad. Esto nos seguía haciendo pensar que alguna hormona ovárica, como el Estradiol, podía tener un efecto inhibitor sobre la expresión de LAGS, y que producía una huella tan duradera que si la gonadectomía se realizaba después de la pubertad, la rata hembra ya era incapaz de expresar LAGS. Un mecanismo similar está descrito para algunas isoenzimas del citocromo p-450, como son el IIC11 y el IIC12, cuyos niveles en la rata macho adulta cambian con la administración de Estradiol, aunque a una dosis de más de 1mg/Kg de peso, que es una dosis totalmente farmacológica (Morgan et al., 1.985; MacGeoch et al., 1.985).

Por ello insistimos en investigar esta posibilidad de que el Estradiol se comportase como inhibidor de la expresión de LAGS, y en contraposición a los experimentos realizados con el citocromo p-450, nuestro interés iba dirigido a encontrar el efecto del estradiol a nivel fisiológico, usando unas dosis mucho más bajas de estradiol, pues es así como ocurre en los días siguientes a la pubertad en la rata hembra.

## Resultados

Ahora el modelo animal elegido fue la rata macho Lewis gonadectomizada antes de la pubertad, y ello porque quizás para que se manifestase la acción represora del estradiol fuese necesario un modelo animal que no tuviese una fuente endógena de esteroides sexuales, y que fuese macho, pues sabíamos que tanto en presencia o ausencia de gónadas, éste siempre expresaba LAGS.

La gonadectomía se realizó a los 25 días de vida, y en ese momento se les implantó, subcutáneamente en el tercio superior del dorso, la cápsula de silastic. El sacrificio se realizó a los setenta días de vida, momento en el que la expresión de LAGS es máxima. Las ratas objeto de este experimento se dividieron en cuatro grupos, entre los que se incluye un grupo pseudogonadectomizado como control, al que se le implantó una cápsula con vehículo; otro grupo gonadectomizado y al que se le implantó una cápsula conteniendo vehículo; el tercer grupo fue gonadectomizado y la cápsula contenía PT, y el cuarto contenía BE.

Los resultados se muestran en la Figura 9. En ella se aprecia claramente el intenso efecto originado por la cápsula de BE que abatió los niveles de LAGS a unos niveles inferiores al 5% del los controles ( $p < 0.001$ ), lo que indica claramente el potente efecto represor del estradiol sobre la expresión de LAGS. Otra observación interesante es el incremento significativo de LAGS tras la orquidectomía al comparar este grupo con el pseudogonadectomizado ( $p < 0.01$ ), que parece indicar un posible efecto de la testosterona endógena en el sentido de deprimir los niveles de LAGS. Sin embargo, este efecto no ha sido observado en otros grupos experimentales y será explorado en estudios posteriores.

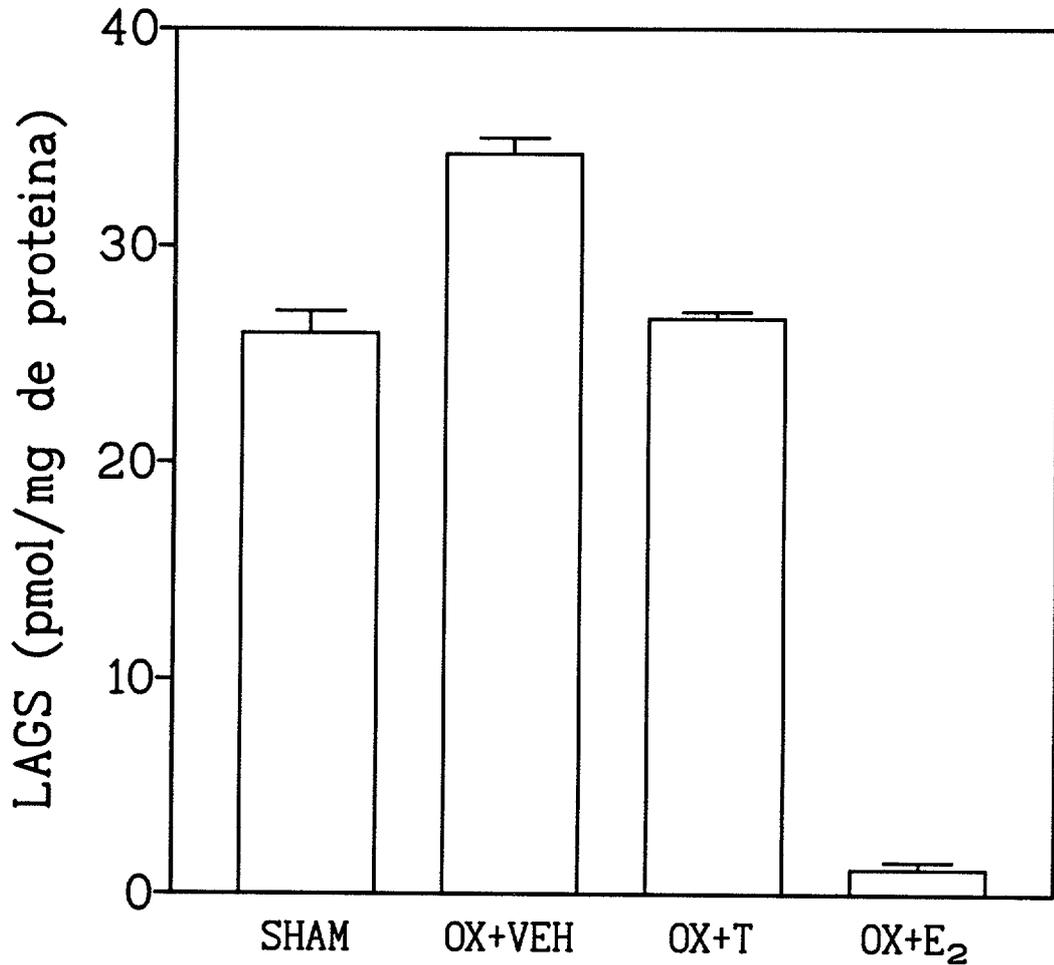


Figura 9. Efecto del estradiol sobre la expresión de LAGS en machos orquidectomizados antes de la pubertad. Grupos de ratas machos fueron pseudooperados (SHAM) u orquidectomizados a los 25 días de vida y en ese momento se les implantó una cápsula conteniendo vehículo (OX + VEH), Propionato de Testosterona (OX + T) o Benzoato de Estradiol (OX + E<sub>2</sub>)

#### **4.10. EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAGS EN MACHOS ORQUIDECTOMIZADOS DESPUÉS DE LA PUBERTAD.**

En el experimento anterior habíamos introducido dos nuevas variables, a saber: en primer lugar, el tiempo transcurrido entre la orquidectomía y colocación de cápsula con el esteroide, y el sacrificio de las ratas, que fue de 45 días; y en segundo lugar, que este modelo era de ratas gonadectomizadas antes de la pubertad. Por ello parecía necesario indagar sobre sobre estos dos aspectos, es decir, sobre el tiempo mínimo que debía permanecer implantada una cápsula de BE para generar la acción inhibidora y también sobre si la gonadectomía era imprescindible realizarla antes de la pubertad. Las respuestas a estas dudas se buscaron con este siguiente experimento.

Así, asumiendo la hipótesis de que la presencia de gónadas en la rata macho era capaz de impedir el efecto inhibidor del estradiol, debíamos elegir un modelo animal que precisaba de la anulación de la actividad testicular. El modelo elegido fue la rata macho Lewis adulta gonadectomizada.

La gonadectomía se realizó a los 80 días de edad, y en ese momento se les implantó, la cápsula de silastic conteniendo BE, con aceite de maíz como vehículo. Las ratas gonadectomizadas se dividieron en dos grandes grupos, uno de ellos contenía una cápsula con sólo vehículo, como control, y el segundo contenía BE a la concentración ya usada. Cada grupo, con su correspondiente grupo control,

fue sacrificado siguiendo una pauta encaminada a conocer el tiempo necesario para que se produjera la inhibición, si es que ella ocurría. Así, la primera serie se sacrificó a los tres días de la gonadectomía e implante, y las siguientes lo fueron a los cinco, siete, diez y veinte días.

Los resultados se muestran en las Figuras 10a y 10b. En ellas se observa como a los tres días existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) que resulta del incremento en la expresión de LAGS en el grupo que tenía la cápsula con BE. Este efecto ya no existe a los cinco días, donde en ambos grupos los niveles de LAGS son similares, y a los siete días se aprecia un incremento no significativo del grupo con vehículo. Es a los 10 días cuando aparece la significación estadística que permite pensar en un efecto represor del estradiol ( $p < 0.05$ ) y la significación es clara y máxima en el grupo sacrificado a los veinte días ( $p < 0.01$ ).

Estos experimentos permitían establecer las siguientes conclusiones:

- El efecto inhibitor de la expresión de LAGS en ratas macho ejercido por el Estradiol, precisaba de un modelo carente de gónadas, y este efecto tenía lugar en cualquier momento de la vida del animal, no siendo necesaria la orquidectomía antes de la pubertad.
- Tras veinte días con la cápsula de BE, el efecto inhibitor se manifiesta de forma clara.

Con idénticos grupos se realizó este experimentos en machos de la cepa Sprague-Dawley, obteniéndose resultados similares y con la misma significación estadística,

aunque con niveles más bajos de LAGS, acorde con su menor expresión en esta cepa (datos no mostrados).

Como quiera que las dosis de estradiol que se incorporaban a cada cápsula eran mínimas, nos interesaba conocer realmente su concentración plasmática en estas ratas y sobre todo era necesario comparar estos niveles con los expresados por las ratas hembras no ovariectomizadas de la misma edad, a fin de saber si la cantidad usada era cercana a la fisiológica. Por ello se realizó un experimento adicional en el que se midieron los niveles plasmáticos de estradiol por Radioinmunoensayo, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos. Como control se usaron hembras maduras intactas y sus valores se compararon con los obtenidos en machos de la misma edad oquidectomizados e implantados durante tres semanas con una cápsula conteniendo BE.

Los resultados se muestran en la Figura 10c. En ella se aprecia que los valores de estradiol presentes en el suero pueden ser considerados como prácticamente fisiológicos.

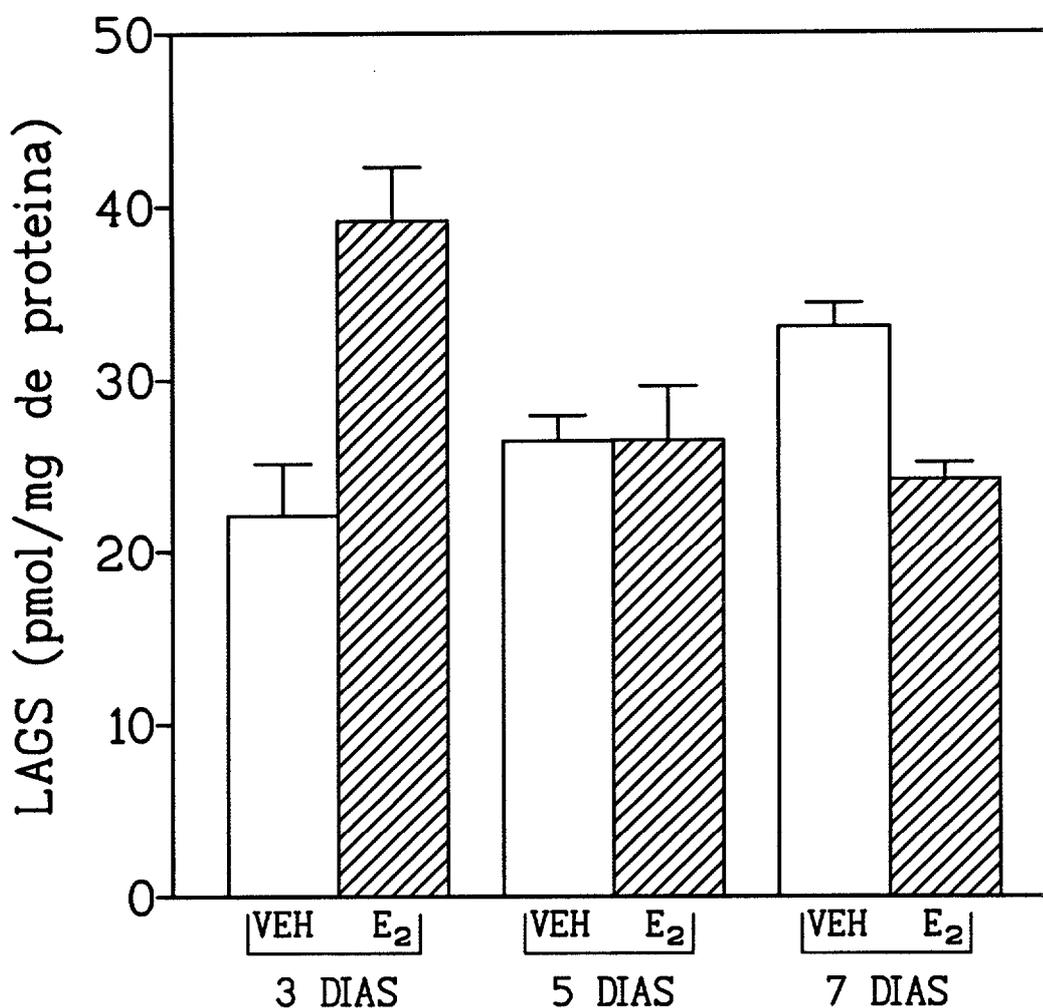


Figura 10a. Efecto del estradiol sobre la expresión de LAGS en machos orquidectomizados después de la pubertad. Grupos de ratas macho de 80 días fueron orquidectomizados e implantados en ese momento con cápsulas conteniendo vehículo (VEH) o Benzoato de Estradiol (E<sub>2</sub>). El sacrificio se realizó a los 3, 5 y 7 días después.

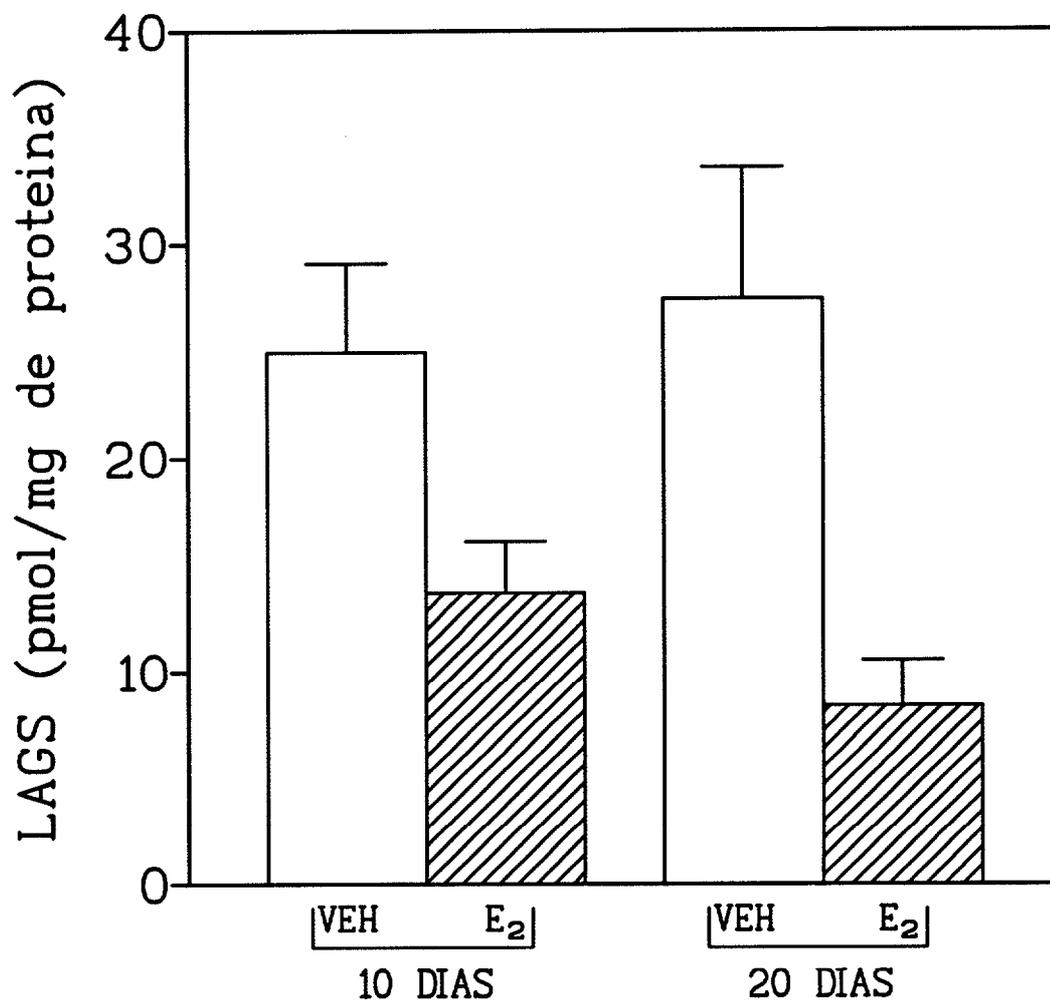


Figura 10b. Efecto del estradiol sobre la expresión de LAGS en machos orquidectomizados después de la pubertad. Grupos de ratas macho de 80 días fueron orquidectomizados e implantados en ese momento con cápsulas conteniendo vehículo (VEH) o Benzoato de Estradiol (E<sub>2</sub>). El sacrificio se realizó a los 10 y 20 días después.

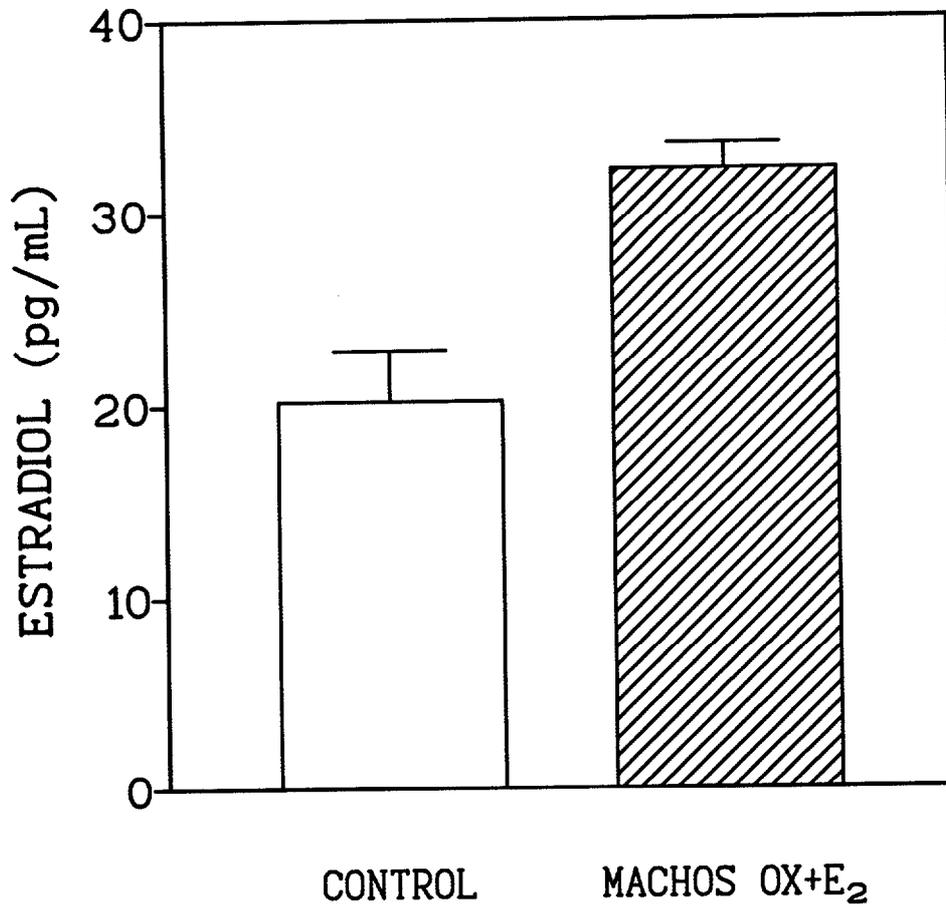


Figura 10c. Cuantificación por Radioinmunoensayo de la concentración sérica de Estradiol en ratas hembras maduras intactas (CONTROL) y en machos de la misma edad orquidectomizados e implantados durante tres semanas con una cápsula conteniendo Benzoato de Estradiol (MACHOS OX + E<sub>2</sub>).

#### 4.11. EFECTO ANTAGÓNICO DE LA TESTOSTERONA Y ESTRADIOL.

De los experimentos realizados hasta este momento y que podían implicar a la testosterona, aquellos en los que se usaron machos gonadectomizados antes de la pubertad apuntaba hacia el hecho de que la testosterona (por cuanto es eliminada tras la gonadectomía) podía tener un efecto represor sobre la expresión de el LAGS, sin embargo, en los animales gonadectomizados que se había implantado una cápsula conteniendo PT antes de la pubertad, este efecto no se manifestó. Por otra parte, cuando se usaron animales adultos intactos, tampoco se apreció el efecto represor. Por último, cuando se combinó la cápsula de PT con la de BE en animales orquidectomizados antes de la pubertad no fue capaz de inducir LAGS ni de revertir el efecto frenador del estradiol, sin embargo, en este experimento las cápsulas conteniendo ambos esteroides estuvieron colocadas durante 45 días, tiempo que podía ser elevado para una competición entre ambas hormonas. Parecía pues oportuno conocer la expresión de LAGS en presencia de ambas hormonas durante tiempos más cortos.

El modelo elegido fue el del macho Lewis adulto orquidectomizado, en el cual ya habíamos demostrado la eficacia del BE para inhibir la expresión de LAGS. Las ratas fueron orquidectomizadas a los 80 días de vida, y en ese momento se les implantó la o las cápsulas. Se usaron cuatro grupos, el primero fue un grupo pseudooperado al que se le implantó una cápsula con vehículo, el segundo consistía en animales orquidectomizados e implantados con una cápsula

conteniendo BE, el tercer grupo consistía en ratas orquidectomizadas e implantadas con PT, y el cuarto grupo también orquidectomizado tenía dos cápsulas conteniendo una BE y otra PT.

La mitad de los animales de cada grupo se sacrificó a los diez días de iniciado el tratamiento y la otra mitad a los veinte días. Los resultados están sumariados en las Figuras 11a y 11b. En ambas figuras destaca en primer lugar cómo entre los grupos tratados con BE y PT existe una diferencia que se mostró significativa desde los diez días ( $p < 0.05$ ) y que fue mayor a los veinte días ( $p < 0.01$ ), hecho ya comprobado en experimentos anteriores. En segundo lugar, y lo que realmente se manifestó innovador en este experimento, fue que a los veinte días existe significación entre el grupo que contenía solo PT y el que contenía ambos esteroides ( $p < 0.05$ ), mientras que entre este grupo y el que contenía solo BE no se apreció significación estadística. De lo anterior se puede entender que a los veinte días la testosterona no es capaz de inhibir el efecto represor del estradiol. Sin embargo, no ocurrió lo mismo a los diez días de comenzado el tratamiento, pues en este momento no se apreció diferencias entre el grupo tratado con PT y el que lo fue con ambos esteroides, mientras que sí existía diferencia entre este último grupo y el tratado sólo con BE ( $p < 0.05$ ).

Estos nuevos datos parecían indicar la existencia de un antagonismo entre el estradiol y la testosterona sobre la expresión de LAGS, pero ese antagonismo solo ocurría durante los diez primeros días. Las razones de este antagonismo aún no

### *Resultados*

han sido estudiadas, y entre otras variables está la de las dosis usadas de ambos esteroides, pues quizás sea un fenómeno dosis-dependiente y no solo tiempo-dependiente.

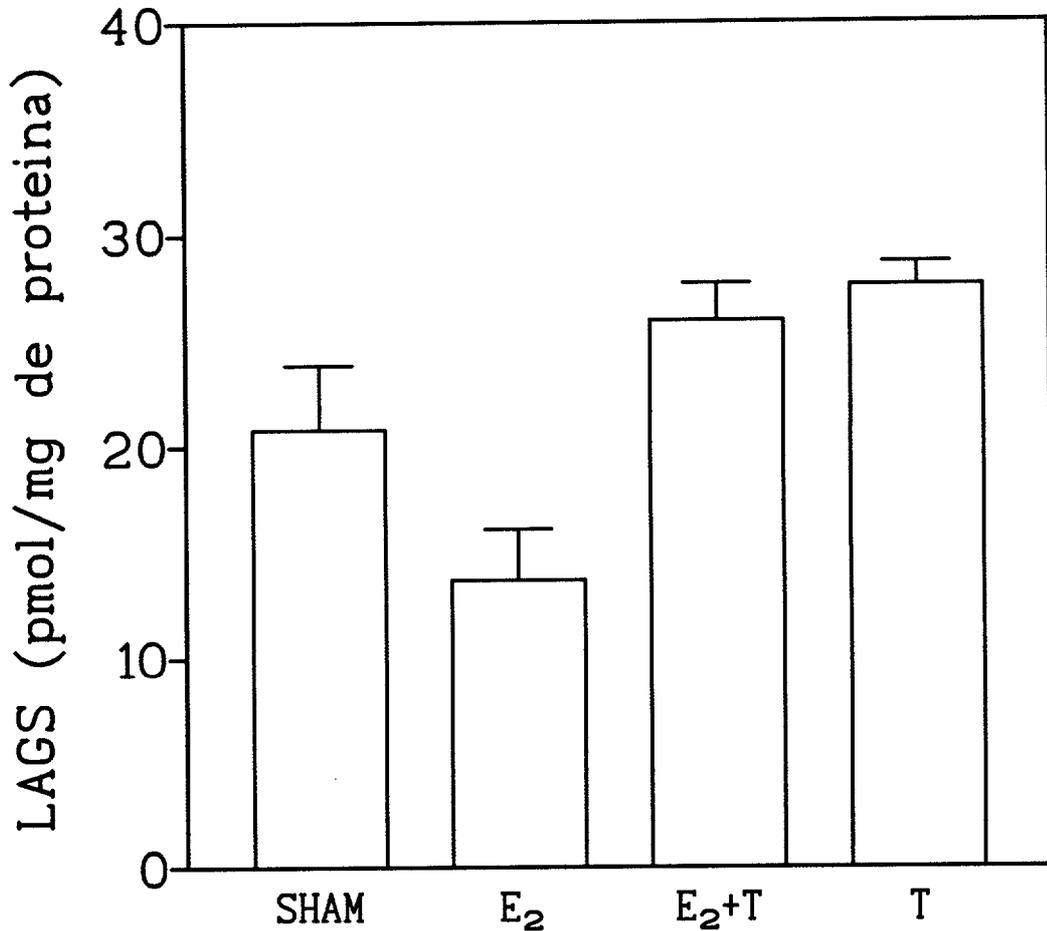


Figura 11a. Efecto antagónico de la Testosterona y el Estradiol sobre la expresión de LAGS. Grupos de ratas machos adultos fueron pseudooperados (SHAM) u orquidectomizados e implantados en ese momento con una cápsula conteniendo Benzoato de Estradiol (E<sub>2</sub>), Propionato de Testosterona (T), o con dos cápsulas conteniendo cada una uno de estos esteroides (E<sub>2</sub>+T). El sacrificio se realizó 10 días después.

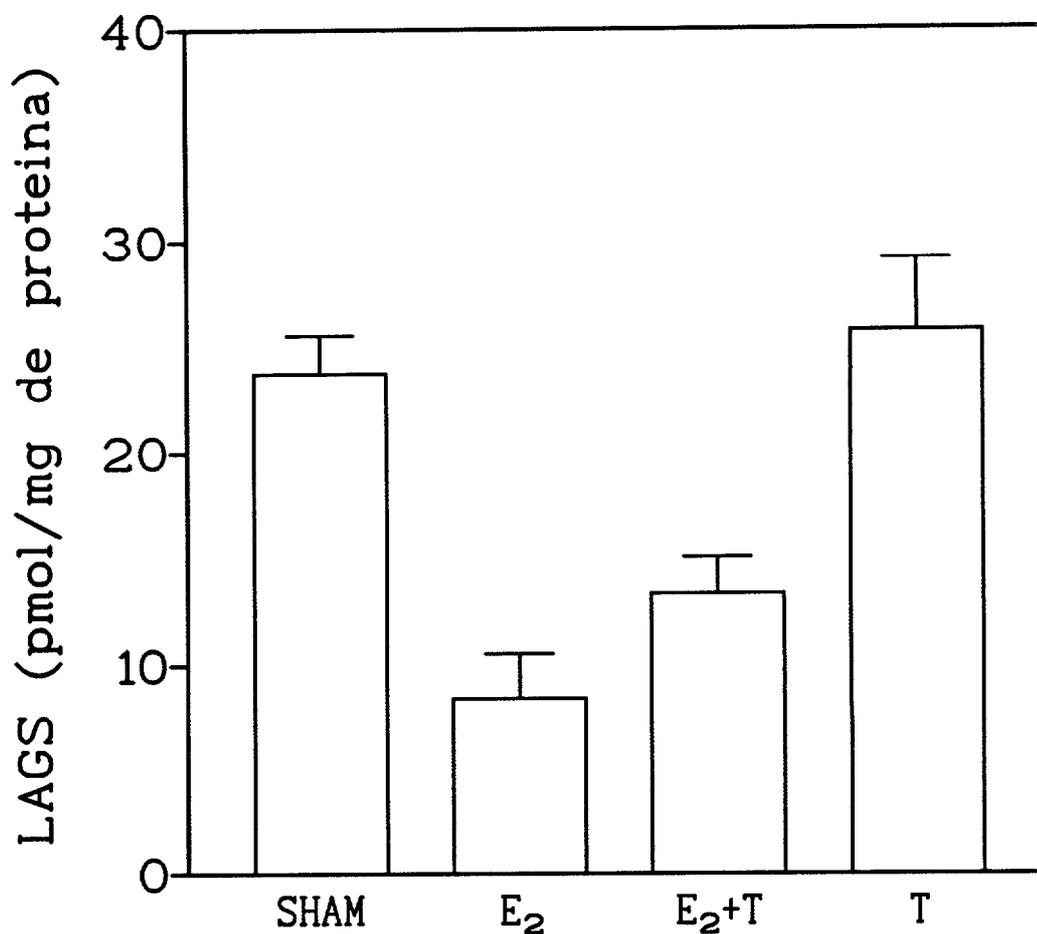


Figura 11b. Efecto antagónico de la Testosterona y el Estradiol sobre la expresión de LAGS. Grupos de ratas machos adultos fueron pseudooperados (SHAM) u orquidectomizados e implantados en ese momento con una cápsula conteniendo Benzoato de Estradiol (E<sub>2</sub>), Propionato de Testosterona (T), o con dos cápsulas conteniendo cada una uno de estos esteroides (E<sub>2</sub> + T). El sacrificio se realizó 20 días después.

#### **4.12. EFECTO DEL ESTRADIOL EN MACHOS ADULTOS HIPOTIROIDEOS Y ORQUIDECTOMIZADOS.**

Para conocer a fondo el papel que jugaba el estradiol en la regulación del LAGS, y descartar que este efecto no era exclusivo del macho orquidectomizado, debíamos explorar las implicaciones de las Hormonas Tiroideas, pues como ya se había demostrado, tanto en la cepa Sprague-Dawley, como en la cepas Lewis y Lewis enana, las hormonas tiroideas tienen un importante efecto estimulador de la expresión de LAGS, hasta el punto de que el hipotiroidismo en la cepa Lewis enana ocasiona una caída en la expresión de LAGS mayor de un 90%.

En este estado de conocimientos, y dada la influencia inductora que las Hormonas Tiroideas ejercen sobre el Receptor de Estradiol en el hígado de rata (Eriksson y Freyschuss, 1.988; Freyschuss y Eriksson, 1.988), parecía imprescindible explorar si las hormonas tiroideas eran capaces de competir con el estradiol sobre la expresión de LAGS. Para ello, el modelo animal elegido fue aquel en el que habíamos demostrado el efecto represor del estradiol: la rata Lewis adulta orquidectomizada, a la cual ahora íbamos a someter a una situación de hipotiroidismo, mediante la administración de PTU en el agua de bebida. Como ya habíamos demostrado en experimentos anteriores, la administración de hormonas tiroideas, en forma de  $T_3$  a este modelo de rata hipotiroidea produce la recuperación del nivel de LAGS. Era por tanto un modelo ideal para investigar si el estradiol era capaz de inhibir el efecto inductor de las hormonas tiroideas.



En este sentido, se planificaron dos experimentos:

En el primero de ellos, el objetivo fue conocer si en la rata orquidectomizada el PTU origina el intenso efecto depresor sobre el LAGS que se aprecia en los otros modelos. Para ello, se usaron ratas Lewis machos de sesenta días a las que se les trató con PTU durante siete semanas, y a las que se orquidectomizó a las cuatro semanas de tratamiento con PTU. El sacrificio se realizó a las dos, cuatro y siete semanas. El grupo control sin PTU se sacrificó a las siete semanas.

Los resultados se muestran en la Figura 12a y en ella se aprecia como en este modelo el PTU también origina el mismo e intenso efecto que en el modelo no orquidectomizado, con una diferencia muy significativa ( $p < 0.001$ ) del grupo sacrificado a las siete semanas con respecto al control no PTU.

En el segundo experimento, se intentó conocer la implicación del estradiol como factor inhibidor de las hormonas tiroideas en la expresión de LAGS. Se usaron cuatro grupos de ratas, todas PTU durante siete semanas, al comenzar la quinta de las cuales, se realizó la orquidectomía y se les implantó a la mitad una cápsula con vehículo y a la otra mitad una cápsula con BE. Durante la última semana, a un grupo implantado con vehículo y a otro con BE se les administró  $T_3$  a razón de  $2.5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  de peso corporal/día en una sola inyección diaria y a sus correspondientes grupos control se le trató sólo con vehículo. El sacrificio de todos los grupos, se realizó un día después de la última inyección de hormona o vehículo. Los resultados se pueden apreciar en al Figura 12b, en la cual destaca como en el

grupo implantado con la cápsula conteniendo vehículo, el tratamiento con T<sub>3</sub> durante una semana es capaz de subir los niveles de LAGS, colocándolos en unos valores cercanos a los del grupo control no hipotiroideo y no orquidectomizado, mientras que el grupo que tenía la cápsula con BE y fue tratado con T<sub>3</sub>, la cantidad de LAGS se mantiene baja y entre ambos grupos se advierte una importante significación ( $p < 0.001$ ). Estos resultados apuntan hacia la veracidad de nuestra hipótesis de partida: que el estradiol es capaz de inhibir la inducción de LAGS mediada por las hormonas tiroideas.

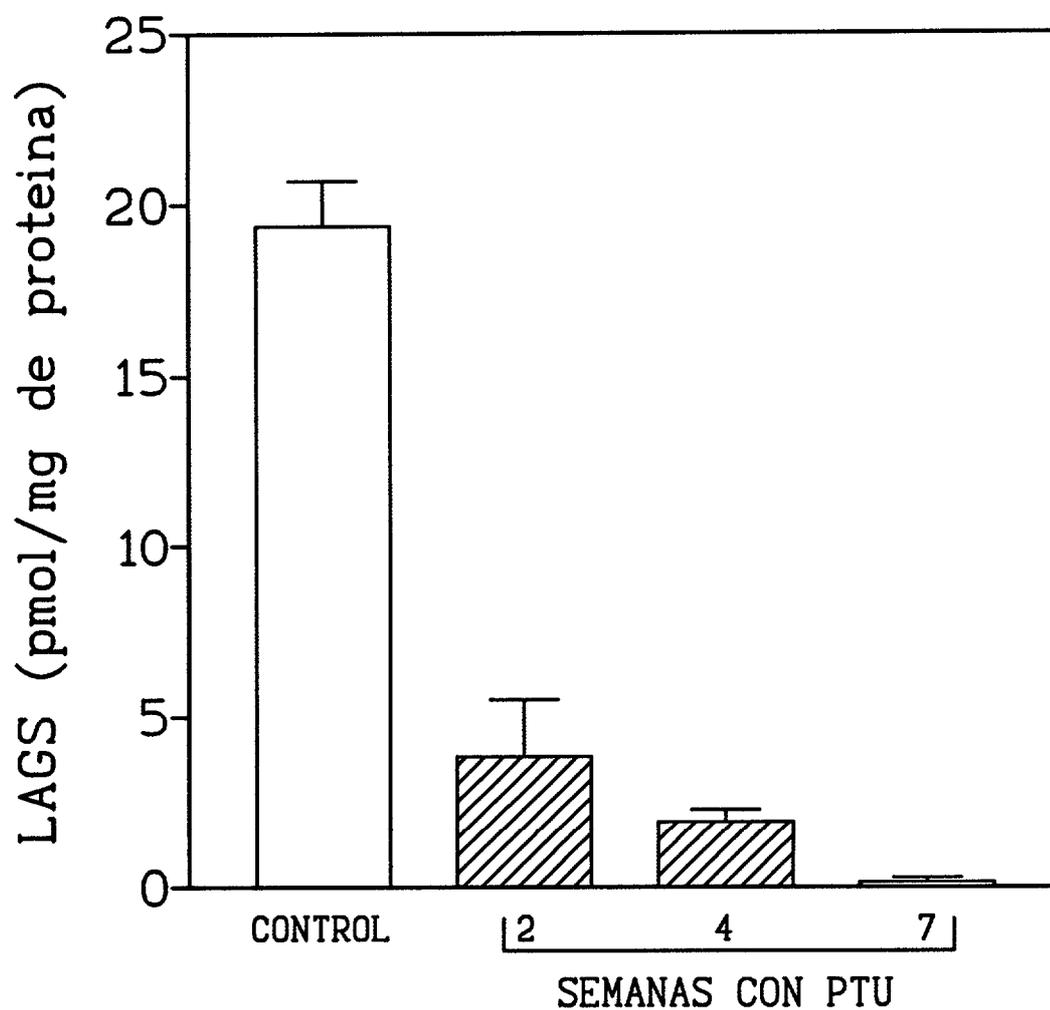


Figura 12a. Efecto del Hipotiroidismo y la Orquidectomía sobre la expresión de LAGS. Grupos de rats machos adultas fueron tratados con PTU durante 2, 4 y 7 semanas, este último grupo fue además orquidectomizado al comenzar la quinta semana de tratamiento con PTU.

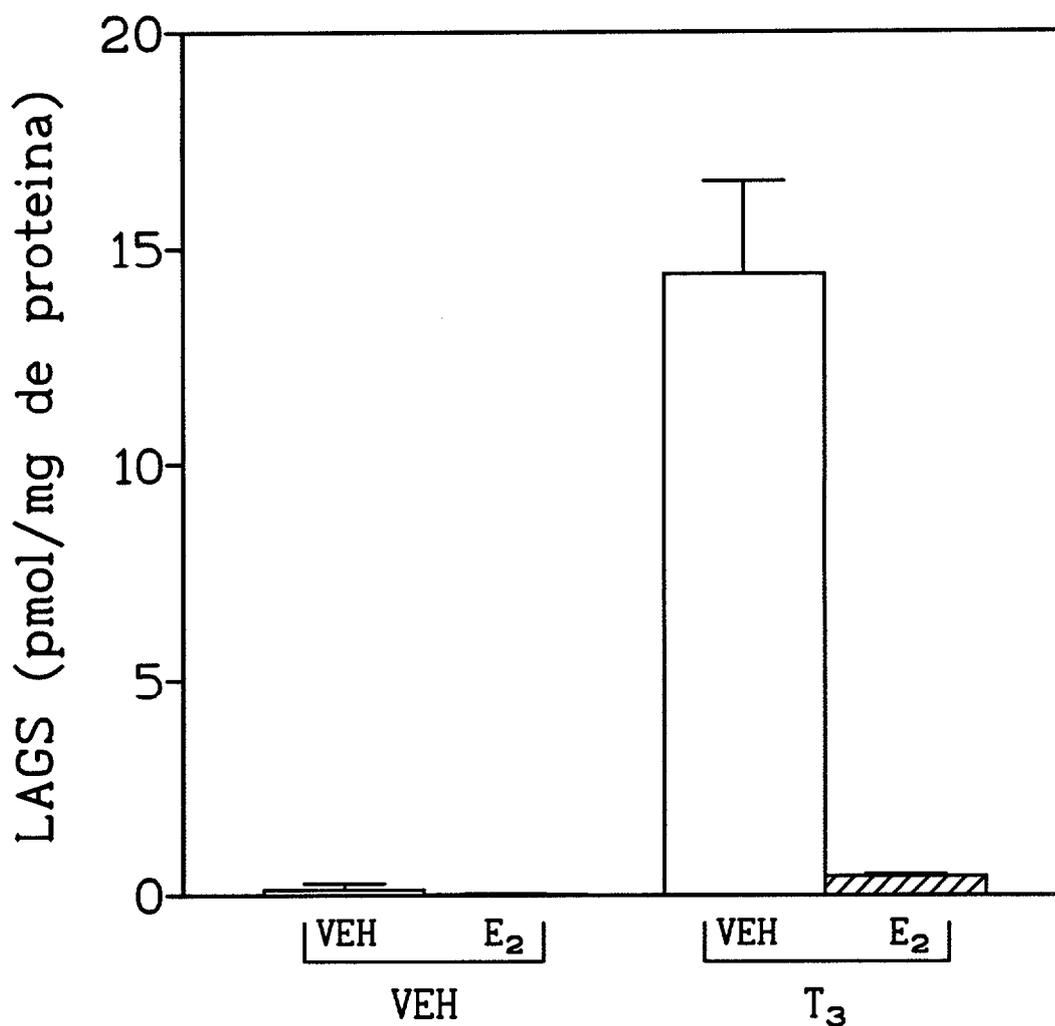


Figura 12b. Efecto del estradiol sobre el LAGS en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados. Grupos de ratas machos adultas fueron tratadas con PTU durante 7 semanas, al comenzar la quinta de las cuales fueron además orquidectomizadas e implantadas con una cápsula conteniendo vehículo (VEH) o Benzoato de Estradiol (E<sub>2</sub>). Durante la última semana de tratamiento con PTU la mitad de los grupos recibió una inyección diaria de T<sub>3</sub> y la otra mitad vehículo.

#### **4.13. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAGS EN MACHOS ADULTOS HIPOTIROIDEOS Y ORQUIDECTOMIZADOS.**

De los resultados de los experimentos anteriores parecía evidente la implicación del estradiol en la regulación de el LAGS, pero aún existía otra hormona ovárica, la Progesterona, que no habíamos explorado y que debíamos investigar si estaba implicada en la regulación de el LAGS, pues nada indicaba hasta el momento que el efecto represor fuera exclusivo del estradiol. Así pues, decidimos explorar el papel que podía jugar esta hormona en el mismo modelo que hasta ahora habíamos usado, el macho Lewis hipotiroideo y orquidectomizado.

Se usaron cuatro grupos de ratas macho, todos ellos tratados con PTU durante siete semanas, que fueron orquidectomizados al comenzar la quinta y en el mismo momento se les implantó la cápsula, a la mitad conteniendo vehículo y a la otra mitad conteniendo Progesterona a razón de 0.5 mg/cápsula. Un grupo con cápsula conteniendo vehículo y otro con cápsula conteniendo progesterona fué tratado durante la última semana con  $T_3$  y los otros dos grupos restantes, controles, lo fueron con vehículo.

Los resultados se muestran en la Figura 13. En ella se advierte cómo el tratamiento con hormonas tiroideas al grupo que contenía la cápsula de progesterona fue efectivo desde el punto de vista de recuperación de LAGS, pues entre este grupo y el que tenía cápsula con vehículo y también fué tratado con  $T_3$  no se aprecia

diferencia significativa. Por tanto la progesterona no parece tener ningún efecto sobre la expresión de LAGS, y tampoco parece antagonizar el efecto estimulante de las hormonas tiroideas. Por todo ello, parece concebible concluir que esta hormona carece de función reguladora alguna sobre la concentración de LAGS.

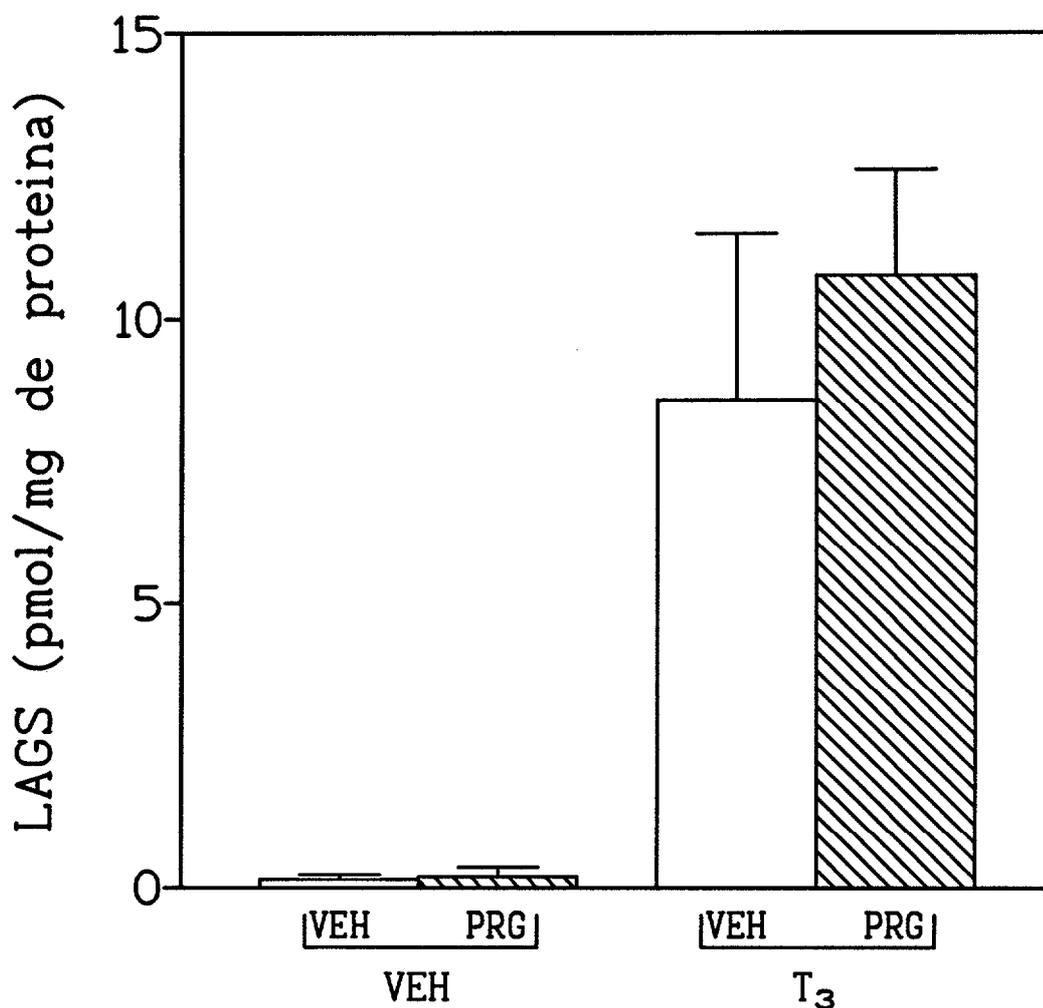


Figura 13. Efecto de la progesterona sobre la expresión de LAGS en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados. Grupos de ratas machos adultas fueron tratadas con PTU durante 7 semanas, al comenzar la quinta de las cuales fueron además orquidectomizadas e implantadas con una cápsula conteniendo vehículo (VEH) o Progesterona (PRG). Durante la última semana de tratamiento con PTU la mitad de los grupos recibió una inyección diaria de T<sub>3</sub> y la otra mitad vehículo.

#### **4.14. CAPACIDAD DEL TAMOXIFENO PARA BLOQUEAR EL EFECTO INHIBIDOR DEL ESTRADIOL.**

Hasta este momento habíamos podido demostrar que la progesterona no estaba relacionada con la regulación de el LAGS, mientras que el estradiol estaba claramente implicado. Por ello, estaba indicado el preguntarnos sobre el efecto que tendrían los antiestrógenos, tales como el Tamoxifeno.

Se usó nuevamente el mismo modelo animal que en los experimentos anteriores: animales hipotoroideos y orquidectomizados a las cuatro semanas de PTU, y en ese momento se les colocó la cápsula, a la mitad con vehículo y a la otra mitad con BE. De cada una de estas mitades se hicieron tres grupos diferentes según el tratamiento a recibir durante la última semana, a saber, vehículo,  $T_3$ , ó  $T_3$  más Tamoxifeno (10 mg/Kg de peso y día).

Los resultados se muestran en la Figura 14. En ella destaca en primer lugar, como una vez más la administración de  $T_3$  es capaz de producir un aumento de los niveles de LAGS en el grupo tratado con cápsula con aceite y en cambio no lo hace en el grupo con cápsula de BE. En segundo lugar es interesante destacar como en el grupo implantado con BE y al que se le administró  $T_3$  y tamoxifen, el nivel de LAGS no se elevó, siendo similar al del grupo tratado sólo con  $T_3$ , indicando esto que el tamoxifeno no es capaz de revertir el efecto de la cápsula de estradiol. Por último, también es de destacar como en el grupo que contenía cápsula con

### *Resultados*

vehículo y fué tratado con tamoxifeno y con T<sub>3</sub>, se produce una disminución del nivel de LAGS con respecto a su grupo control (cápsula con vehículo y tratado sólo con T<sub>3</sub>), apreciándose entre ambos una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), lo cual puede responder al porqué el tamoxifeno es incapaz de revertir el efecto de la cápsula de estradiol, pues en realidad se está comportando como represor de la actividad inductora de la T<sub>3</sub> sobre el LAGS, es decir, está actuando como el propio estradiol. El tamoxifeno es en realidad un agonista parcial del estradiol y a nivel hepático es capaz de mimetizar muchas de sus acciones. Por ello, no es de extrañar que en este experimento se comporte como un estrógeno más que como un antiestrógeno.

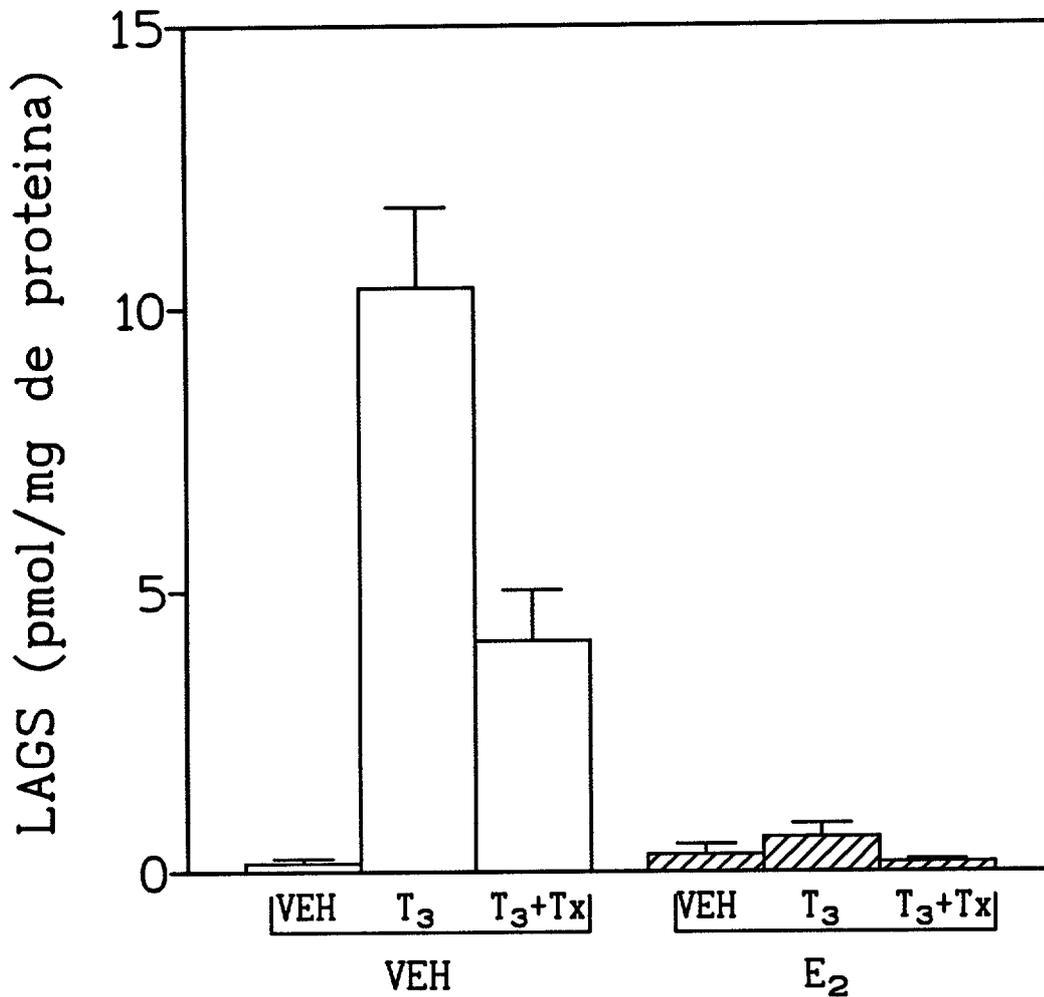


Figura 14. Capacidad del Tamoxifeno para bloquear el efecto inhibitor del estradiol sobre la expresión de LAGS en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados. Grupos de ratas machos adultas fueron tratadas con PTU durante 7 semanas, al comenzar la quinta de las cuales fueron además orquidectomizadas e implantadas, un grupo con una cápsula conteniendo vehículo (VEH) y otro grupo con Benzoato de Estradiol (E<sub>2</sub>). Durante la última semana de tratamiento con PTU, cada uno de estos grupos se dividió en subgrupos que fueron tratados con vehículo (VEH), T<sub>3</sub> (T<sub>3</sub>) o T<sub>3</sub> más Tamoxifeno (T<sub>3</sub>+Tx).

#### 4.15. EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAGS EN MACHOS ADULTOS HIPOTIROIDEOS Y ORQUIDECTOMIZADOS TRATADOS CON hGH.

Dados los resultados de los experimentos anteriores, debíamos seguir usando el mismo modelo animal: la rata macho Lewis adulta hipotiroidea y orquidectomizada, pues se había mostrado como el modelo ideal para conocer la competición entre le estradiol y las hormonas tiroideas. Pero aún existía otra importante hormona implicada en la regulación del LAGS, tal y como previamente habíamos demostrado usando machos Lewis adultos hipotiroideos pero no orquidectomizados: la GH. Por otra parte, es importante considerar que en ratas hipotiroideas, la  $T_3$  induce la liberación de GH, y dado el efecto inductor que la GH tiene sobre el LAGS, el efecto frenador de la cápsula de estradiol sobre la acción estimulante de la  $T_3$  pudo haberse producido indirectamente a través del bloqueo de la producción de GH.

Sabíamos de la acción fuertemente inductora de el LAGS que poseía la hGH, pero desconocíamos si este efecto era capaz de ser bloqueado por el estradiol. Por ello, decidimos realizar un experimento encaminado a caracterizar la acción del estradiol sobre el modelo hipotiroideo y gonadectomizado tratado con hGH. Se usaron cuatro grupos de ratas que a los sesenta días de vida comenzaron a ser tratados con PTU en el agua de bebida, la gonadectomía e implante de la cápsula se realizó cuatro semanas después, y en esta situación continuaron tres semanas más. A dos

de esos grupos se le colocó una cápsula con vehículo y a los otros dos grupos se le implantó una cápsula con BE. Durante la última de las tres semanas que estuvieron con la cápsula, un grupo con vehículo y otro con BE recibieron además tratamiento con hGH (100  $\mu$ g/día, en tres dosis), mientras que sus correspondientes grupos controles sólo recibieron vehículo.

Los resultados se muestran en la Figura 15. En ella destaca cómo el tratamiento con hGH durante una semana fue suficiente para que el grupo en el que se había implantado una cápsula con vehículo expresase unos niveles de LAGS superiores a los del grupo con vehículo que no fue tratado con hGH ( $p < 0.001$ ). Por otra parte, en el grupo en el que se había colocado BE en la cápsula y recibió hGH no se apreció recuperación significativa del nivel de LAGS con respecto a su grupo control, que recibió hGH y cuya cápsula contenía solo vehículo ( $p < 0.01$ ). De aquí puede deducirse que el estradiol es capaz de frenar la acción estimuladora que posee la hGH sobre la expresión de LAGS, de una forma similar a como se antagoniza la inducción de LAGS por  $T_3$  en este mismo modelo animal, y que fue comentado anteriormente.

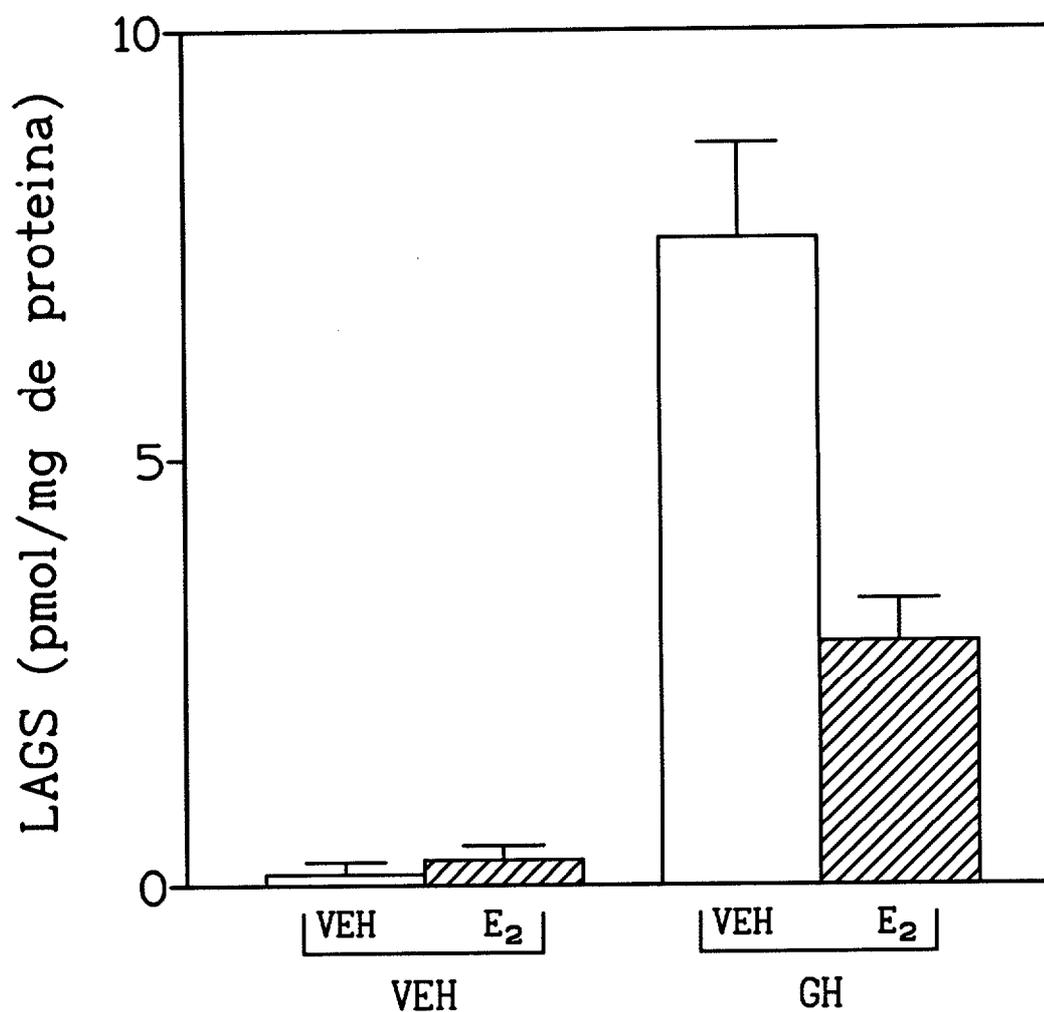


Figura 15. Efecto del estradiol sobre la expresión de LAGS en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados tratados con hGH. Grupos de ratas machos adultas fueron tratadas con PTU durante 7 semanas, al comenzar la quinta de las cuales fueron además orquidectomizadas e implantadas con una cápsula conteniendo vehículo (VEH) o Benzoato de Estradiol (E<sub>2</sub>). Durante la última semana de tratamiento con PTU la mitad de los grupos recibió tres inyecciones diaria de hGH (GH) y la otra mitad vehículo (VEH).

#### **4.16. EFECTO DEL ESTRADIOL EN MACHOS ADULTOS HIPOTIROIDEOS Y ORQUIDECTOMIZADOS TRATADOS CON hGH Y HORMONAS TIROIDEAS.**

A pesar de estos satisfactorios resultados, aún debíamos estudiar la interrelación que podía existir entre las hormonas tiroideas y la GH, con el objetivo de esclarecer si en presencia de estradiol, la GH y las hormonas tiroideas administradas conjuntamente tenían alguna implicación final sobre la expresión de LAGS. Además, parecía lógico usar el mismo modelo animal en el que ambas hormonas eran inhibidas por el estradiol.

Se usaron cuatro grupos, en idénticas condiciones de hipotiroidismo y gonadectomía que los usados en los experimentos anteriores, la mitad con cápsula de BE y la otra mitad sólo con vehículo. Un grupo con BE y otro con vehículo recibieron hGH y T<sub>3</sub> (a las dosis ya usadas) durante la última semana. Los otros dos grupos recibieron el correspondiente vehículo. El sacrificio tuvo lugar ocho horas después de la última inyección de hGH.

Los resultados se muestran en la Figura 16a, en la cual y a efectos comparativos, se ilustran también los resultados obtenidos al administrar por separado la hGH y la T<sub>3</sub>. En esta figura se aprecia cómo al administrar conjuntamente la hGH y la T<sub>3</sub>, el BE es capaz de competir con ambos, dando una significación muy alta con respecto a su control cuya cápsula contenía sólo vehículo ( $p < 0.001$ ). De este conjunto de datos resalta cómo una cantidad muy pequeña de estradiol, que

genera unos niveles plasmáticos situados muy cerca del límite de detección por RIA, es capaz de inhibir la expresión de esta proteína hepática en franca competición con los potentes efectos inductores proporcionados por la GH y las Hormonas Tiroideas, tanto por separado como en combinación.

Paralelamente, nos pareció interesante estudiar la incidencia que los tratamientos hormonales administrados pudiera tener sobre el peso de los animales de estos grupos experimentales, y ello porque la tendencia natural de las ratas tratadas con hGH es tener ganancia de peso, pero nos intrigaba el efecto que el BE a estas dosis tan bajas podía tener sobre el peso de los animales de experimentación. Los resultados se pueden observar en la Figura 16b. En ella se advierte cómo los grupos con cápsula conteniendo vehículo en general adquieren más peso que los que tenían BE en su cápsula, aunque la única diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) que se apreció fue la existente entre los grupos con cápsulas de vehículo y cápsula de BE tratados con hGH. Quizás una semana sea poco tiempo de tratamiento con hGH para que se manifiesten diferencias mayores.

Por idénticas razones, también se estudió el peso del hígado en los mismos grupos experimentales. Los resultados se muestran en la Figura 16c, y en ella se aprecia también un mayor peso hepático en los grupos cuya cápsula contenía vehículo, y nuevamente, la única diferencia significativa apareció entre los grupos con cápsula conteniendo vehículo frente a los que contenían BE en su cápsula y que fueron ambos tratados con hGH ( $p < 0.05$ ).

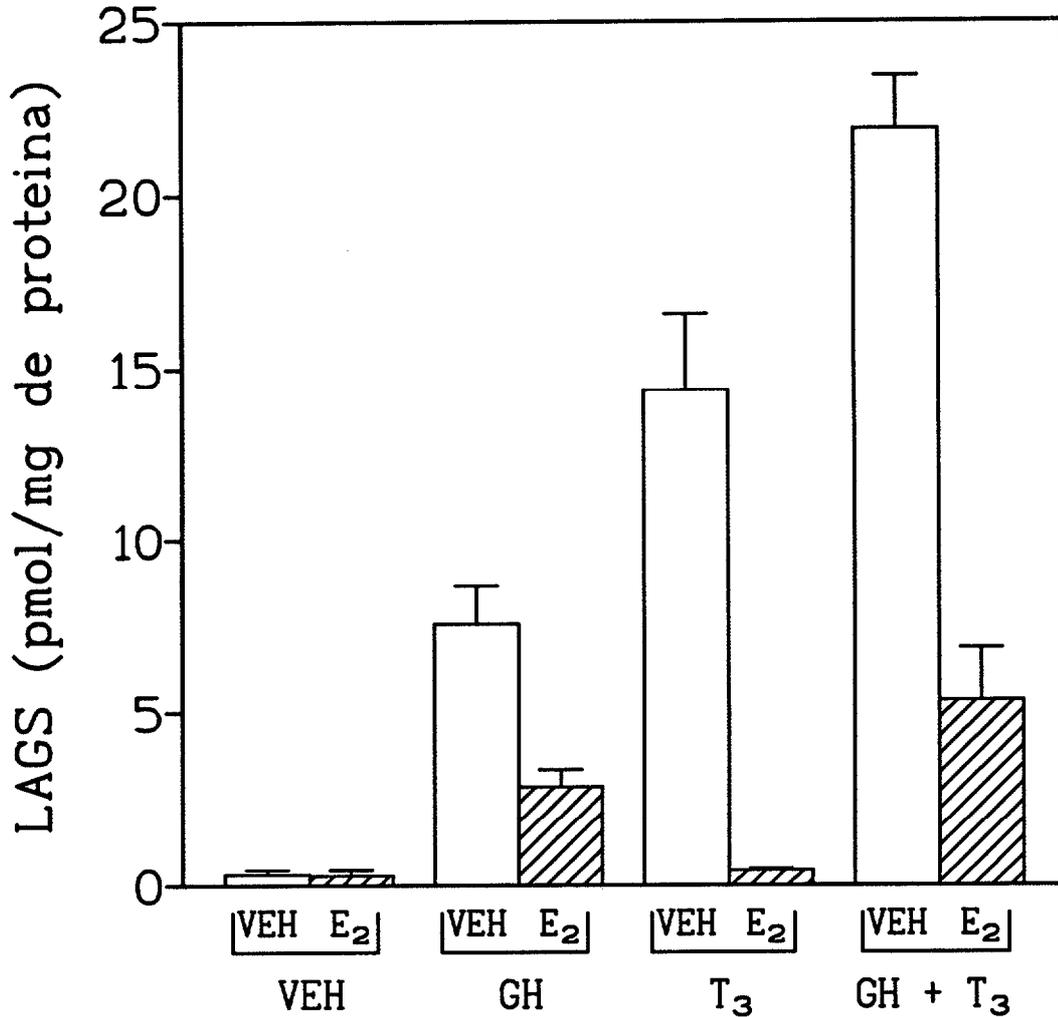


Figura 16a. Efecto del estradiol sobre la expresión de LAGS en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados tratados con hGH y con Hormonas Tiroideas. Grupos de ratas macho adultas fueron tratadas con PTU durante 7 semanas, al comenzar la quinta de las cuales fueron además orquidectomizadas e implantadas con una cápsula conteniendo vehículo (VEH) o Benzoato de Estradiol (E<sub>2</sub>). Durante la última semana de administración del PTU se establecieron cuatro grupos de tratamiento que fue aplicado a un grupo con cápsula con vehículo y a un grupo con Benzoato de Estradiol: el primero sirvió como control y recibió una inyección diaria de vehículo (VEH), el segundo recibió tres inyecciones diaria de hGH (GH), el tercero una inyección diaria de T<sub>3</sub> (T<sub>3</sub>) y el cuarto la combinación de los dos tratamientos anteriores (GH+T<sub>3</sub>).

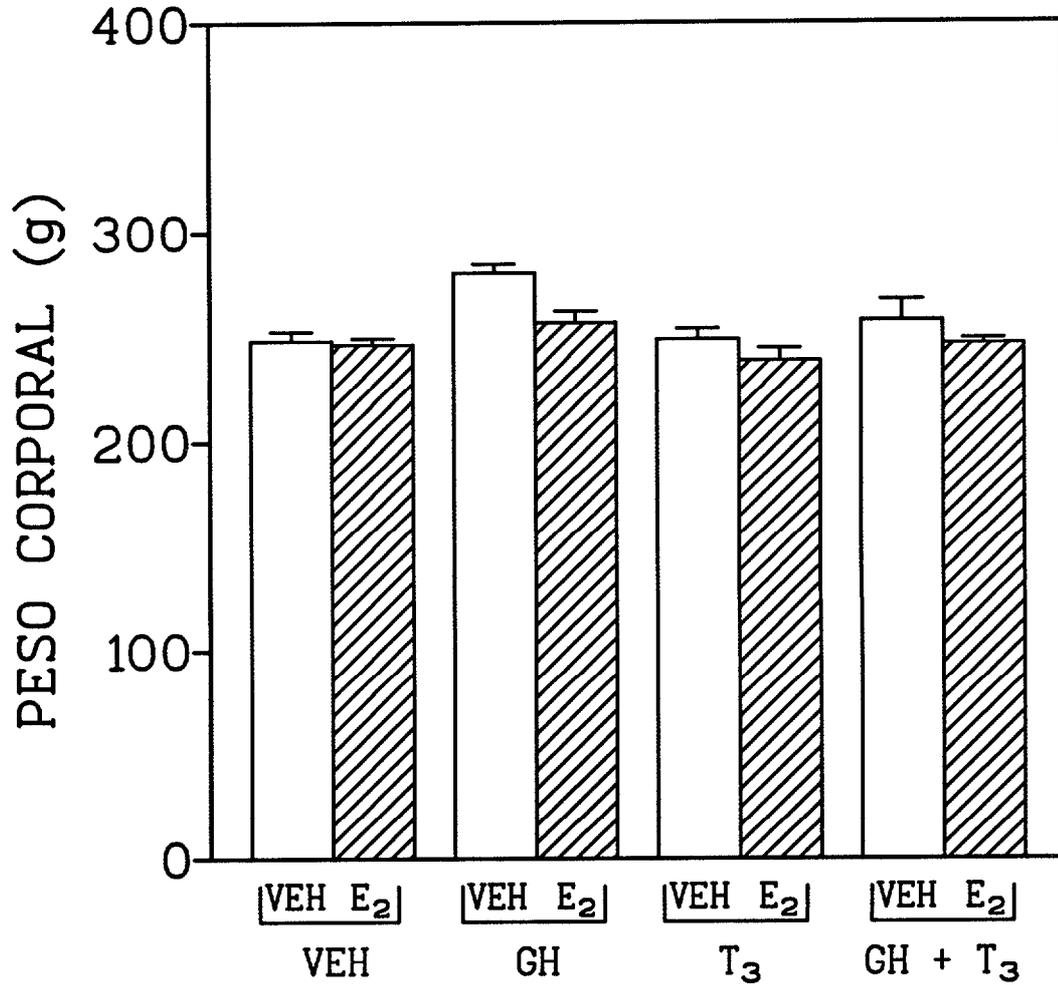


Figura 16b. Efecto del estradiol sobre el Peso Corporal en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados tratados con hGH y con Hormonas Tiroideas. El peso fue cuantificado en el momento del sacrificio. Los grupos de este experimento se identifican con los de la figura anterior (16a).

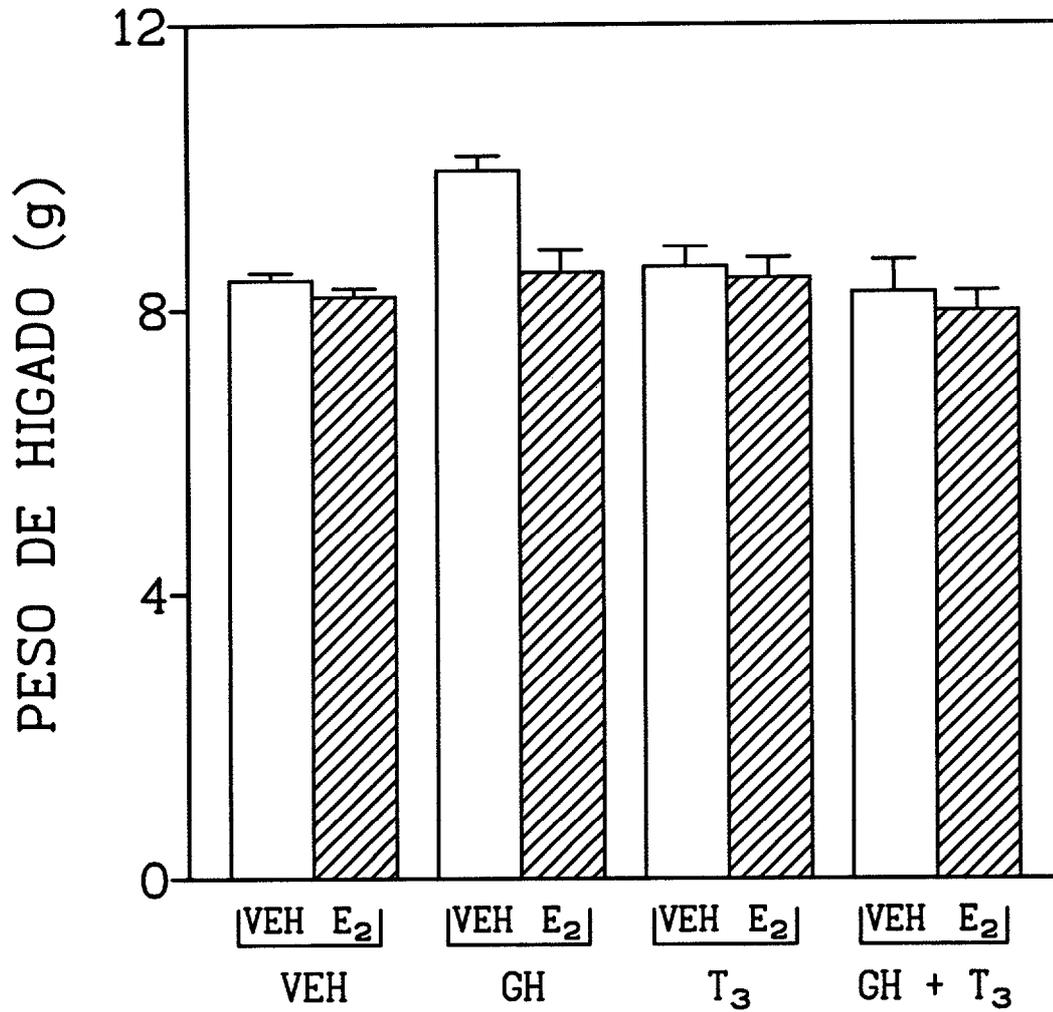


Figura 16c. Efecto del estradiol sobre el Peso del Hígado en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados tratados con hGH y con Hormonas Tiroideas. El peso fue cuantificado en el momento del sacrificio. Los grupos de este experimento se identifican con los de las figuras anteriores (16a y 16b).

#### **4.17. EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE EL RECEPTOR DE ESTRADIOL EN MACHOS HIPOTIROIDEOS Y ORQUIDECTOMIZADOS TRATADOS CON GH Y HORMONAS TIROIDEAS.**

En el modelo animal usado en estos experimentos, quedó clara la capacidad del estradiol para competir con las hormonas tiroideas y con la GH en la regulación endocrina de la expresión de LAGS. El mecanismo íntimo mediante el cual el estradiol es capaz de ejercer este efecto represor no fue abordado en ningún momento, sin embargo, parecía lógico investigar los niveles de Receptor de Estradiol (RE) en el hígado, en primer lugar porque el RE y el LAGS coincidían en muchos aspectos en cuanto a su regulación (en ambas entidades están involucradas la GH y las hormonas tiroideas), en segundo lugar, la concentración de BE usada en estos experimentos era realmente baja, lo que induce a creer que su efecto está mediado por el RE.

En primer lugar, y tras poner a punto la metodología para el estudio del RE hepático, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos, se cuantificó el RE en un grupo de machos Lewis adultos intactos. Los resultados se pueden apreciar en el análisis de Scatchard que se muestra en la Figura 17a, de la que se desprende que los machos Lewis adultos contienen RE a una concentración de unos 80 fmol/mg de proteína y con una Kd en torno a 1 nM.

A continuación, decidimos investigar si los tratamientos administrados en los últimos experimentos tenían alguna incidencia sobre la expresión de RE. Para ello

usamos citosoles de los grupos experimentales mencionados y que en su cápsula contenían sólo vehículo. Los resultados se muestran en la Figura 17b, en ella se observa como con todos los tratamientos usados se produce un significativo incremento del RE ( $p < 0.01$ ) al compararlos con el grupo control que fue tratado sólo con vehículo.

En segundo lugar, parecía lógico indagar sobre la incidencia que la cápsula, conteniendo tan escasa cantidad de estradiol, podía tener sobre su propio receptor, pues está descrito por otros autores que el estradiol es capaz de estimular la síntesis de su propio receptor en el hígado (Barton y Shapiro, 1.988), pero esto ha sido descrito usando dosis de 2mg de Estradiol, que es mucho más alta que la aquí usada. Nuevamente se usaron los citosoles de los grupos experimentales anteriores, pero esta vez los que contenían BE en su cápsula. Los resultados se pueden apreciar en la Figura 17c. De los resultados de este experimento destaca que a pesar de los tratamientos administrados en ninguno de los grupos se aprecia diferencia significativa con respecto al control que sólo recibió vehículo, y los otros grupos entre sí. De todo ello, se puede concluir que esa mínima cantidad de estradiol incorporada a la cápsula, no es capaz de estimular la expresión del RE, y esto ocurre incluso cuando se combina con la GH y las hormoans tiroideas.

En la Figura 17d, se agrupan los resultados de los dos experimentos anteriores por grupos de tratamiento, y el estudio estadístico nos muestra cómo los grupos que fueron tratados con hGH (con o sin  $T_3$ ) y que contenían vehículo en su cápsula

### *Resultados*

poseen una mayor concentración de RE ( $p < 0.05$ ) que aquellos grupos con igual tratamiento pero que fueron además tratados con BE. De los resultados anteriores, se puede deducir que el estradiol, a las bajas dosis usadas, inhibe la estimulación por GH de su propio receptor.

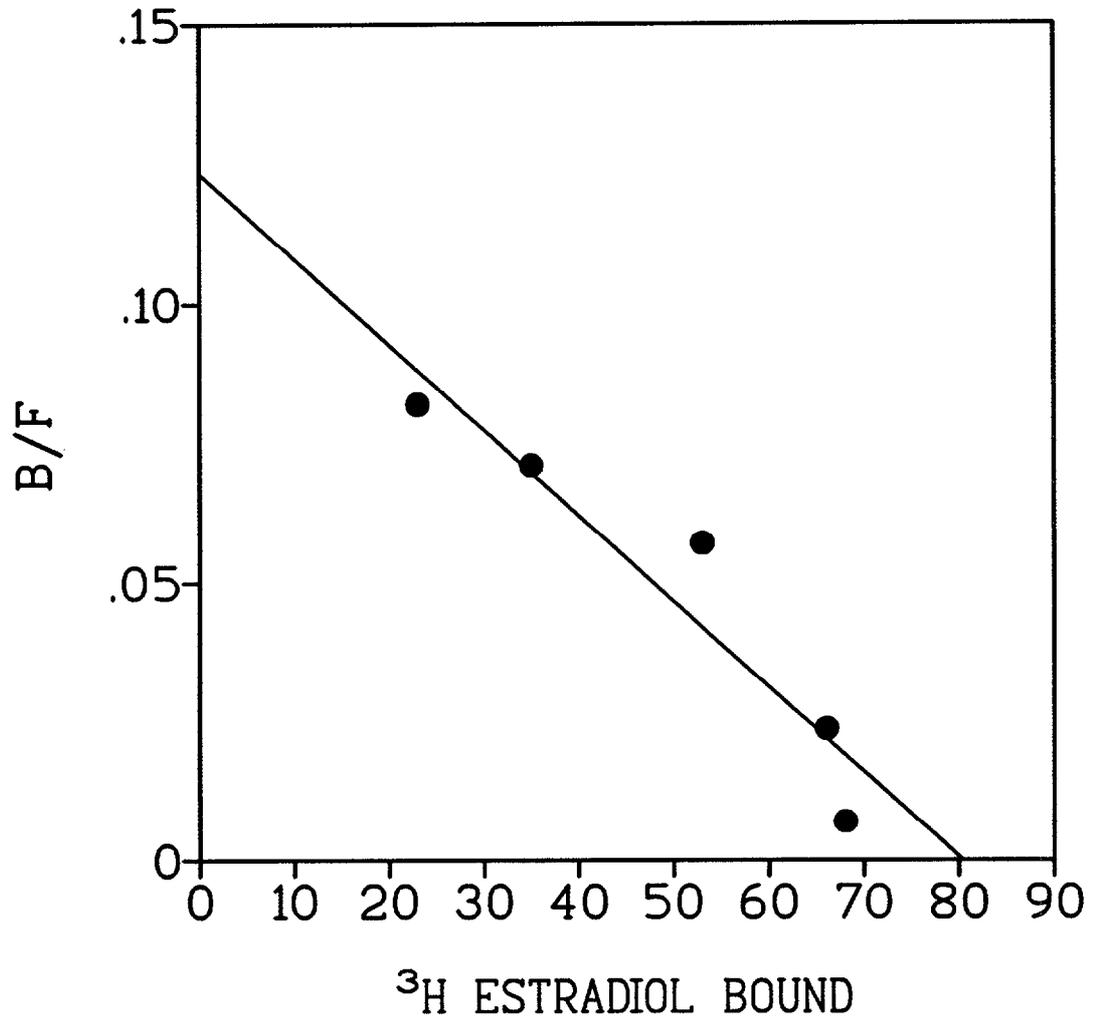


Figura 17a. Representación de Scatchard de la interacción entre el  $^3\text{H}$  Estradiol y el Receptor hepático de Estradiol.

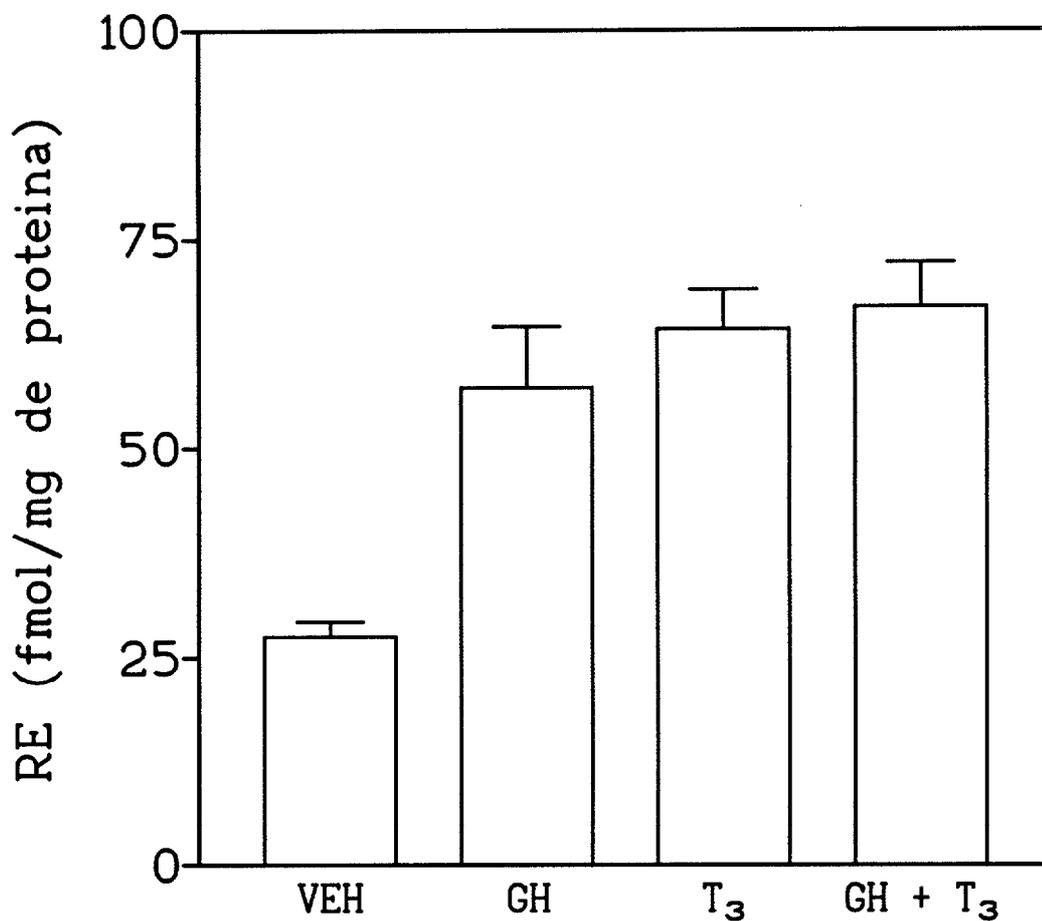


Figura 17b. Niveles de Receptor de Estradiol en machos adultos hipotiroideos y orquitectomizados tratados con hGH y Hormonas Tiroideas. Grupos de ratas machos adultas fueron tratadas con PTU durante 7 semanas, al comenzar la quinta de las cuales fueron además orquitectomizadas e implantadas con una cápsula conteniendo vehículo. Durante la última semana de tratamiento con PTU un primer grupo recibió una inyección diaria de vehículo (VEH), el segundo recibió hGH en tres dosis diarias (GH), el tercero T<sub>3</sub> en una sola inyección (T<sub>3</sub>), y el cuarto una combinación de estos dos últimos tratamientos (GH + T<sub>3</sub>).

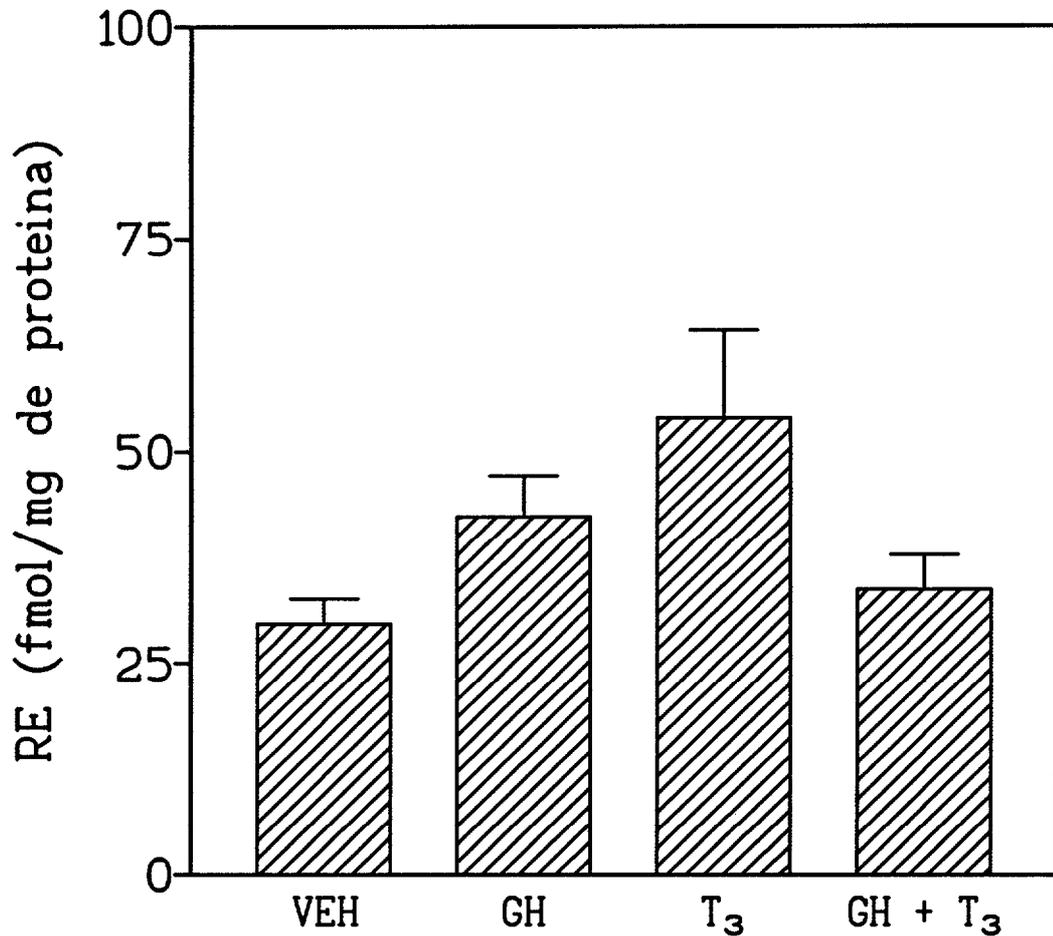


Figura 17c. Niveles de Receptor de Estradiol en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados tratados con hGH y Hormonas Tiroideas. Grupos de ratas machos adultas fueron tratadas con PTU durante 7 semanas, al comenzar la quinta de las cuales fueron además orquidectomizadas e implantadas con una cápsula conteniendo Benzoato de Estradiol. Durante la última semana de tratamiento con PTU un primer grupo recibió una inyección diaria de vehículo (VEH), el segundo recibió hGH en tres dosis diarias (GH), el tercero T<sub>3</sub> en una sola inyección (T<sub>3</sub>), y el cuarto una combinación de estos dos últimos tratamientos (GH + T<sub>3</sub>).

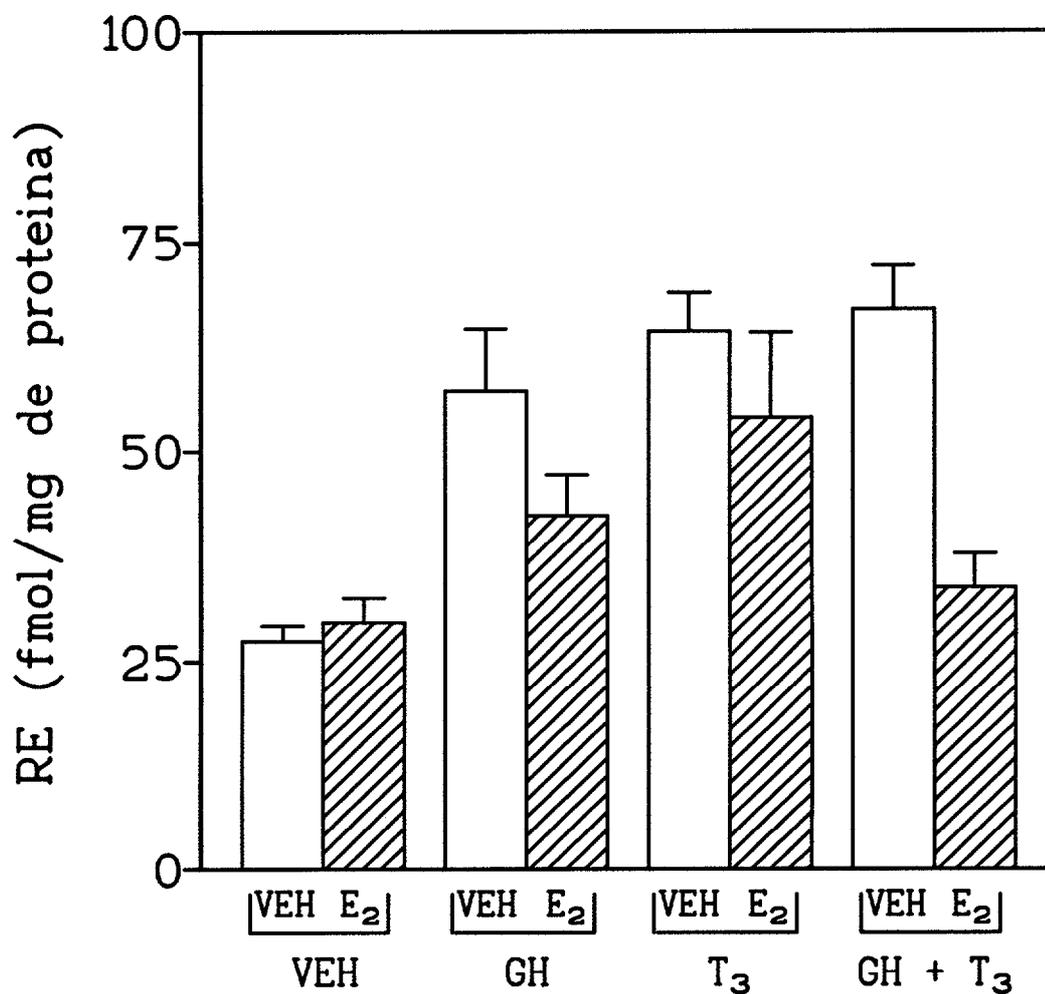


Figura 17d. Niveles de Receptor de Estradiol en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados tratados con hGH y Hormonas Tiroideas. Los grupos se identifican con los de las dos figuras anteriores (17b y 17c).

# DISCUSION

En este trabajo se ha pretendido, por una parte, profundizar en la regulación endocrina del LAGS, intentando desentrañar el papel que, de forma aislada, poseen la GH y las hormonas tiroideas, y por la otra, estudiar las causas de su expresión dimórfica, y en particular, el papel que las hormonas sexuales desempeñan en ella.

### **5.1. PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS Y DE LA GH EN LA REGULACION ENDOCRINA DEL LAGS.**

Los primeros experimentos sobre regulación endocrina del LAGS se desarrollaron en ratas Sprague-Dawley. Mediante el uso de diversas manipulaciones endocrinas y de distintos tratamientos hormonales, pudo llegarse a demostrar qué hormonas participaban en su regulación. Sin embargo, los modelos animales usados, que fueron fundamentalmente ratas hipotiroideas y ratas hipofisectomizadas, presentaban más de un déficit hormonal; así la rata hipotiroidea era no sólo deficiente en hormonas tiroideas, sino también en GH, y la rata hipofisectomizada presentaba además un importante déficit de secreción de glucocorticoides, amén de otras hormonas.

De lo anteriormente comentado, resulta evidente que estos modelos utilizados, si bien permitieron desentrañar la regulación endocrina, no permitían sopesar el efecto que tenían las hormonas implicadas por separado, o la influencia que ejercían sobre

otros aspectos de la regulación del LAGS tales como su ontogenia.

Una solución a este inconveniente surgió de la incorporación a nuestras investigaciones de la rata Lewis enana, que presenta únicamente un déficit aislado de GH, mientras que el resto de los parámetros endocrinos se hallan dentro del rango de la normalidad. Mediante el uso de esta cepa mutante, se ha podido dilucidar el papel que la GH juega en la expresión del LAGS. Así, el nivel de esta proteína está notablemente disminuída en la rata Lewis enana, y aumenta de concentración tras la administración de esta hormona, de una forma proporcional a la dosis usada. Estos resultados indican claramente que la GH participa en condiciones fisiológicas en el mantenimiento de unos niveles adecuados de LAGS, si bien no resulta imprescindible para que estos puedan ser expresados por el animal.

La GH humana es capaz de interactuar en la rata, tanto con el receptor de GH como con el receptor de prolactina. Por ello, existe la posibilidad de que su efecto sea más un efecto prolactínico que somatotropo (Norstedt, 1982). No obstante, el hecho de que las ratas enanas, cuya secreción de prolactina es normal, expresen unos bajos niveles de LAGS, habla en favor de la hipótesis de que el efecto de la GH es directo y no mediado por el receptor de prolactina. De igual forma, las ratas hipotiroideas tienen unos niveles normales de prolactina, y sin embargo, la concentración de LAGS es muy baja (Peake et al., 1973) . Estos hallazgos permiten conjeturar que la GH humana ejerce su efecto actuando sobre los propios

receptores de GH. No obstante, el uso de GH de otras especies, sin efectos prolactínicos, tal como la GH bovina, permitirá resolver cualquier clase de duda que quede al respecto.

En todas las cepas estudiadas, la expresión de LAGS siguió una evolución similar en función de la edad del animal. Esta coincidencia en la ontogenia induce a pensar que la GH, si bien es necesaria para que el LAGS alcance una adecuada concentración en la vida adulta, no es la responsable de que éste comience a expresarse sólo a partir de la cuarta semana de vida. Habrá, por consiguiente, que buscar entre otras hormonas a la responsable de tal proceso, y quizá sean las hormonas tiroideas las candidatas más firmes. Durante la etapa inmadura del animal existe una situación de hipotiroidismo fisiológico, que se ve normalizado en las primeras semanas de vida (Dussault y Labrie, 1975). Esta situación, dada su coincidencia con el retraso en la expresión del LAGS puede ser la responsable del mismo. Por otra parte, no debe olvidarse el hecho de que la ausencia de hormonas tiroideas abate la expresión de LAGS en el animal adulto, lo que indica la importancia de estas hormonas. En estudios previos (R. Chirino, Tesis Doctoral, 1990), pudo demostrarse que la administración de hormonas tiroideas a ratas inmaduras tenía un efecto inductor del LAGS, lo que refuerza la hipótesis comentada previamente.

Una vez estudiado experimentalmente el papel que la GH juega en la regulación del LAGS, consideramos de interés estudiar el efecto que el hipotiroidismo y la ulterior administración de hormonas tiroideas y/o de GH podían tener sobre la expresión

de LAGS en estas ratas, todo ello en un intento por profundizar en el papel de las hormonas tiroideas.

En la rata enana, el hipotiroidismo abatió completamente el nivel de LAGS, lo cual puede ser interpretado en el sentido de que en este modelo experimental, existe un importante déficit de las dos principales hormonas encargadas de su regulación: las hormonas tiroideas y la GH. El tratamiento de estas ratas, tanto con hormonas tiroideas como con GH, fue capaz de restaurar total o parcialmente su nivel. De otra parte, la administración conjunta de  $T_3$  a una dosis alta, y de GH, demostró poseer un cierto efecto antagónico, el cual ya ha sido descrito por nuestro grupo en ratas hipofisectomizadas (Chirino et al. 1994).

En las ratas Lewis no enanas, el efecto del hipotiroidismo fue mucho menos drástico, ya que la concentración de LAGS sólo se redujo en un 70%. Esta discordancia entre ambas cepas puede ser explicada por el déficit innato de secreción de GH que presenta la rata enana, lo que unido a una situación de hipotiroidismo provoca un total abatimiento de la expresión de LAGS.

Curiosamente, en las ratas Lewis no enanas sólo pudo demostrarse un leve efecto antagónico entre la GH y la  $T_3$  cuando esta última fue administrada a una dosis alta. La explicación a esta diferente respuesta quizá haya que buscarla en el déficit constitutivo de expresión de GH de la rata enana, el cual ha podido ejercer influencia en esta respuesta.

A la luz de los hallazgos anteriormente comentados, se hace necesario concluir que de las tres hormonas que participan en la regulación del LAGS, las hormonas tiroideas son las que poseen una mayor relevancia. La GH es necesaria para una adecuada expresión del LAGS pero no influye en su ontogenia. Las hormonas tiroideas son asimismo esenciales para esta expresión pero, además, son los principales candidatos para explicar porqué el LAGS sólo comienza a expresarse a partir de la cuarta semana de vida. Por último, el papel de los glucocorticoides parece ser más bien permisivo, creando un ambiente favorable para la actuación de las hormonas tiroideas y la GH. Este papel permisivo ha sido postulado para la expresión de otras proteínas hepáticas sujetas a regulación multihormonal, como por ejemplo, el Receptor de Estrógenos, del que se hablará más adelante en esta discusión.

## **5.2. ESTUDIO DEL DIMORFISMO SEXUAL EN LA EXPRESION DE LAGS.**

Los estudios sobre LAGS siempre se han realizado en ratas macho. Omrani et al. (1983), son los primeros en publicar la existencia de un dimorfismo sexual en la expresión de esta proteína. Utilizando ratas Sprague-Dawley, ellos demostraron que tal expresión estaba confinada al sexo masculino. En nuestro laboratorio se habían realizado una serie de investigaciones que indicaban que en las ratas Sprague-Dawley hembras, la expresión del LAGS era errática, de forma que mientras que

algunas de ellas lo expresaban, incluso de manera abundante, en otras tal expresión estaba ausente o era muy baja. Esta concentración tan dispar no guardaba relación con el ciclo estral del animal (R. Chirino, Tesis Doctoral, 1990). La enorme dispersión de datos que existía en la experimentación con estas ratas, nos hizo bien pronto desistir de llevar a cabo una investigación exhaustiva en este sentido.

Resulta llamativa la contradicción existente entre los estudios de Omrani y los de nuestro grupo. Hasta la fecha, no se ha podido encontrar una solución lógica a la misma. Sin embargo, dado el importante número de ratas hembra que fueron procesadas en su día por nosotros (algo más del medio centenar), nos inclinamos más por la validez de nuestros resultados, y consideramos que los resultados tan bajos mostrados por Omrani, que fueron obtenidos en unos pocos animales, fueron más un fruto de la casualidad.

Cuando comenzó a estudiarse la abundancia de LAGS en ratas hembras de otras cepas, como la Lewis o la Wistar, pudo demostrarse una mayor homogeneidad en los resultados que los obtenidos con la cepa Sprague-Dawley, de forma que en estos animales, la expresión de LAGS era muy baja o incluso nula. Por ello, consideramos de interés centrarnos en el estudio de este dimorfismo sexual en la cepa Lewis, con el fin de averiguar las causas que lo provocaban.

En una primera aproximación, decidimos investigar el efecto de la gonadectomía neonatal y de la administración de la hormona sexual contraria en la cepa Lewis. En trabajos precedentes, se había demostrado que esta manipulación provocaba un cambio en los patrones de secreción de determinadas hormonas hipofisarias, entre ellas de la GH, y que este cambio estaba relacionado con la expresión diferencial en cuanto al sexo, de determinadas proteínas hepáticas, tales como algunas isoformas del citocromo P-450. Puesto que la GH estaba implicada en la regulación del LAGS, consideramos de sumo interés realizar un experimento en este sentido.

Los resultados obtenidos en estas ratas fueron altamente positivos, ya que las ratas hembra gonadectomizadas en el nacimiento y tratadas o no con testosterona, presentaron una concentración de LAGS similar a la exhibida por las ratas macho. Sin embargo, este efecto pudo asimismo ponerse de manifiesto cuando las ratas fueron gonadectomizadas en edades más tardías, lo que indicaba claramente que no era el patrón de secreción de GH quien influenciaba la expresión de LAGS, sino que algún factor ovárico, presumiblemente los estrógenos, era el responsable directo de la represión de la expresión de LAGS en la rata hembra.

Para demostrar tal posibilidad se utilizó la rata macho Lewis castrada, a la que se le implantó una cápsula de silastic conteniendo una mínima cantidad de estradiol. En este modelo experimental, esta hormona, aún a pesar de su baja dosificación,

en el rango de lo fisiológico para ratas hembra, fue capaz de provocar una importante inhibición de la concentración de LAGS. Parecía evidente que era el estradiol quien en concentraciones fisiológicas era el responsable de la baja expresión de LAGS en la rata hembra. Esta hipótesis se ve refrendada por el hecho de que los implantes de progesterona, la otra hormona esteroide ovárica, no provocaron ningún efecto.

Llegados a este punto, resulta necesario hacer el siguiente inciso. Nuestro grupo ha sido pionero en demostrar que los estrógenos poseen una intensa capacidad de inducción del LAGS. Este efecto pudo ponerse de manifiesto en diversos modelos experimentales, tales como la rata inmadura, la rata hipotiroidea o la rata hipofisectomizada, que poseían la característica común de presentar unos niveles muy bajos o indetectables de LAGS. Ello dio pie a la hipótesis de que el efecto de los estrógenos era directo e independiente del status endocrino del animal (Chirino et al. 1992, Fernández et al. 1994). La inducción del LAGS por estrógenos era tiempo y dosis dependiente, ya que se requerían al menos tres días de tratamiento con estas hormonas y dosis farmacológicas de las mismas, iguales o superiores a 1 mg/kg/día para que pudiera ponerse de manifiesto.

En los resultados que aquí se discuten, el estradiol fue aplicado en cápsula de silastic, y cada cápsula contenía tan sólo 25  $\mu$ g de hormona, lo que originaba al cabo de tres semanas unos niveles plasmáticos muy parecidos a los observados en ratas hembra normales. Por tanto, parece lógico argumentar que la aparente

disparidad de acciones llevadas a cabo por el estradiol en cuanto a la expresión de LAGS, obedece a la enorme diferencia existente en cuanto a la dosis usada, además del tiempo de tratamiento.

Cuando se estudian los efectos que desarrolla el estradiol sobre el hígado, se usan habitualmente dosis muy altas de este esteroide, en torno a 5 mg/kg de peso. Esta dosis es la que ha sido usada, por ejemplo, para estudiar la inducción por estradiol del receptor de LDL o la del angiotensinógeno (Ma et al., 1986; Klett et al., 1992). Dosis un orden de magnitud inferiores, posiblemente, no desarrollen ese efecto. La necesidad de que se requieran dosis tan altas de estrógenos para demostrar estos efectos, ha sido justificada en el sentido de que el hígado es un órgano con una intensa actividad metabolizadora de esteroides, y que se requieren altas dosis de estrógeno para provocar la traslocación del receptor al núcleo de la célula (Eisenfield et al., 1.976; Aten et al., 1.978).

Un efecto tan evidente como el que aquí se describe, acerca de la represión de la expresión de LAGS, desarrollado por una dosis tan exígua de estrógeno, es un caso pocas veces descrito en la literatura, y rompe un poco con la idea preconcebida de que se requieren altas dosis de estrógenos para que se pueda lograr una respuesta hepática evidente. Uno de los pocos trabajos publicados al respecto es el de Murphy y Friesen (1988), donde demuestran que dosis muy bajas de estradiol (0,1 ó 1  $\mu$ g/rata/día) estimulan la síntesis uterina de IGF-I, al tiempo que frenan su síntesis hepática inducida por la administración de GH.

En nuestra opinión, y basándonos en las dosis utilizadas, el efecto fisiológico de los estrógenos sobre el hígado es el de frenar la expresión de LAGS, y habida cuenta de la dosis usada, es muy probable que este efecto esté mediado por el receptor de estrógenos. El mecanismo por el cual altas dosis de estrógeno desarrollan el efecto contrario, es por ahora desconocido, y se requerirán futuras investigaciones para desentrañarlo.

El efecto represor del estradiol pudo ponerse también de manifiesto en ratas hipotiroideas tratadas con GH y/o con hormonas tiroideas. Este hallazgo se nos antoja de capital importancia por cuanto es indicativo de la capacidad del estradiol de antagonizar el efecto estimulante que poseen las hormonas tiroideas y la GH. Por otra parte, el efecto del estradiol fue más general, ya que no sólo influyó en la expresión del LAGS, sino que también afectó a otros parámetros como por ejemplo, el peso corporal o el peso del hígado. En ratas hipotiroideas, la administración de GH, sólo o en conjunción con dosis bajas de  $T_3$ , causó un incremento significativo de la concentración de LAGS, del peso corporal y del peso del hígado. La administración concomitante de estradiol a estas ratas fue capaz de evitar estos efectos. Curiosamente, el antiestrógeno tamoxifeno fue incapaz de bloquear el efecto negativo del estradiol, hecho que por otra parte puede verse justificado porque este fármaco es en realidad un agonista estrogénico parcial, y a nivel hepático, sus acciones parecen ser más estrogénicas que antiestrogénicas, al menos, en lo que se refiere al metabolismo de las lipoproteínas (REFERENCIA).

Tal y como fue comentado previamente, hace unos años se publicó un interesante trabajo en el que se demostraba que la administración de bajas dosis de estradiol tenía un efecto contrapuesto sobre la síntesis de IGF-I mediada por la GH (Murphy y Friesen, 1988). Así, mientras que en el útero estimulaba su expresión, ésta era frenada a nivel hepático. Puesto que el hígado es la principal fuente de IGF-I plasmático, la inhibición de su síntesis por dosis bajas de estradiol podría ser la responsable de la no ganancia de peso en estos animales, aún estando estos tratados con GH, y esto a su vez, podría explicar la diferencia encontrada en cuanto al peso del hígado. Resulta llamativa la coincidencia en los resultados de Murphy y los nuestros, aún a pesar de que el modelo experimental era completamente distinto. Murphy utilizó ratas hembra Sprague-Dawley castradas e hipofisectomizadas, mientras que nosotros usamos ratas macho castradas e hipotiroideas.

Sin embargo, el IGF-I no parece estar implicado en la regulación del LAGS, ya que tanto el ayuno como la diabetes inducida por estreptozotocina, dos circunstancias capaces de provocar una importante caída de la concentración plasmática de IGF-I, tuvieron muy poco efecto sobre la expresión de LAGS (Chirino et al., 1991).

Sea como fuere, el mecanismo mediante el cual el estradiol es capaz de antagonizar la inducción del LAGS mediada por la GH o las hormonas tiroideas, precisará de un minucioso estudio en el futuro, en el cual se pretenden incluir otros parámetros de respuesta, tales como el propio IGF-I, o el receptor de LDL.

Otro aspecto en el que merece la pena profundizar es en el efecto antagónico que ejercen la testosterona y el estradiol en el control del LAGS. La testosterona, por sí misma, no parece necesaria para que ésta proteína sea expresada, ya que la orquidectomía, aún realizada en diversas etapas de la vida del animal, no disminuyó su concentración. Antes, al contrario, ésta tendió a aumentar de forma significativa. Esta no participación testicular en la expresión del LAGS está en clara contraposición con la de otras proteínas hepáticas específicas del sexo masculino, tales como la  $\alpha_{2u}$  globulina, en donde se requiere la presencia de testosterona para que su expresión tenga lugar (Roy et al., 1974).

La implantación de una cápsula de silastic conteniendo estradiol a ratas macho Lewis intactas careció de efecto negativo sobre la expresión de LAGS. De igual forma, la administración conjunta de testosterona y de estradiol tuvo mucho menor efecto que la administración de estradiol sólo. Por ello, el efecto que desarrolla la testosterona parece ser más bien permisivo, y capaz de antagonizar el efecto represor que provoca el estradiol.

Los efectos de las diferentes manipulaciones endocrinas y las reposiciones hormonales antes comentadas, no se ciñeron exclusivamente al estudio de la expresión de LAGS. Otro parámetro que también se consideró de interés estudiar fue el contenido hepático del receptor de estrógeno en todas estas situaciones, ya que éste era un parámetro que podía estar íntimamente ligado a este proceso.

En ratas hipotiroideas, la expresión del receptor de estrógeno estaba sumamente deprimida, y el tratamiento con GH y/o hormonas tiroideas fue capaz de hacerlo incrementar de concentración, hecho éste que ha sido descrito previamente y que han permitido demostrar que el receptor estrogénico hepático es una proteína regulada multihormonalmente, y en la que participan la GH, las hormonas tiroideas y los glucocorticoides.

Sin embargo, lo que sí resultó llamativo fue la disminución del contenido de receptor de estrógeno motivado por la administración de estradiol a ratas hipotiroideas y tratadas con GH y/o hormonas tiroideas. En este sentido, resulta interesante comentar que hay diversos trabajos en la literatura que demuestran que el receptor de estrógeno hepático es inducido por la administración de estradiol (Barton y Shapiro, 1.988). Una posible solución a esta aparente discordancia entre nuestros resultados y los publicados por otros autores, puede derivar de la dosis usada de estradiol. Para demostrar tal inducción, estos autores utilizaron dosis de varios miligramos de estradiol por kilogramo de peso. En nuestra investigación, la dosis de estradiol, tal y como se ha repetido con anterioridad, provocaron unos niveles plasmáticos de esta hormona que se sitúan en el rango de lo fisiológico.

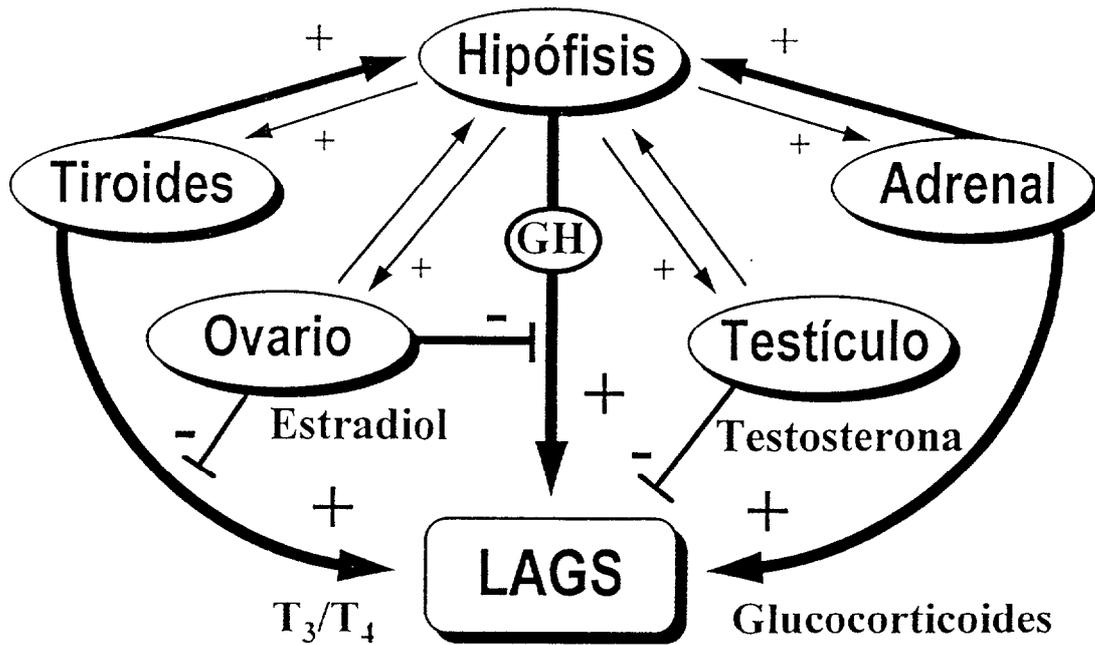
Resulta curioso observar que el efecto del estradiol parece ser idéntico, tanto en el caso del LAGS como en el caso de su propio receptor. Así, mientras que dosis altas parecen estimular la expresión de estas dos entidades, dosis bajas tienden a inhibirlas.

Aunque el LAGS no está relacionado con el receptor de estrógenos hepático, sí que resulta interesante comentar que ambas entidades poseen una regulación endocrina bastante similar. Sin embargo, en el caso del RE, la hormona que parece jugar un papel preponderante es la GH (Freyschuss et al., 1994). Por el contrario, en la regulación del LAGS, son las hormonas tiroideas las que parecen desempeñar el papel más relevante.

El efecto dual, dosis-dependiente, que ejerce el estradiol en la regulación del LAGS quizá involucre a otras proteínas hepáticas que se hallan bajo regulación estrogénica. Esta hipótesis de trabajo resulta sumamente atractiva y será objeto de un interés especial por nuestra parte en el futuro.

Y, ya para terminar, se propone el siguiente modelo de regulación hormonal del LAGS, que se esquematiza en la figura adjunta. La hipófisis regula la producción de hormonas tiroideas y de glucocorticoides. Estas hormonas, a su vez, actuarían sobre la glándula hipófisis promoviendo la secreción de GH. Las tres hormonas actuarían sinérgicamente regulando la expresión de LAGS en el hígado. En la rata hembra los niveles circulantes de estradiol serían capaces de frenar la expresión de LAGS, por lo cual se produciría el dimorfismo sexual en su expresión, que ya ha sido expuesto y discutido previamente. Por último, si bien la testosterona no parece regular la expresión de LAGS, sí que parece ejercer un efecto antagónico sobre el estradiol.

## LAGS: Regulación Multihormonal



5.3. A MODO DE EPILOGO, ¿CUAL ES EL PAPEL QUE DESEMPEÑAN LAS HORMONAS SEXUALES FEMENINAS EN EL MACHO?

Hasta fechas relativamente recientes, poco era lo que se sabía acerca del papel que

las hormonas sexuales femeninas endógenas poseían en el macho. Recientemente, han podido desarrollarse ratones knockout, con una alteración del gen del receptor de estrógeno. Estos animales, aunque viables, exhibían diversas anomalías. Así, las hembras presentaban, entre otras alteraciones, hipoplasia de sus órganos genitales e infertilidad. Curiosamente, los machos presentaban disminución de la densidad ósea y disminución de la producción de espermatozoides. (Lubhan et al., 1993).

Hace dos meses ha sido publicado un interesante trabajo acerca de un varón que presenta, de forma homocigota, una mutación en el gen del receptor de estrógeno. En este individuo, el ARNm del receptor de estrógeno no se traduce completamente, lo que da origen a una forma truncada del receptor que carece de actividad funcional. Este individuo, que actualmente cuenta veintiocho años de edad, es insensible a los estrógenos, y presenta, como signos más llamativos: talla elevada, ausencia de cierre del cartílago de crecimiento, osteoporosis, y unos niveles plasmáticos de IGF-I similares a los encontrados en la etapa puberal (Smith et al., 1994.).

Los hallazgos encontrados en animales knockout y en este individuo van a modificar completamente nuestra visión acerca del papel que juegan los estrógenos en el macho. A modo de ejemplo, hasta ahora se creía que el cierre del cartílago de crecimiento en el macho era provocado por la testosterona. Tras estos hallazgos, parece concebible que son los estrógenos endógenos los que, a pesar

de su baja concentración, son los encargados de llevar a cabo tan importante proceso. Puesto que la concentración plasmática de estrógenos en el macho es muy baja, no deja de resultar llamativo que estas hormonas sean capaces de desarrollar acciones tan importantes como las que aquí se han descrito.

Muchas veces, las acciones de los estrógenos sobre el organismo se han estudiado utilizando dosis excesivamente altas de los mismos, imposibles de alcanzar en ninguna condición fisiológica. Quizá, haya llegado la hora de comenzar a experimentar con dosis mucho más bajas de estradiol, al objeto de intentar delimitar claramente aquellos efectos que pueden considerarse como fisiológicos de aquellos otros que entrarían en el campo de lo puramente farmacológico.

# CONCLUSIONES

- 1.- La expresión de LAGS está significativamente disminuída en la rata Lewis enana, deficiente en Hormona de Crecimiento, con respecto a la rata Lewis normal. El tratamiento con esta hormona elevó significativamente su concentración, de una forma dosis-dependiente.
- 2.- Aunque la Hormona de Crecimiento es necesaria para que exista una concentración adecuada de LAGS, carece de participación en su ontogenia. Por ello, es muy probable que sean las hormonas tiroideas las responsables de esta expresión retardada.
- 3.- El hipotiroidismo produjo una disminución del nivel de LAGS en los machos adultos, que fue mucho más acusado en las ratas Lewis enanas que en las Lewis. Este efecto pudo ser total o parcialmente revertido por la Hormona de Crecimiento y por las hormonas tiroideas.
- 4.- La expresión de LAGS está sujeta a un dimorfismo sexual, de manera que su concentración en hembras adultas es muy baja. Este dimorfismo es ocasionado por las hormonas ováricas, ya que la ovariectomía antes de la pubertad es capaz de evitarlo.
- 5.- Bajas dosis de estradiol carecen de efecto inhibitor de la expresión de LAGS en machos adultos intactos. Sin embargo, manifiestan un marcado efecto

inhibidor en los machos orquidectomizados antes y después de la pubertad.

- 6.- En ausencia de gónadas, la administración de testosterona evitó parcialmente el efecto represor que, sobre la concentración de LAGS ejerce el estradiol.
- 7.- El estradiol, a bajas dosis, inhibe la expresión de LAGS en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados, aun en presencia de Hormona de Crecimiento y de Hormonas Tiroideas.
- 8.- La progesterona no tiene efecto sobre la expresión de LAGS en los machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados.
- 9.- El tamoxifeno no es capaz de bloquear el efecto inhibitorio que, sobre la expresión de LAGS, provoca el estradiol en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados.
- 10.- La administración de estradiol inhibe la ganancia de peso corporal y hepático originado por la Hormona de Crecimiento en los machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados.

11.- La Hormona de Crecimiento y las Hormonas Tiroideas, solas o en combinación, estimulan la expresión de Receptor de Estradiol en machos adultos hipotiroideos y orquidectomizados. Este efecto es inhibido por el estradiol.

# AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que de una manera u otra han contribuido a la realización de este trabajo, concretamente a:

D. Ricardo Chirino Godoy, director de este trabajo, por haberme introducido en el fascinante mundo de la investigación, por las valiosas enseñanzas que me ha transmitido y, sobretodo por su amistad, de la que me honro.

D. Bonifacio Nicolás Díaz Chico, por las inestimables ideas aportadas a este trabajo, por su constante interés en él, y por la confianza depositada en mí.

D. Leandro Fernández Pérez, porque siempre tuvo tiempo para hacer consideraciones objetivas y orientaciones de gran valor.

Mis compañeros de laboratorio, Domingo Navarro Bosch, Juan F. Rivero Báez, Juan Carlos Díaz Chico, José Juan Pestano Brito, Josefa P. Fernández Valerón, Santiago Torres Curbelo, Luis M. Domínguez Boada, Octavio L.F. Pérez Luzardo, Norberto Santana, Manuel Zumbado Peña y Blanca P. Díaz Viera, porque trabajar con todos ellos siempre fue un placer y en numerosas ocasiones me prestaron su desinteresada ayuda y colaboración.

Dña. Ana Fortes Gálvez, por su compañerismo y por la magnífica ayuda prestada en la manufactura de esta Memoria.

*Agradecimientos*

Los responsables del Bioterio del Centro de Ciencias de la Salud, D. Antonio Lleó y D. Martín González, porque siempre estuvieron dispuestos a facilitarme el trabajo.

Dña. Manuela Hernández Hernández, mi esposa, por tantos motivos que sería prolijo comentar, pero sirva de muestra su constante e incondicional apoyo a mi trabajo, sustrayendo de sí misma todo el tiempo que precisé para la realización de este trabajo.

Antonio y Gonzalo López Hernández, mis hijos, porque ellos dan sentido a mi vida y a mi trabajo.

# BIBLIOGRAFIA



AMBELLAN E, SWANSON M, DAVIDSON A.: Glucocorticoid binding to rat liver microsomal fractions in vitro. *J. Steroid Biochem.*, 14: 421-428. 1981.

ARGENTE J, CHOWEN JA, ZEITLER P, CLIFTON DK, STEINER RA.: Sexual dimorphism of growth hormone-releasing hormone and somatostatin gene expression in the hypothalamus of the rat during development. *Endocrinology*, 128: 2369-2375. 1991.

ASHIZAWA K, FUKUDA T, CHENG SY.: Transcriptional stimulation by thyroid hormone of a cytosolic thyroid hormone binding protein which is homologous to a subunit of pyruvate kinase M1. *Biochemistry*, 31: 2774-2778. 1992.

ATEN RF, WEINBERGER MJ, EISENFELD AJ.: Estrogen receptor in rat liver: translocation to the nucleus in vivo. *Endocrinology*, 102: 433-442. 1978.

BARTON MC, SHAPIRO DJ.: Transient administration of estradiol-17 $\beta$  establishes an autoregulatory loop permanently inducing estrogen receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 7119-7123. 1988.

BAXTER RC.: Measurement of growth hormone and prolactin receptor turnover in rat liver. *Endocrinology*, 117: 650-657. 1985.

BAXTER RC, BRYSON JM, TURTLE JR.: Somatogenic receptor of rat liver: regulation by insulin. *Endocrinology*, 107: 1176-1181. 1980.

BERELOWITZ M, FIRESTONE SL, FROHMAN LA.: Effects of growth hormone excess and deficiency on hypothalamic somatostatin content and release and on tissue somatostatin distribution. *Endocrinology*, 109: 714-719. 1981a.

BERELOWITZ M, SZABO M, FROHMAN LA.: Somatomedin C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science*, 212: 1279-1281. 1981b.

BOUTIN M, JOLICOEUR C, OKAMURA H, GAGNON J, EDERY M, SHIROTA M, BANVILLE D, DUSANTER-FOURT I, DJIANE J, KELLY PA.: Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor family. *Cell*, 53: 69-77. 1988.

BRAZEAU P, VALE W, BURGUS R, LING N, BUTCHER M, RIVIER J, GUILLEMIN R.: Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179: 77-79. 1973

BURSTEIN PJ, DRAZNIN B, JOHNSON CJ, SCHALCH DS.: The Effect of Hypothyroidism on Growth Hormone, The Growth Hormone-Dependent Somatomedin, Insulin-Like Growth Factor, and Its Carrier Protein in Rats. *Endocrinology*, 104: 1107-1111. 1979.

CARLSSON LMS, CLARK RG, ROBINSON ICAF.: Sex difference in growth hormone (GH) feedback in the rat. *J. Endocrinol.*, 126: 27-35. 1990.

CARLSSON B, BILLIG H, RYMO L, ISAKSSON OGP.: Expression of the growth hormone binding protein mRNA in the liver and extrahepatic tissues of the rat: coexpression with the growth hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 73:1990.

CASANOVA J, HOROWITZ ZD, COPP RP.: Photoaffinity labeling of thyroid hormone nuclear receptor. Influence of n-butyrate and analysis of the half-lives of the 57,000 and 47,000 molecular weight receptor forms. *J. Biol. Chem.*, 259: 12084-12091. 1984.

*Bibliografía*

CLARK RG, ROBINSON ICAF.: Paradoxical growth-promoting effects induced by patterned infusions of somatostatin in female rats. *Endocrinology*, 122: 2675-2682. 1.988a.

CLARK RG, CARLSSON LMS, RAFFERTY B, ROBINSON ICAF.: The rebound release of growth hormone (GH) following somatostatin infusion in rats involves hypothalamic GH-releasing factor release. *J. Endocrinol.*, 119: 397-404. 1.988b.

CHAMNESS GC, COSTLOW ME, MCGUIRE WL.: Estrogen receptor in the rat liver and its dependence on prolactin. *Steroids*, 26: 363-371. 1975.

CHARLTON HM, CLARK RG, ROBINSON ICAF, PORTER-GOF AE, COX BS, BUGNON C, BLOCH BS.: Growth hormone-deficient dwarfism in the rat: a new mutation. *J. Endocrinol*, 119: 51-58. 1988.

CHATTERJEE, B, OZBILEN, O, MAJUMDAR, D, ROY, AK.: Molecular cloning and characterization of the cDNA for androgen repressible rat liver protein SMP-2. *J. Biol. Chem.*, 262: 822-825. 1987.

CHATTERJEE B, DEMYAN WF, ROY AK.: Interacting role of thyroxine and growth hormone in the hepatic synthesis of  $\alpha_2$ globulin and its messenger RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 258: 688-692. 1983.

CHIRINO R, LÓPEZ A, NAVARRO D, CABRERA JJ, RIVERO JF, DÍAZ-CHICO BN.: Steroid induction of low-affinity glucocorticoid binding sites in rat liver microsomes. *J. Steroid Biochem.*, 34: 97-105. 1989.

CHIRINO, R, FERNÁNDEZ L, LÓPEZ A, NAVARRO D, RIVERO JF, DÍAZ-CHICO JC, DÍAZ-CHICO BN.: Thyroid hormones and glucocorticoids act synergistically in the regulation of the Low Affinity Glucocorticoid Binding Sites in the male rat liver. *Endocrinology*, 129: 3118-3124. 1991.

CHIRINO R, FERNÁNDEZ L, LÓPEZ A, NAVARRO D, RIVERO JF, DÍAZ-CHICO JC, DÍAZ CHICO BN.: The estradiol induction of the microsomal Low-Affinity Glucocorticoid binding sites (LAGS) in the male rat liver is independent of the endocrine status. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 41: 757-760. 1992.

CHIRINO R, LÓPEZ-GUERRA A, FERNÁNDEZ L, BOADA LD, VALERÓN PF, DÍAZ-CHICO JC, DÍAZ-CHICO BN.: The Role of Growth Hormone in Regulation of Low Affinity Glucocorticoid-Binding Sites from Male Rat Liver Microsomes. *Endocrinology*, 134: 1409-1415. 1.994.

COULOMBE P, RUEL J, DUSSAULT H.: Effects of neonatal hypo- and hyperthyroidism on pituitary growth hormone content in the rat. *Endocrinology*, 107: 2027-2033. 1980.

DAUGHADAY WH, ROTHWEIN P.: Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentration. *Endocrine Rev.*, 10: 68-91. 1989.

DUSSAULT JH, LABRIE F.: Development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the neonatal rat. *Endocrinology*, 97: 1321-1324. 1975.

EDÉN S.: Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 105: 555-560. 1979.

EISENFELD AJ, WEINBERGER RAM, HASEBACHER G, HALPERM K.: Estrogen receptor in the mammalian liver. *Science*, 191: 862-865. 1976.

- EKBERG S, CARLSSON L, CAROLSSON B, BILLIG H, JANSSON JO.: Plasma growth hormone pattern regulates epidermal growth factor (EGF) receptor messenger ribonucleic acid levels and EGF binding in the rat liver. *Endocrinology*, 125: 2158-2166. 1989.
- ERIKSSON HA, FREYSCHUSS B.: Effects of thyroid hormones on the receptor level in estrogen target organs. *Journal of Steroid Biochemistry*, 29:401-405. 1988.
- EVANS RM.: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240: 889-895. 1988.
- EZZAT S, LAKS D, OSTER J, MELMED S.: Growth hormone regulation in primary fetal and neonatal rat pituitary cell cultures: The role of thyroid hormone. *Endocrinology*, 128: 937-943. 1991.
- FELDMAN D.: Ontogeny of rat hepatic glucocorticoid receptors. *Endocrinology*, 95: 1219-1227. 1974.
- FERNÁNDEZ L, CHIRINO R, BOADA LD, NAVARRO D, CABRERA N, DEL RÍO I, DÍAZ-CHICO BN.: Stanazolol and Danazol, unlike natural androgens, interact with the low-affinity glucocorticoid-binding sites from male rat liver microsomes. *Endocrinology*, 134: 1401-1408. 1994.
- FERNÁNDEZ L, BOADA LD, LUZARDO OP, ZUMBADO M, DIAZ-CHICO JC, DÍAZ-CHICO BN, CHIRINO R.: Ethynilestradiol interacts with liver microsomes and induces binding sites for steroid hormones in the male rat liver. *J. Pharmacol. Expl. Ther.* 1994b (en prensa).
- FOSTER CM, SHAFER JS, ROZSA FW, WANG XY, LEWIS SD, RENKEN DA, NATALE JE, SCHWARTZ J, CARTER-SU, C.: Growth hormone promoted tyrosyl phosphorylation of growth hormone receptors in murine 3T3 F442A fibroblasts and adipocytes. *Biochemistry*, 27: 326-334. 1988.
- FREYSCHUSS B, STAVREUS-EVERS A, SAHLIN L, ERIKSSON H.: Induction of the estrogen receptor by growth hormone and glucocorticoid substitution in primary cultures of rat hepatocytes. *Endocrinology*, 133: 1548-1554. 1993.
- FREYSCHUSS B, SAHLIN L, MASIRONI B, ERIKSSON H.: The hormonal regulation of the estrogen receptor in rat liver: An interplay involving growth hormone, thyroid hormones and glucocorticoids. *Journal of Endocrinology*, 142: 285-298. 1994.
- FREYSCHUSS B, SAHLIN L, ERIKSSON H.: Regulatory effects of growth hormone, glucocorticoids and thyroid hormones on the estrogen receptor level in the rat liver. *Steroids*, 56: 367-374. 1991.
- FREYSCHUSS B, ERIKSSON H.: Evidence for a direct effect of thyroid hormones on the hepatic synthesis of estrogen receptor in the rat. *Journal of Steroid Biochemistry*, 31: 247-249. 1988.
- FROHMAN LA, JANSSON JO.: Growth hormone-releasing hormone. *Endocrinol. Rev.* 7: 223-253. 1985.
- GABRIEL SM, MILLARD WJ, KOENIG JI, BADGER TM, RUSSELL WE, MAITER DM, MARTIN JB.: Sexual and developmental differences in peptides regulating growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, 50: 299-307. 1989.
- GIANOPOULOS G.: Ontogeny of glucocorticoid receptors in rat liver. *J Biol Chem*, 250: 5847-5851. 1975.
- HERTZ P, SILBERMANN M, EVEN L, HOCHBERG Z.: Effects of sex steroids on the responses of cultured rat pituitary cells to growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Endocrinology*, 125: 581-585. 1989.
- HERVÁS F, MORREALE DE ESCOBAR G, ESCOBAR DEL REY F.: Rapid effects of single small doses of L-Thyroxine and Triiodo-L-thyronine on growth hormone, as studied in the rat by radioimmunoassay. *Endocrinology*, 97: 91-101. 1975.

*Bibliografía*

- HOBKIRK, R.: Steroid sulfotransferase and steroid sulfatases: characteristics and biological roles. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 63: 1127-1144. 1985.
- HOWELL, GM, PO, C, LEFEBVRE, Y.: Identification of dexamethasone binding sites on male rat liver plasma membranes by affinity labelling. *Biochem. J.*, 260: 435-441. 1989.
- JAMESON JL, DEGROOT LJ.: Mechanisms of Thyroid Hormone Action. DE GROOT LJ (Editor). *Endocrinology*, 3ª Edición, W.B. Saunders Company, Philadelphia. Volumen 1, pag.: 583-601. 1994.
- Jansson JO, Frohman LA.: Differential effects of neonatal and adult androgen exposure on the growth hormone secretory pattern in male rats. *Endocrinology*, 120: 1551-1557. 1987.
- JANSSON JO, EDÉN S, ISAKSSON O.: Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocrine Rev.* 6: 128-150. 1985.
- JOHNSON RM, NAPIER MA, CRONIN MJ, KING KL.: Growth hormone stimulates the formation of Sn-1,2-diacylglycerol in rat hepatocytes. *Endocrinology*, 127: 2099-2103. 1990.
- JONES PM, BURRIN JM, GHATEI MA, O'HALLORAN J, LEGON S, BLOOM SR.: The influence of thyroid hormone status on the hypothalamo-hypophyseal growth hormone axis. *Endocrinology*, 126: 1374-1379. 1990.
- KAUFMANN SH, SHAPER JH.: Binding of dexamethasone to rat liver nuclei in vivo and in vitro. Evidence for two distinct binding sites. *J. Steroid Biochem.*, 20: 699-708. 1984.
- KELLY PA, DJIANE J, POSTEL-VINAY MC, EDERY M.: The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine Reviews*, 12: 235-251. 1991.
- KLETT C, GANTEN D, HELLMANN W, KALING M, RYFFEL GU, WEIMAR-EHL T, HACKENTAL E.: Regulation of hepatic angiotensinogen synthesis and secretion by steroid hormones. *Endocrinology*, 130: 3660-3668. 1992.
- KRIEG RJ, THORNER MO, EVANS WS.: Sex differences in  $\beta$ -adrenergic stimulation of growth hormone secretion in vitro. *Endocrinology*, 119: 1339-1342. 1986.
- KURTZ DT, SIPPEL AE, ANSAH-YIADOM R, FEIGELSON P.: Effects of Sex Hormones on the Level of the Messenger RNA for the Rat Hepatic Protein  $\alpha_2$  Globulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 251: 3594-3598. 1976.
- LEE CSL, KOGA M, SUTHERLAND R.: Modulation of estrogen receptor and epidermal growth factor receptor mRNAs by phorbol ester in MCF 7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 162: 415-421. 1989.
- LEGRAVEREND C, MODE A, WELLS T, ROBINSON I, GUSTAFSSON JA.: Hepatic steroid hydroxylating enzymes are controlled by the sexually dimorphic pattern of growth hormone secretion in normal and dwarf rats. *FASEB J.*, 6: 711-718. 1992.
- LUBAHN DB, MOYER JS, GOLDING TS, COUSE JF, KORACH KS, SMITHIES O.: Alteration of reproductive function but prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11162-11166. 1993.
- LUO J, MURPHY LJ.: Dexametazone inhibits growth hormone induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA in hypophysectomized rats and reduces IGF-I mRNA abundance in the intact rat. *Endocrinology*, 125: 165-172. 1989.

- MAPTS, YAMAMOTO T, GOLDSTEIN J, BROWN M.: Increased mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of rabbits treated with 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 792-796. 1986.
- MACGEOCH C, MORGAN ET, GUSTAFSSON JA.: Hypothalamo-pituitary regulation of cytochrome P-450 apoprotein levels in rat liver. Endocrinology, 117:2085-2092. 1985.
- MAES M, DE HERTOOGH R, WATRIN-GRANGER P, KETELSLEGERS JM.: Ontogeny of liver somatotropic and lactogenic sites in male and female rats. Endocrinology, 113: 1325-1332. 1983.
- MAITER D, KOENIG J, KAPLAN LM.: Sexually dimorphic expression of the growth hormone-releasing hormone gene is not mediated by circulating gonadal hormones in the adult rat. Endocrinology, 128: 1709-1716. 1991b.
- MAITER D, UNDERWOOD LE, MAES M, DAVENPORT ML, KETELSLEGERS JM.: Different effects of intermittent and continuous growth hormone (GH) administration on serum somatomedin-C/insulin-like growth factor I and liver Gh receptors in hypophysectomized rats. Endocrinology, 123:1053-1059. 1988.
- MAITER D, UNDERWOOD LE, MARTIN JB, KOENIG JI.: Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. Endocrinology, 128: 1100-1106. 1991a.
- MARTINOLLI MG, PELLETIER G.: Thyroid and Glucocorticoid Hormone Regulation of Rat Pituitary Growth Hormone Messenger Ribonucleic Acid as Revealed by *in Situ* Hybridization. Endocrinology, 125:1246-1252. 1989.
- MAYEWSKY RJ, LITWACK G.: <sup>3</sup>H Cortisol radioactivity in hepatic smooth endoplasmic reticulum. Biochem. Biophys. Res. Comm., 37: 729-735. 1969.
- MCCLELLAN-GREEN PD, LINKO P, YEOWELL HN, GOLDSTEIN JA.: Hormonal Regulation of Male-specific Rat Hepatic Cytochrome P-450g (P-450IIC13) by Androgens and the Pituitary. The Journal of Biological Chemistry, 264: 18960-18965. 1989.
- MIRA E, CASTAÑO JG.: Insulin short-term control of rat liver  $\alpha_{2u}$  microglobulin gene transcription. J Biol Chem, 264: 18209-18212. 1989.
- MODE A, WIERSMA-LARSSON E, STRÖM A, ZAPHIROPOULOS PG, GUSTAFSSON JA.: A dual role of growth hormone as a feminizing and masculinizing factor in control of sex-specific cytochrome P-450 isozymes in rat liver. Journal of Endocrinology, 120: 311-317. 1989.
- MODE A, NORSTEDT G, SIMIC B, ENEROTH P, GUSTAFSSON JA.: Continuous infusion of growth hormone feminizes hepatic steroid metabolism in the rat. Endocrinology, 108: 2103-2108. 1981.
- MODE A, GUSTAFSSON JA, JANSSON JO, EDÉN S, ISAKSSON O.: Association between plasma level of growth hormone and sex differentiation of hepatic steroid metabolism in the rat. Endocrinology, 111: 1692-1697. 1982a.
- MODE A, NORSTEDT G.: Effect of gonadal steroids on the hypothalamo-pituitary-liver axis in the control of sex differences in hepatic steroid metabolism in the rat. Journal of Endocrinology, 95: 181-187. 1982b.
- MÖLLER C, ARNER P, SONNENFELD T, NORSTEDT G.: Quantitative comparison of insulin-like growth factor mRNA levels in human and rat tissues analysed by a solution hybridization assay. Mol. Endocrinology, 7: 213-222. 1991.

*Bibliografía*

MORGAN ET, MACGEOCH C, GUSTAFSSON JA.: Hormonal and developmental regulation of expression of the hepatic microsomal steroid 16 $\alpha$ -hydroxylase cytochrome P-450 apoprotein in the rat. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 11895-11898. 1985.

MUKKU VR, STANCEL GM.: Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor by Estrogen. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 9820-9824. 1985.

MURPHY LJ, FRIESEN HG.: Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic Insulin-Like Growth Factor I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. *Endocrinology*, 122: 325-332. 1988.

NÄNTÖ-SALONEN K, MULLER HL, HOFFMAN AR, VU TH, ROSENFELD RG.: Mechanisms of thyroid hormone action on the insulin-like growth factor system: All thyroid hormone effects are not growth hormone mediated. *Endocrinology*, 132: 781-788. 1993.

NORSTEDT G.: A comparison between the effects of growth hormone on prolactin receptors and estrogen receptor in rat liver. *Endocrinology*, 110: 2107-2112. 1982.

NORSTEDT G, WRANGE Ö, GUSTAFSSON JA.: Multihormonal regulation of the estrogen receptor in rat liver. *Endocrinology*, 108: 1190-1196. 1981.

NUNEZ J.: Mecanism of action of thyroid hormone. Cooke BA, King RJB, van der Molen HJ (editores). *Hormones and Their Action*, parte 1. Elsevier, Amsterdam, pag:61-80. 1988.

OMRANI GR, FURUKAWA H, SHERWOOD JA, LOEB JN.: [<sup>3</sup>H]Dexamethasone binding by rat liver microsomes: effects of age, sex, and adrenal status. *Endocrinology*, 112: 178-186. 1983.

Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN.: Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev*, 8: 288-308. 1987.

PARCHMAN LG, CAKE MH, LITWACK G.: Functionality of the liver glucocorticoid receptor during the life cycle and development of a low affinity membrane binding site. *Mech. Ageing Dev.*, 7: 227-240. 1978.

PASCUAL A, CASANOVA J, SAMUELS HH.: Photoaffinity labeling of thyroid hormone nuclear receptors in intact cells. *J. Biol. Chem.*, 257: 9640-9647. 1982.

PEAKE GT, BIRGE CA, DAUGHADAY WH.: Alterations of radioimmunoassayable growth hormone and prolactin during hypothyroidism. *Endocrinology*, 92: 487-493. 1973.

PFEIFFER CA.: Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads. *Am. J. Anat.*, 58: 195-225. 1936.

PICARD F, POSTEL-VINAY MC.: Hypophysectomy and growth hormone receptors in liver membranes of male rats. *Endocrinology*, 114: 1328-1333. 1984.

QUELLE FW, SMITH RV, HRYCYNIA CA, KALIBAN TD, CROOKS JA, O BRIEN JN.: [<sup>3</sup>H]Dexamethasone binding to plasma membrane-enriched fractions from liver of nonadrenalectomized rats. *Endocrinology*, 123: 1642-1651. 1988.

ROSZAK AW, LEFEBVRE YA, HOWELL M, CODDING PW.: Structural requirements for the binding of dexamethasone to nuclear envelopes and plasma membranes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 37: 201-214. 1990.

- ROY AK.: Androgen-dependent synthesis of  $\alpha_{2u}$ globulin: Role of the pituitary gland. *Journal of Endocrinology*, 56: 295-304. 1973.
- ROY AK, MILIN BS, McMINN AM.: Androgen receptor in rat liver: hormonal and developmental regulation of the cytoplasmic receptor and its correlation with the androgen-dependent synthesis of  $\alpha_{2u}$ -globulin. *Biochim. Biophys. Acta*, 354: 213-232. 1974.
- ROY AK, McMINN DM, BISWAS N.: Estrogenic inhibition of the hepatic synthesis of  $\alpha_{2u}$ Globulin in the rat. *Endocrinology*, 97: 1501-1508. 1975.
- ROY AK, CHATTERJEE B, DEMYAN WF, MILIN BS, MOTWANI NM, NATH T, SCHIOP MJ.: Hormone and age-dependent regulation of  $\alpha_{2u}$ globulin gene expression. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 39: 425-438. 1983.
- RUDLING M, NORSTEDT G, OLIVECRONA H, REIHNÉR E, GUSTAFSSON JA, ANGELIN B.: Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6983-6987. 1992.
- SAMUELS HH, HORWITZ ZD, STANLEY F, CASANOVA J, SHAPIRO LE.: Thyroid hormone controls glucocorticoid action in cultured GH1 cells . *Nature*, 268: 254-257. 1977.
- SCATCHARD G.: The attraction of protein for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51: 660-672. 1949.
- Shadlow AR, Surks MI, Schwartz HL, Oppenheimer JH.: Specific triiodothyronine binding sites in the anterior pituitary of the rat. *Science*, 176: 1252-1254. 1972.
- Shapiro LE.: Regulation of a thyroid hormone-dependent protein by growth hormone: The induction of hepatic  $\alpha_{2u}$ globulin and its messenger ribonucleic acid in adult male hypothyroid rats. *Endocrinology*, 113: 1280-1286. 1983.
- SHAPIRO LE, SACHCHIDANANDA J.: Regulation of proteins by thyroid hormone and glucocorticoid: The responses of hepatic  $\alpha_{2u}$ globulin and pituitary growth hormone differ in adult male hypothyroid rats. *Endocrinology*, 111: 653-660. 1982.
- SHIRASU K, STUMPF WE, SAR M.: Evidence for direct action of estradiol on growth hormone-releasing factor (GRF) in rat hypothalamus: localization fo 3H-estradiol in GRF neurones. *Endocrinology*, 127: 344-349. 1990.
- SIPPEL AE, FEIGELSON P, ROY AK.: Hormonal regulation of the hepatic messenger RNA levels for  $\alpha_{2u}$ globulin. *Biochemistry*, 14:825. 1975.
- SMAL J, DE MEYTS P.: Sphingosine, an inhibitor of protein kinase C, supresses the insulin-like effects of growth hormone in rat adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 4705-4709. 1989.
- SMITH EP, BOYD J, FRANK GR, TAKAHASHI H, COHEN RM, SPECKER B, WILLIAMS TC, LUBAHN DB, KORACH KS.: Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *The New England Journal of Medicine*, 331: 1056-1061. 1994.

*Bibliografía*

SOMANA R, VISSUWAN S, SAMRIDTONG A, HOLLAND RC.: Effect of neonatal androgen treatment and orchidectomy on pituitary levels of growth hormone in the rat. *Journal of Endocrinology*, 79: 399-400. 1978.

SPINDLER SR, MELLON SH, BAXTER JD.: Growth hormone gene transcription is regulated by thyroid and glucocorticoid hormones in cultured rat pituitary tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 257: 11627-11632. 1982.

STRED SE, STUBBART JR, ARGETSINGER LS, SHAFER JA, CARTER-SU C.: Demonstration of growth hormone (GH) receptor-associated tyrosine kinase activity in multiple GH-responsive cell types. *Endocrinology*, 127: 2506-2516. 1990.

SZABO M, CHU L, FROHMAN LA.: Biological effects of an ectopic growth hormone-releasing peptide in cultured adenohypophyseal cells: comparison with growth hormone-releasing activity of porcine hypothalamus. *Endocrinology*, 111: 1235-1241. 1982.

TANNENBAUM GS.: Evidence for autoregulation of growth hormone secretion via the central nervous system. *Endocrinology*, 107: 2117-2124. 1980.

TANNENBAUM GS, MARTIN JB.: Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 98: 562-570. 1976.

TOLLET P, LEGRAVEREND C, GUSTAFSSON JA, MODE A.: A role for protein kinases in the growth hormone regulation of cytochrome P-450 2C12 and IGF-I mRNA expression in primary adult rat hepatocytes. *Molecular Endocrinology*, 5: 1351-1358. 1991.

VISSER TJ.: Mecanism of action of thyroid hormone. Cooke BA, King RJB, van der Molen HJ (editores). *Hormones and Their Action*, parte 1. Elsevier, Amsterdam, pag:81-103. 1988.

UMESONO K, MURAKAMI KK, THOMPSON CC, EVANS RM.: Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D receptors. *Cell*, 65: 1255-1266. 1991.

WAXMAN DJ, DANNAN GA, GUENGERICH FP.: Regulation of Rat Hepatic Cytochrome P-450: Age-Dependent Expression, Hormonal Imprinting, and Xenobiotic Inducibility of Sex-Specific Isoenzymes. *Biochemistry*, 24: 4409-4417. 1985.

WEGNEZ M, SCHACHTER BS, BAXTER JD, MARTIAL JA.: Hormonal regulation of growth hormone messenger RNA. *DNA*, 1: 145. 1982.

WEHREBERG WB.: Continuous infusion of growth hormone-releasing factor: effects on pulsatile growth hormone secretion in normal rats. *Neuroendocrinology*, 43: 391-396. 1986.

WOLF M, INGBAR SH, MOSES AC.: Thyroid hormone and growth hormone interact to regulate insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid and circulating levels in the rat. *Endocrinology*, 125: 2905-2914. 1989.

YAMADA M, INDO K, NISHIGAMI T, NAKASHO, MIYAJI H.: Progesterone-binding site of adult male rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 265: 11035-11043. 1990

**ZEITLER P, ARGENTE J, CHOWEN-BREED JA, CLIFTON DK, STEINER RA.: Growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in the hypothalamus of the adult male rat is increased by testosterone. Endocrinology, 127: 1362-1368. 1990.**