

Influencia ovárica y adrenal en la ontogénesis de los receptores citosólicos y nucleares uterinos de estrógenos

M. I. González-Quijano, E. Castellano y B. N. Díaz-Chico

Departamento de Fisiología y Farmacología
Colegio Universitario de Las Palmas
División de Medicina
35080 Las Palmas de Gran Canaria (España)

(Recibido el 27 de noviembre de 1985)

M. I. GONZALEZ-QUIJANO, E. CASTELLANO and B. N. DIAZ-CHICO. *Ovaric and Adrenal Influence on the Ontogeny of the Cytosolic and Nuclear Uterine Estrogen Receptor*. Rev. esp. Fisiol., 43 (1), 69-76, 1987.

Adrenal and ovarian relative influence over rat uterus estrogenic receptor, both cytosolic (RcE) and nuclear (RnE) ontogenese, has been studied. Ovarian influence has been studied by practising bilateral ovariectomy the first day of life and examining estrogenic receptor content evolution from, birth to puberty in these ovariectomized animals (OVX₁) by comparison with the normal ones. This influence seems to be of scarce importance until the 20th day of life, since estrogenic receptors content is practically coincident in the OVX₁ animals and in the control ones. From the 20th day, ovarian secretion influence increases and estrogenic receptor evolution starts evolving in a different way in the two types of animals. Adrenal influence has been studied by practising bilateral adrenalectomy on the 10th or 30th day of life to OVX₁ animals or else OVX and ADX on the 10th or 30th day. Adrenal influence in the upkeep of high estrogen receptor levels on the 10th day, seems to be important, since in the absence of these glands it decreases in a considerable way. The situation is different on the 30th day. At this age ovarian secretion seems to be the most important in maintaining estrogen receptor levels, while adrenal secretion effects tend to inhibit them, especially RnE.

Key words: Estrogen, Receptor, Receptor ontogeny.

Los procesos y cambios que sufren los órganos reproductores de los animales, tanto a nivel hormonal como morfológico (9), desde que nacen hasta que son capaces de reproducirse, son extremadamente

complejos y bastante mal comprendidos.

Asimismo se producen amplios cambios en la sensibilidad de las células diana de los diferentes tipos de hormonas que condicionan que su respuesta varíe considerablemente.

Se ha estudiado en varios tejidos de rata —útero, adenohipófisis e hipotálamo—, la concentración de receptores estrogén-

* Correspondencia a Dr. M. I. González-Quijano. Escuela Universitaria de Enfermería. Facultad de Medicina. 28040 Madrid (España).

cos durante el desarrollo prepuberal, llegando a la conclusión de que no es estática, sino que experimenta cambios bruscos durante ese tiempo (5, 15, 23).

Los niveles séricos de estradiol presentan asimismo grandes fluctuaciones, siendo muy altos en las dos primeras semanas de vida (8, 18, 27). Su origen ovárico o adrenal ha sido motivo de controversia (16, 27). Parece ser que los ovarios comienzan a secretar estrógenos durante la segunda semana de vida (19, 27).

En este trabajo se ha tratado de ver la influencia que sobre la evolución de los receptores estrogénicos uterinos, tanto citosólicos (RcE) como nucleares (RnE), tienen las hormonas ováricas y las adrenales durante el desarrollo prepuberal.

Para estudiar la influencia de los ovarios, se compara la evolución de los receptores uterinos en ratas ovariectomizadas al nacer (OVX₁) con la de ratas normales, desde el nacimiento hasta la pubertad. Para ver la influencia de la secreción adrenal sobre dicha evolución, se realiza adrenalectomía a diferentes edades y en presencia o ausencia de ovarios.

Material y Métodos

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley agrupadas como se indica: animales ovariectomizados el día del nacimiento (OVX₁), a los que se sacrificó a diferentes edades (5, 10, 20, 30, 40 y 75 días); ovariectomizados al nacer y adrenalectomizados a los 10 ó 30 días (OVX₁ u OVX₁ ADX₃₀) sacrificados 3 ó 7 días después; ovariectomizados y adrenalectomizados a los 10 ó 30 días (OVX₁₀ ADX₁₀ u OVX₃₀ ADX₃₀) o sólo ovariectomizados a los 30 días (OVX₃₀) y sacrificados 3 ó 7 días después.

Inmediatamente después del sacrificio por decapitación fueron extraídos los dos cuernos uterinos, desechándose la cervix. Los úteros se utilizaron individualmente cuando el peso alcanzado fue de 40 mg

como mínimo, agrupándose en caso contrario hasta 15 úteros, según las edades. Los úteros se homogeneizaron en 2 ml de tampón TEDG (10 mM Tris-ClH 1,5 mM Edta-Na₂, 0,5 mM ditioneitol con el 10% de glicerol, pH: 7,4) en un homogenizador tipo Potter-Eveljheim, sumergido en baño de hielo y centrifugado a 850 × g. El sobrenadante fue centrifugado de nuevo a 105.000 × g en una ultracentrífuga MSE Centriscan 75, para obtener el citosol. El método descrito por MESTER *et al.* (17) con algunas modificaciones fue utilizado para medir los RcE.

Alícuotas de 100 µl de citosol fueron incubadas por cuadruplicado con 100 µl de ³H-E₂ (2, 4, 6, 7, ³H-estradiol-17 act. esp. 100 ci/mmol, Radiochemical Center, Amersham) 5 mM, sólo o con dietilestilbestrol (DES, Sigma) 1 mM, durante toda la noche a 0-4°C. Al cabo de este tiempo, se añaden 100 µl de una suspensión de carbón activo-dextrano (0,5% y 0,005%, respectivamente) y se centrifuga de nuevo después de 15 min de incubación. Alícuotas del sobrenadante se mezclaron con líquido de centelleo, y se contó la radiactividad en un Spectrometer Packard 3390.

El precipitado de la primera centrifugación a 850 × g fue resuspendido en solución tampón TEDG filtrado a través de cuádruple fase y centrifugado de nuevo. El precipitado fue lavado dos veces más en TEDG y el último precipitado fue resuspendido en 4 ml de TEDG y usado para el ensayo de los RnE que se hizo por el método de ANDERSON *et al.* Se incubaron por cuadruplicado alícuotas de 250 µl de suspensión nuclear cruda durante toda la noche a 0-4°C, con ³H-E₂ 3,33 nM solo o en presencia de DES 1 µM. El ³H-E₂ libre en el medio fue eliminado por 3 lavados con un exceso de TEDG. El precipitado se extrajo con un líquido de centelleo basado en tolueno, y se controló la radiactividad.

Las proteínas se midieron por el método de LOWRY *et al.* (14) y el DNA por el de BURTON (4).

Resultados

La evolución del contenido uterino en RcE, desde el nacimiento hasta la pubertad en ratas normales y ovariectomizadas al nacer, va aumentando hasta el día 10, donde alcanzó un gran pico en ambos tipos de animales, descendiendo posteriormente de una forma paralela hasta el día 20. A partir de ahí las dos trayectorias se separan, manteniéndose prácticamente constante el contenido en RcE en las ratas ovariectomizadas al nacer, y con unos valores altos hasta el día 75 (1789 ± 59 fmoles/mg proteína) que fue el último que se midió. En las ratas normales el contenido uterino en RcE desciende desde el día 20 hasta el día 50 (317 ± 15 fmoles/mg proteína) donde ya oscila según el momento del ciclo estral, pero dentro de unos valores bajos (fig. 1).

Los RnE aumentan paralelamente en ambos grupos de animales, hasta el día 20 en que las ratas normales siguen aumentando hasta un máximo (1887 ± 636 fmoles/mg DNA) a los 40 días. En las ratas OVX₁ el contenido uterino en RnE desciende desde el día 20 hasta el día 40 en que ya se mantiene estable y bajo. La figura 2 muestra la evolución de los re-

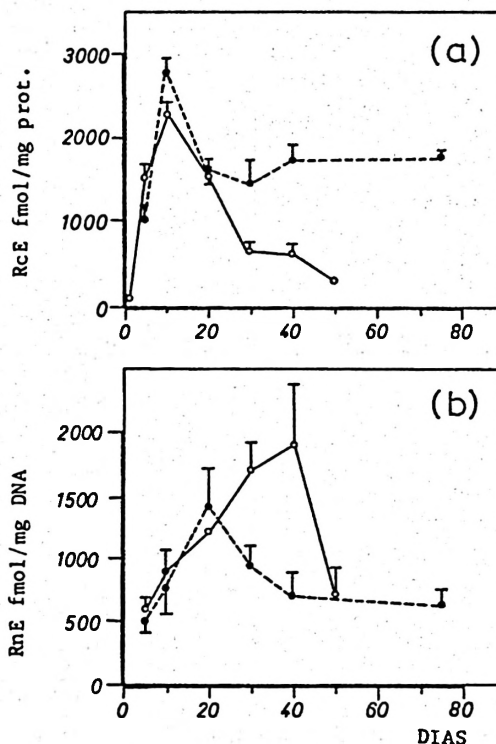


Fig. 1. Evolución de los RcE (a) y RnE (b) uterinos con la edad, en ratas normales (O—O) y OVX al nacer (●---●).

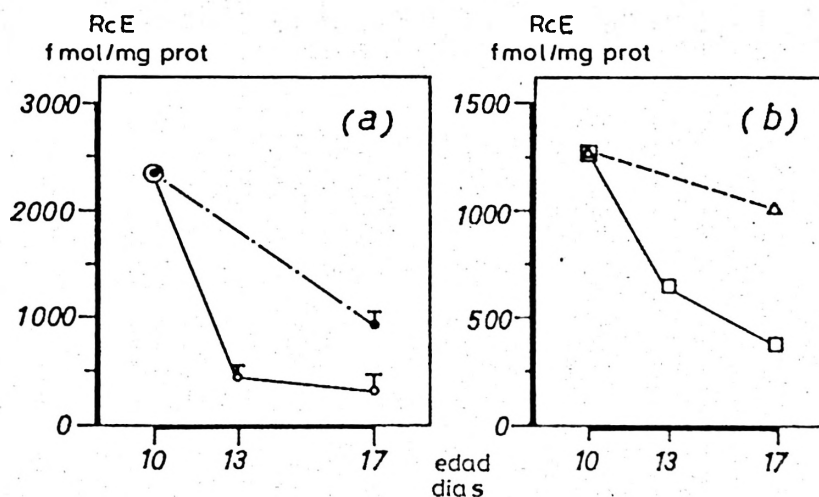


Fig. 2. Evolución del contenido uterino en RcE, entre 10 y 17 días en: a) ratas OVX al nacer y ADX a los 10 días (O—O), con respecto a las OVX al nacer (●---●) y b) ratas OVX y ADX a los 10 días (□—□) con respecto a las normales (▲---▲).

Tabla I. Evolución de diversos parámetros uterinos, en respuesta a los diferentes tratamientos experimentales. Entre paréntesis: n.º de datos por cuadruplicado. Media $\pm$ desviación estándar.

DÍAS	TRATAMIENTO	PESO (mg)	PROT (μ g/útero)	DNA (μ g/útero)	Rc (fmoles/mg prot.)	Rn (fmoles/mg DNA)
10	—	(13) 11,50 $\pm$ 0,82	(13) 385,77 $\pm$ 36,81	(4) 71,87 $\pm$ 5,98	(8) 1290,00 $\pm$ 87,00	(4) 51,00 $\pm$ 30,75
10	OVX ₁	(6) 6,41 $\pm$ 0,28	(6) 133,33 $\pm$ 13,24	(2) 20,00 $\pm$ 2,02	(5) 2340,59 $\pm$ 232,00	(3) 431,66 $\pm$ 150,49
13	OVX ₁ ADX ₁₀	(10) 13,31 $\pm$ 0,84	(10) 519,70 $\pm$ 34,35	(4) 36,07 $\pm$ 5,70	(10) 471,50 $\pm$ 63,87	(3) 74,00 $\pm$ 23,06
13	OVX ₁₀ ADX ₁₀	(4) 11,00 $\pm$ 1,92	(4) 228,00 $\pm$ 92,75	(3) 105,40 $\pm$ 63,13	(4) 666,75 $\pm$ 250,00	(2) 8,50 $\pm$ 3,50
17	OVX ₁ ADX ₁₀	(7) 14,40 $\pm$ 0,56	(7) 584,00 $\pm$ 34,00	(5) 58,50 $\pm$ 11,97	(7) 355,85 $\pm$ 47,75	(2) 67,00 $\pm$ 18,00
17	OVX ₁₀ ADX ₁₀	(3) 20,50 $\pm$ 2,02	(3) 552,00 $\pm$ 122,46	(3) 56,96 $\pm$ 8,68	(3) 355,00 $\pm$ 56,00	(2) 166,50 $\pm$ 22,00
17	OVX ₁	(6) 14,25 $\pm$ 0,72	(6) 521,00 $\pm$ 74,71	(2) 35,00 $\pm$ 11,65	(2) 903,00 $\pm$ 75,00	(2) 176,50 $\pm$ 51,00
17	—	(4) 18,90 $\pm$ 0,62	(4) 610,50 $\pm$ 52,02	(4) 63,17 $\pm$ 4,67	(5) 1016,00 $\pm$ 51,00	(3) 279,66 $\pm$ 33,98
30	—	(14) 49,10 $\pm$ 1,05	(14) 1653,78 $\pm$ 111,35	(13) 110,77 $\pm$ 20,11	(13) 674,38 $\pm$ 42,81	(7) 397,57 $\pm$ 110,77
30	OVX ₁	(14) 20,38 $\pm$ 2,17	(13) 444,77 $\pm$ 34,27	(13) 90,59 $\pm$ 13,68	(8) 650,00 $\pm$ 115,00	(7) 116,86 $\pm$ 25,12
33	OVX ₁ ADX ₃₀	(4) 23,45 $\pm$ 2,34	(4) 1359,75 $\pm$ 140,22	(4) 141,62 $\pm$ 10,76	(4) 623,25 $\pm$ 119,48	(4) 247,25 $\pm$ 38,32
33	OVX ₃₀ ADX ₃₀	(7) 34,86 $\pm$ 3,12	(7) 2589,71 $\pm$ 645,77	(7) 119,57 $\pm$ 14,96	(6) 268,00 $\pm$ 58,93	(5) 258,60 $\pm$ 44,70
33	OVX ₃₀	(5) 58,80 $\pm$ 19,15	(5) 1653,78 $\pm$ 284,63	(5) 220,00 $\pm$ 22,56	(3) 166,66 $\pm$ 45,36	(7) 32,66 $\pm$ 10,68
37	OVX ₁ ADX ₃₀	(5) 26,50 $\pm$ 4,15	(3) 640,00 $\pm$ 92,37	(5) 119,90 $\pm$ 24,50	(3) 733,00 $\pm$ 67,91	(5) 141,00 $\pm$ 24,50
37	OVX ₃₀ ADX ₃₀	(3) 48,66 $\pm$ 3,50	(4) 1560,00 $\pm$ 329,84	(4) 218,75 $\pm$ 18,75	(4) 388,00 $\pm$ 37,02	(4) 230,50 $\pm$ 63,14
37	OVX ₃₀	(5) 36,60 $\pm$ 4,12	(5) 1840,00 $\pm$ 224,85	(5) 191,00 $\pm$ 11,85	(5) 293,00 $\pm$ 55,35	(5) 208,40 $\pm$ 43,94
37	OVX ₁	(2) 32,00 $\pm$ 0,99	(2) 773,00 $\pm$ 133,00	(2) 85,00 $\pm$ 1,66	(2) 1006 $\pm$ 133,00	(2) 205,00 $\pm$ 4,50
37	—	(5) 130,00 $\pm$ 8,00	(5) 5000,00 $\pm$ 430,00	(5) 430,00 $\pm$ 28,01	(5) 650,00 $\pm$ 51,03	(2) 415,14 $\pm$ 53,69

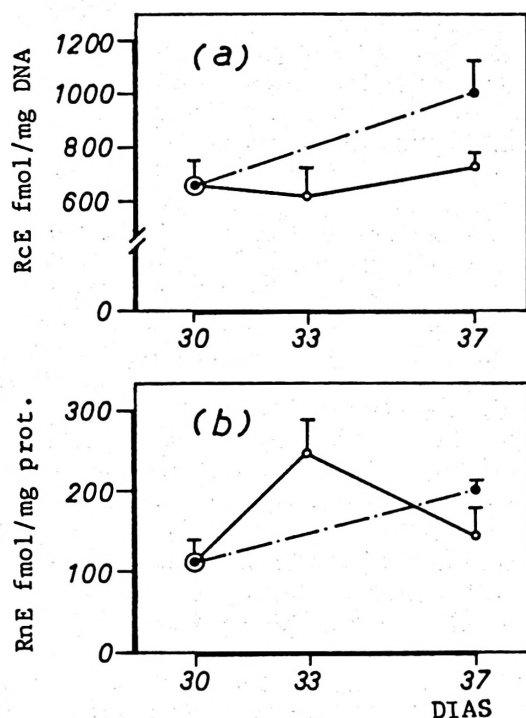


Fig. 3. Evolución de los RcE (a) y RnE (b) entre 30 y 37 días, en ratas OVX al nacer y ADX a los 30 días (O—O) con respecto a las OVX al nacer (●—●).

ceptores estrogénicos en ratas OVX al nacer adrenalectomizadas a los 10 días y se compara con las ratas OVX₁. En ambos tipos de animales se produce un gran descenso en el contenido en RcE (fig. 2a), significativamente más acusado en las OVX₁ y ADX₁₀ que en las OVX₁ sólo (tabla I).

Cuando se adrenalectomiza y ovariectomiza a los 10 días (fig. 2b) el resultado es similar; se produce un descenso en RcE más acusado en las ADX₁₀OVX₁₀ que en las normales, llegándose a valores prácticamente iguales que en las OVX₁ ADX₁₀ (tabla I).

Cuando se adrenalectomiza a los 30 días a ratas OVX₁ (fig. 3) no se aprecia ninguna diferencia significativa al cabo de 7 días, con respecto a las OVX₁ sólo, ni en el contenido de RcE (fig. 3a) ni en el de RnE (fig. 3b).

La ovariectomía y adrenalectomía a los 30 días, o bien se OVX sólo a animales intactos, se produce un descenso en el contenido de RcE (fig. 4a) con respecto a sus controles. Este descenso alcanzó valores similares al cabo de 7 días en las OVX₃₀ y las OVX₃₀ADX₃₀, pero al cabo

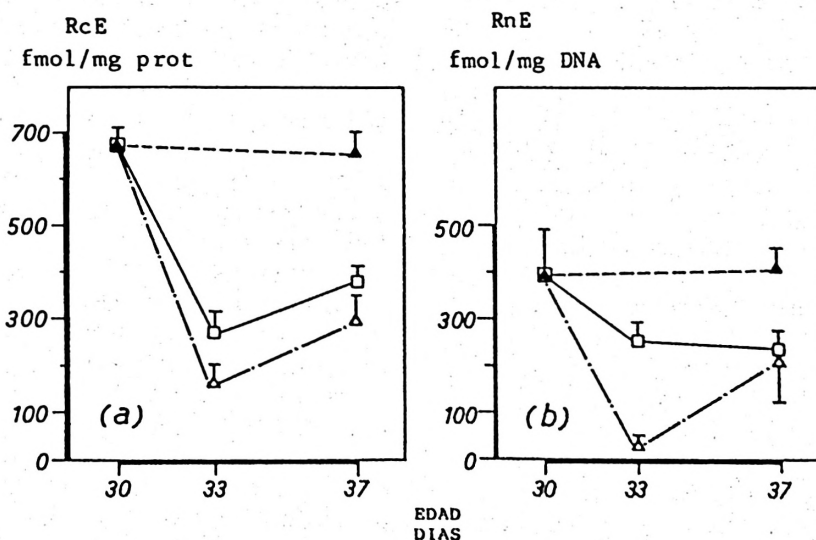


Fig. 4. Evolución de los RcE (a) y RnE (b) entre 30 y 37 días en ratas normales (▲—▲); OVX y ADX a los 30 días (□—□) y OVX a los 30 días (△—△).

de 3 días hay un mayor descenso en las OVX₃₀ (tabla I). En la fig. 4b se muestra la evolución de los RnE y se aprecia que esta diferencia a los 3 días entre las OVX₃₀ y las OVX₃₀ADX₃₀, es más acusada, llegando en las OVX₃₀ a valores muy bajos. Al cabo de 7 días los valores en ambos tipos de animales son prácticamente iguales.

Discusión

La evolución de los RcE desde el nacimiento hasta la pubertad, mostrada en este trabajo, coincidió en líneas generales, con las obtenidas por otros autores (5, 11, 12, 15, 23), así como la evolución de los RnE coincide con la obtenida por MEDLOCK *et al.* (15). Esto permite abordar las siguientes manipulaciones experimentales, con garantías sobre la técnica empleada.

La ovariectomía perinatal produjo una evolución del contenido uterino en RcE y RnE totalmente paralela a la presentada por las ratas normales, hasta el día 20 de vida (fig. 1). La disminución del contenido uterino en RcE en las ratas normales, a partir de los 10 días de vida, y el aumento del contenido en RnE a partir de esta fecha, se podría atribuir a la creciente secreción de estrógenos por el ovario, que comienza por esos días (5, 19, 25) y que podría causar traslocación de los RcE al núcleo. Sin embargo, el aumento de concentración que experimentan hasta los 10 días aún no ha sido explicado.

El paralelismo, cuando no la coincidencia, de la evolución de los receptores estrogénicos uterinos entre ambos tipos de animales (normales y OVX₁) hasta el día 20 de vida, parece indicar la inexistencia del control ovárico de estos receptores hasta dichas fechas. Analizando los posibles factores hormonales con incidencia en la regulación uterina de los receptores estrogénicos, resultó evidente la necesidad de abordar el posible papel de las

adrenales. Recientemente, QUARMBY *et al.* (20-22), han presentado datos que apoyan la participación de las glándulas adrenales en la regulación del contenido uterino de receptores estrogénicos.

El que sea en el día 20 cuando las evoluciones de los receptores en ambos tipos de rata se separen, junto con el hecho de que a esa edad se produce una inflexión en el ritmo de crecimiento uterino, que pasa de ser un crecimiento lento a uno más rápido, sugiere que, de mediar algún efecto adrenal en dichas acciones, éstas podrían ponerse de manifiesto estudiando animales adrenalectomizados antes y después de ese día. Cuando se adrenalectomizó a los 10 días, no se observaron cambios de peso [prot] y [DNA], al cabo de 7 días, con respecto a las normales, ni en las OVX₁, ni en las que además de adrenalectomizar se ovariectomizaron a los 10 días.

Los RcE disminuyeron entre 10 y 17 días, tanto en las ratas OVX₁ como en las normales.

Cuando se adrenalectomiza a los 10 días, esta disminución es significativamente mayor; ya a los 7 días, los niveles de RcE se han reducido en la misma proporción en las ratas que habían sido OVX al nacer y en las normales que fueron OVX₁₀ADX₁₀, sugiriendo que el descenso del nivel de RcE es debido a la falta de las adrenales, y que la influencia ovárica hasta los 10 días es realmente poco importante, ya que los niveles de RcE que se alcanzan son similares en ambos casos.

La influencia de las adrenales sobre el contenido uterino de RcE a esa edad, parece ser de tendencia a aumentar el contenido en RcE.

QUARMBY *et al.* (20) observaron que la adrenalectomía bajaba el contenido de receptores estrogénicos en el ratón adulto ovariectomizado, coincidiendo esto con lo aquí descrito. No obstante, estos hechos carecen de explicación científica de momento. Se sabe que en varias especies,

incluida la humana, se producen variaciones cíclicas de la secreción adrenal directa de estrógenos (2, 3, 20, 26). Ahora bien, para justificar que la supresión de las adrenales disminuye la concentración de receptores estrogénicos, es preciso suponer que algún principio adrenal, directa o indirectamente, es capaz de realizar un control positivo sobre dichos receptores. En un trabajo previo (7), se demostró que en ratas castradas, tratadas con dosis muy bajas de estradiol (1 ng/kg peso) se produce, a corto plazo, una gran inducción de RcE y RnE. Parece claro que la concentración de estrógeno circulante, necesaria para influir en el contenido celular de receptores estrogénicos, es menor que la necesaria para producir cambios apreciables de respuesta uterotrópica (6, 7, 10). Así, la supresión de las adrenales puede privar al útero del aporte de cantidades basales de esteroides, necesarias para mantener el alto nivel de receptores que existe a esa edad. No obstante, estas modificaciones en el nivel de receptores podrían deberse también a una falta de función suprarrenal gluco y mineralocorticoide.

Cuando la adrenalectomía se realiza a los 30 días, los resultados son muy diferentes. Por una parte, a esta edad la secreción ovárica ya tiene una importancia fundamental en el crecimiento uterino, (ver tabla), que en las ratas normales es muy intenso en estos días, y que prácticamente cesa al extirpar los ovarios. Con respecto a los receptores estrogénicos, en las ratas OVX₁ADX₃₀, no se observan (fig. 3) diferencias significativas en la variación de los RcE ni de los RnE, al cabo de 7 días, con respecto a las OVX₁ sólo. Esto parece indicar que la secreción adrenal no tiene una gran influencia en el mantenimiento del nivel de receptores estrogénicos a esa edad. Cuando se ovariectomiza y adrenalectomiza a los 30 días, el contenido en RcE disminuye con respecto a las ratas normales al cabo de 7 días. Lo mismo ocurre con las ratas

OVX₃₀ sólo al cabo de 7 días. Sin embargo, a los 3 días, el contenido en RcE uterino parece ser todavía menor en las ratas sólo ovariectomizadas que en las que se había extirpado ambas glándulas (fig. 4).

Este aspecto fue todavía mucho más acusado en el nivel de RnE. Al cabo de 7 días, el contenido uterino en RnE fue similar en los animales OVX₃₀ADX₃₀ que en los OVX₃₀, siendo en ambos inferior al de las ratas normales. Esto corrobora el control principalmente ovárico del nivel de receptores estrogénicos uterinos en esta edad. A los 3 días de la operación, sin embargo, el nivel de RnE uterinos es significativamente inferior en las ratas OVX₃₀ que en las OVX₃₀ADX₃₀, lo que sugiere que las adrenales no son del todo indiferentes al control de los receptores estrogénicos uterinos.

A este nivel, al contrario de lo que ocurría a los 10 días, el efecto de las adrenales parece ser el de disminuir el nivel de receptores.

Resumen

Se estudia la influencia relativa de los ovarios y las adrenales sobre la ontogénesis de los receptores estrogénicos en el útero de rata. La influencia ovárica se estudia practicando la ovariectomía en el día de nacimiento y viendo la evolución del contenido en receptores estrogénicos desde el nacimiento hasta la pubertad. Dicha influencia parece ser mínima hasta el día 20 de vida, ya que la trayectoria que sigue el contenido en receptores estrogénicos hasta ese día es prácticamente coincidente en los animales ovariectomizados y en los intactos. A partir del día 20 la secreción ovárica tiene una importancia considerable, ya que las dos trayectorias se separan. La influencia de las adrenales se estudia practicando adrenalectomía a los 10 ó 30 días a animales ovariectomizados al nacer, o bien simultáneamente a la ovariectomía. La influencia de las adrenales en el mantenimiento del alto nivel de receptores que se da a los 10 días, parece ser importante ya que en su ausencia disminuye mucho. A los 30 días, sin embargo, la situación es diferente. La influencia de las adrenales no parece ser tan importante, siendo en

cambio fundamental la presencia de ovarios. La secreción adrenal a esa edad parece más bien ejercer un efecto inhibitor de los receptores estrogénicos, especialmente los nucleares.

Palabras clave: Estrógenos, Receptor estrogénico, Receptor, Ontogenesis.

Bibliografía

1. Anderson, J., Clark, J. H. y Peck, R. J. Jr.: *Biochem. J.*, 126, 561-567, 1972.
2. Bourne, G. y Zuckerman, S.: *J. Endocrinol.*, 2, 268-282, 1941.
3. Bourne, G. y Zuckerman, S.: *J. Endocrinol.*, 2, 283-295, 1941.
4. Burton, K.: *Biochem. J.*, 62, 315-323, 1956.
5. Clark, J. M. y Gorsk, J.: *Science*, 169, 76-78, 1970.
6. Díaz-Chico, B. N., Sosa-González, A. y Gómez-Benítez, J.: *IRCSZ Med. Sci.*, 10, 608-609, 1982.
7. Díaz-Chico, B. N., Sosa-González, A. y Gómez-Benítez, J.: *J. Ster. Biochem.*, 20, 1135-1139, 1984.
8. Dohler, K. D. y Wuttke, W.: *Endocrinology*, 97, 898-907, 1975.
9. Dudley, S. D.: *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 5, 421-434, 1980.
10. Hung, T. T. y Barker, K. L.: *Endocrinology*, 104, 1608-1616, 1979.
11. Kaye, A. H.: En «Biochemical Actions of Hormones» (G. Litwack, ed.). Academic Press, Nueva York, 1978, vol. 5, p. 149.
12. King, R. J. B. y Mainwaring, W. I. P.: En «Steroid Cell Interaction». Butterworth, Londres, 1974, p. 209.
13. Leavitt, W. W., Evans, R. W., Okulicz, W. C., McDonald, R. G., Herchy, W. J. y Roiodoux, W. F.: En «Hormone Antagonists» (Agarwal M. K., ed.). W. de Gruyter, Nueva York, 1982, p. 213.
14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
15. Medlock, K. L., Sheeman, D. M. y Branhan, W. J.: *J. Steroid Biochem.*, 15, 285-288, 1981.
16. Meiss-Roelofs, M. H. A., Vilenbroek, J. Th. J., de Jong, F. M. y Welschen, R.: *Endocrinology*, 59, 295-304, 1973.
17. Mester, J., Robertson, P. H., Feherty, P. y Kellie, A. E.: *Biochem. J.*, 120, 831-836, 1970.
18. Ojeda, S. R., Kalra, P. S. y McCann, S. M.: *Neuroendocrinology*, 18, 242-255, 1975.
19. Presl, J., Kirasek, J., Horst, J. y Henzl, M.: *J. Endocrinol.*, 31, 293-294, 1965.
20. Quarmbby, V. E., Fox-Davies, C., Swaisfood, H. H. y Korach, K. S.: *Endocrinology*, 110, 1208-1216, 1982.
21. Quarmbby, V. E. y Korach, K. S.: *Life Sci.*, 33, 1205-1211, 1983.
22. Quarmbby, V. E., Fox-Davies, C. y Kurach, R. S.: *Endocrinology*, 114, 108-115, 1984.
23. Raynaud, J. P. y Moguiewsky, M. En «Système nerveux, activité sexuelle et reproduction» (Soulainac, A., Gautray, J. P., Rousseau, J. P. y Cohen, J., eds.). Masson et Cie. París, 1976, p. 85.
24. Ramaley, J. A. y Bartoski, D.: *Endocrinology*, 96, 269-274, 1975.
25. Somjen, D., Somjen, G., King, R. J. B., Kaye, A. H. y Lindner, H. R.: *Biochem. J.*, 136, 25-33, 1973.
26. Wasada, T., Akamine, Y., Kato, K. I., Ibayashi, H. y Nomura, Y.: *Endocrinol. Jpn.*, 25, 123-128, 1978.
27. Weisz, J. y Gunsalus, P.: *Endocrinology*, 93, 1057-1065, 1973.