

3. Calafat AM, Weuve J, Ye X, Jia LT, Hu H, Ringer S, *et al.* Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 639-44.
4. Edginton AN, Ritter L. Predicting plasma concentrations of bisphenol A in children younger than 2 years of age after typical feeding schedules, using a physiologically based toxicokinetic model. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 645-52.
5. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007; 24:139-77.
6. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE *et al.* *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 2007; 24: 199-224.
7. Kato H, Ota T, Furuhashi T, Ohta Y, Iguchi T. Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod Toxicol* 2003; 17: 283-8.
8. Moral R, Wang R, Russo IH, Lamartiniere CA, Pereira J, and Russo J. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *J Endocrinology* 2008; 196: 101-12.
9. Patisaul HB, Fortino AE, Polston EK. Differential disruption of nuclear volume and neuronal phenotype in the preoptic area by neonatal exposure to genistein and bisphenol-A. *Neurotoxicology* 2007; 28: 1-12.
10. Ramos JG, Varayoud J, Kass L, Rodriguez H, Costabel L, Munoz-de-Toro M, *et al.* Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 2003; 144: 3206-15.
11. Khurana S, Ranmal S, Ben Jonathan N. Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology* 2000; 141: 4512-7.
12. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C *et al.* *In vitro* molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol* 2007; 24: 178-98.
13. Fernandez MO, Bianchi MS, Lux-Lantos VAR, Libertun C. Neonatal exposure to Bisphenol A alters reproductive parameters and Gonadotropin Releasing Hormone signaling in female rats. *Environ Health Perspect* 2009; 117(5): 757-62.
14. Fernandez MO, Bourguignon N, Lux-Lantos VAR, Libertun C. Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rat. *Environ Health Perspect* 2010; 118(9): 1217-22.

LABORATORIO DE REGULACIÓN HIPOFISARIA

El receptor dopaminérgico D2: acciones endocrinas no clásicas

Non-conventional endocrine functions of dopamine type 2 receptor: new insights gained from transgenic mice

O receptor dopaminérgico D2: ações endócrinas não clássicas

Isabel Garcia Tornadú, María Victoria Recouvreux, María Cecilia Ramirez, María Guillermina Luque, María Ines Perez-Millan, Rodrigo Lorenzo, María Cristina Camilletti, Ana María Ornstein, Isabel Lacau-Mengido, Carolina Cristina, Graciela Diaz-Torga, Damasia Becu-Villalobos

Resumen

El receptor dopaminérgico D2 (RD2) participa en un complejo repertorio de funciones adaptativas para mejorar el desempeño del individuo, su éxito reproductivo y supervivencia. Utilizando estrategias combinadas de ensayos farmacológicos, líneas celulares y ratones transgénicos, nuestro laboratorio demostró la participación del RD2 no sólo en el desarrollo de prolactinomas, sino en el eje del crecimiento, la ingesta y el metabolismo de glucosa. Determinamos que el desarrollo de prolactinomas por ausencia de RD2 correlaciona con un aumento de VEGF y una disminución de TGFβ1 y su receptor TGFβ tipo II, posicionando estos factores como posible terapia complementaria en prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos. En el eje de crecimiento, postulamos que la acción de RD2 facilita la liberación de GHRH, y la ausencia del receptor condiciona la población reducida de somatotropos, y produce enanismo. Respecto a la ingesta, los resultados indicaron que la ausencia de RD2 modula varios factores orexígenos y anorexígenos, revelando una mayor complejidad del sistema. Por último, demostramos que la dopamina a través del RD2 pancreático modula la liberación de insulina, esclareciendo en parte por qué el uso de antipsicóticos conlleva a un desarrollo de diabetes tipo II. En conjunto nuestros resultados destacan la importancia de este receptor en acciones endocrinas no clásicas y su participación en forma integral en la fisiología del individuo.

Palabras clave: dopamina * prolactina * hormona del crecimiento * ingesta * glucosa * homeostasis

Summary

Dopamine D2 receptors (D2R) participate in a complex system of adaptive functions to improve performance, reproductive success and survival of individuals. Using combined strategies with drug, cell lines and transgenic mice, our laboratory demonstrated that D2R take part, not only in the development of prolactinomas, but also in the regulation of the growth axis, food intake and glucose metabolism. It was determined that the development of prolactinomas due to the lack of D2R correlates with increased VEGF and decreased TGF β 1 and TGF type II receptor, positioning these factors as potential targets in complementary therapies for dopamine agonist resistant prolactinomas. With regard to the growth axis, it was postulated that D2R facilitates the release of GHRH, and the absence of the receptor determines a decrease in the somatotroph population and produces dwarfism. Regarding food intake, it was demonstrated that the absence of D2R modulates several orexigenic and anorexigenic factors, pointing to a complexity of the system. Finally, it was shown that dopamine modulates insulin release through pancreatic D2R, partly clarifying why the use of antipsychotics leads to development of type II diabetes. Overall, our results highlight the importance of this receptor in non-classical endocrine actions and enable the understanding of the integral physiology of the D2R in homeostasis.

Key words: *dopamine * prolactin * growth hormone * food intake * glucose * homeostasis*

Resumo

O receptor dopaminérgico D2 (RD2) participa num complexo repertório de funções adaptativas para melhorar o desempenho do indivíduo, seu êxito reprodutivo e sobrevivência. Utilizando estratégias combinadas de ensaios farmacológicos, linhas celulares e camundongos transgênicos, nosso laboratório demonstrou a participação do RD2 não só no desenvolvimento de prolactinomas, mas no eixo do crescimento, a ingestão e o metabolismo de glicose. Determinamos que o desenvolvimento de prolactinomas por ausência de RD2 correlaciona com um aumento de VEGF e uma diminuição de TGF β 1 e seu receptor TGF β tipo II, posicionando estes fatores como possível terapia complementar em prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos. No eixo de crescimento, postulamos que a ação de RD2 facilita a liberação de GHRH, e a ausência do receptor condiciona a população reduzida de somatotrofos, e produz nanismo. A respeito da ingestão, os resultados indicaram que a ausência de RD2 modula vários fatores orexígenos e anorexígenos, revelando uma maior complexidade do sistema. Por último, demonstramos que a dopamina através do RD2 pancreático modula a liberação de insulina, esclarecendo em parte por qué o uso de antipsicóticos leva a um desenvolvimento de diabetes tipo II. Em conjunto nossos resultados destacam a importância deste receptor em ações endócrinas não clássicas, e sua participação em forma integral na fisiologia do indivíduo.

Palavras chave: *dopamina * prolactina * hormônio do crescimento * ingestão * glicose * homeostase*

A lo largo de la evolución el receptor dopaminérgico tipo 2 (RD2) ha participado en un complejo repertorio de funciones adaptativas para mejorar el desempeño del individuo, su éxito reproductivo y supervivencia. Diversos mecanismos que aumentan la probabilidad de consumir alimentos nutritivos y aparearse recurrentemente usan la estimulación de este subtipo de receptor. Los RD2 también son fundamentales en la coordinación motora, la actividad de locomoción, el planeamiento, la motivación o aversión y la dominancia social. La participación del RD2 en la función endocrina refuerza su papel en la reproducción y supervivencia.

Es bien conocido en la fisiología endocrina que el RD2 regula la hormona prolactina, pero su participación en el control de otras hormonas relacionadas al crecimiento, ingesta de alimentos o metabolismo de la glucosa no ha sido extensamente estudiada. En general, la relevancia del RD2 ha sido demostrada usando agentes farmacológicos con limitada especificidad *in vivo*, o en estudios *in vitro* que no permiten un análisis integrador fisiológico. Nosotros demostramos la participación de este receptor no sólo en el desarrollo de prolactinomas, sino también en el eje del crecimiento, la ingesta y el metabolismo de glucosa usando en forma combinada ensayos farmacológicos y ratones transgénicos con mutación nula del RD2 en todo el organismo.

La dopamina inhibe la síntesis, secreción de prolactina y la proliferación de lactotrofos hipofisarios actuando a través del RD2. Nuestros primeros estudios se relacionaron a la tumorigénesis hipofisaria, sus mecanismos de control y las alteraciones producidas durante este proceso. En particular, los estudios se centralizaron en los prolactinomas, los tumores hipofisarios más frecuentes, dentro de los adenomas secretantes. Estos tumores se diferencian del resto de los tumores hipofisarios, pues en su mayoría son tratados exitosamente con agonistas dopaminérgicos logrando, en general, una rápida reducción del tamaño tumoral con liberación de los síntomas de compresión.

Sin embargo, en un 15% de los casos los prolactinomas pueden ser resistentes a drogas dopaminérgicas y es necesario recurrir a la cirugía para su extirpación. La hiperprolactinemia producida por los prolactinomas afecta la reproducción, por lo que el abordaje terapéutico del prolactinoma tiene como objetivo revertir dichas manifestaciones, como así también las de tipo neurológico y/u oftalmológico provocadas por la expansión tumoral.

En pacientes con prolactinomas resistentes a drogas dopaminérgicas sigue abierta la búsqueda de nuevas terapéuticas.

Nosotros abordamos el estudio de prolactinomas resistentes desde varias perspectivas experimentales, analizando los posibles factores involucrados en el proceso de desarrollo y funcionalidad del tumor. Utilizamos diferentes modelos experimentales tales como líneas ce-

lulares tumorales, generación de tumores por tratamientos farmacológicos, y modelos de animales transgénicos específicos. Por último, para tener una mayor comprensión del proceso patológico se realizaron estudios en tumores hipofisarios humanos.

Los ratones que carecen de la expresión del RD2, ratones *Drd2*^{-/-}, desarrollan en forma espontánea hiperprolactinemia seguida de hiperplasia de la hipófisis y finalmente un adenoma hipofisario. Este modelo experimental es útil para entender en parte lo que sucede en tumores hipofisarios resistentes a agentes dopaminérgicos (1).

Como ocurre para otros tipos de tumores, el crecimiento de los adenomas hipofisarios requiere de una adecuada vascularización una vez que el tumor sobrepasa unos pocos milímetros de tamaño. El factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF, es uno de los factores angiogénicos más potentes que se conocen. En ratones transgénicos *Drd2*^{-/-} demostramos que existe un aumento de la expresión de VEGF en las hipófisis y que este aumento es regulado por la falta de acción dopaminérgica (2). Por otro lado, no se vieron incrementados los factores angiogénicos PTTG [3] o FGF2 (4) (Fig. 1), lo que posiciona al sistema VEGF como blanco terapéutico en los adenomas hipofisarios secretores de prolactina y resistentes a agentes dopaminérgicos. En concordancia, tratamientos con terapia anti-VEGF resultaron en una inhibición del crecimiento tumoral y de la síntesis de prolactina en hipófisis *Drd2*^{-/-} (5). Además, los bajos niveles de FGF2 y PTTG encontrados podrían relacionarse al crecimiento lento y la rareza de metástasis que acompañan a estos tumores de naturaleza benigna.

Por otro lado, como sucede en el desarrollo de otros tumores, durante la tumorigénesis hipofisaria se producen profundos cambios en la estructura de los componentes de la matriz extracelular. Sin embargo, los prolactinomas rara vez producen metástasis. Por ello estudiamos los componentes de la matriz extracelular. Entre ellos, el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1), una citoquina que se encuentra implicada en múltiples y potentes acciones locales, procesos biológicos como embriogénesis, desarrollo y homeostasis celular, proliferación y modificaciones de la matriz extracelular. El TGF-β1 y su receptor TGFβ tipo II (TβRII) están expresados en los lactotopos donde se ha descrito que ejercen un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular y la secreción de prolactina. Nosotros demostramos que la expresión, activación y acción del TGFβ1 en hipófisis está disminuida en los ratones *Drd2*^{-/-} (6). Estos resultados apuntan hacia la búsqueda de nuevas drogas para el tratamiento de tumores resistentes a drogas dopaminérgicas relacionadas con TGFβ1 y sus activadores locales.

Por último, en tumores hipofisarios humanos y en particular en prolactinomas resistentes al tratamiento con agonistas dopaminérgicos, determinamos un in-

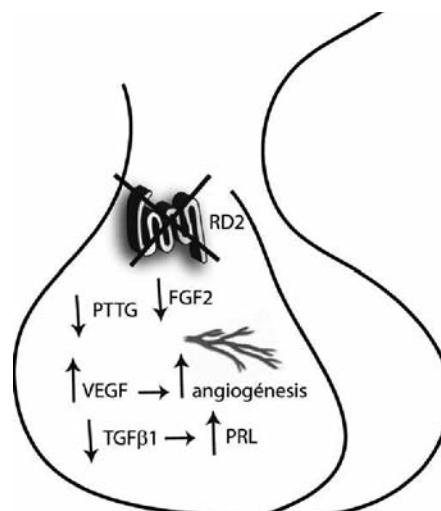


Figura 1. Efectos de la disrupción del RD2 en la hipófisis anterior. El aumento de prolactina por la falta del tono inhibitorio correlaciona con un aumento de VEGF y una disminución de TGFβ1. Otros factores angiogénicos como el PTTG y el FGF2 están disminuidos, quizás poniendo un freno a la angiogénesis inducida por VEGF.

cremento de VEGF y su asociación con marcadores de vascularización como el CD31 y CD34 (7) (8). Estos hallazgos ponen de relevancia la vascularización del tumor hipofisario también en el humano, en oposición a trabajos que cuestionaban el aumento de vasculatura en estos adenomas.

El uso de antipsicóticos en la clínica ha demostrado que además de la participación e importancia de la dopamina como neurotransmisor y neuromodulador en la regulación del sistema nervioso central los RD2 tienen funciones a nivel periférico que no son tan claras.

En particular, nosotros demostramos que la dopamina a través del RD2 modula el eje de crecimiento. Los animales transgénicos *Drd2*^{-/-} presentaron un eje de crecimiento alterado, con una baja talla y un menor peso corporal. Esto se correlacionó con menores niveles de hormona de crecimiento secretados por la hipófisis, y menor IGF-I circulante (9) (10). Postulamos que la dopamina central a través del RD2 impediría la correcta liberación de GHRH del hipotálamo en la ventana temporal del período neonatal, y por ende el desarrollo de la población de somatotropos estaría alterado (Fig. 2). En concordancia, en humanos se ha observado que la L-DOPA puede acelerar el crecimiento en niños con deficiencia de GH, y que una población de niños con polimorfismos en el RD2 presentó deficiencias en el eje de crecimiento, con talla baja idiopática. Finalmente, en adultos bajo tratamiento crónico con antipsicóticos se demostró una respuesta anormal de GH durante el sueño. En conjunto todos estos datos apuntan a una participación del RD2 en la regulación del eje GHRH-GH.

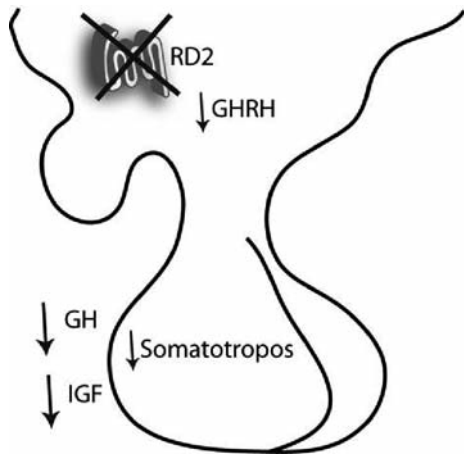


Figura 2. La falta de RD2 a nivel hipotalámico produce un descenso en la expresión de GHRH, y esta falla condiciona una inadecuada expansión del linaje somatotropo, con menor secreción de GH, y por ende de IGF-I circulante. En conjunto estas alteraciones producen una talla baja en roedores.

La dopamina regula el hambre y la saciedad actuando a nivel hipotalámico. Sin embargo, los efectos de la dopamina sobre la ingesta no son claros ya que interactúa con distintos núcleos hipotalámicos y estimula distintos subtipos de receptores.

En ratones mutantes nulos para el RD2 se observó un incremento en los gramos de alimento consumido por g de peso corporal. Sin embargo simultáneamente se describieron dos eventos anorexigénicos en estos ratones: un aumento en la α -MSH sérica e hipotalámica (la α -MSH es un potente anorexígeno), y una disminución del precursor de las orexinas (11). Estos eventos fueron compensados por el gran aumento de los niveles de prolactina que actúan como estímulo orexigénico (Fig. 3). Se ha descrito que la prolactina estimula la ingesta y la deposición de grasa en ratas hembras y que ratones deficientes del receptor de prolactina tienen una reducción progresiva en el peso corporal.

De nuestros resultados se destaca la compleja regulación del sistema de la ingesta, sistema primordial para la supervivencia. Múltiples factores actuarían en la regulación de la ingesta por el RD2, por un lado estos receptores tienen acciones orexigénicas estimulando las orexinas y la α -MSH, y por otro, anorexigénicas inhibiendo en forma constante la secreción de prolactina.

En humanos, la reducción de los RD2 se asocia con comportamientos adictivos, pero la evidencia sobre mutaciones en el RD2 y obesidad es escasa, aunque en general las mutaciones con pérdida de función se asocian a sobrepeso.

Recientemente se describió que existe una estrecha vinculación del uso de drogas antisicóticas y el desarrollo de diabetes tipo II. Nosotros demostramos que la dopamina también actúa a nivel del islote de Langer-

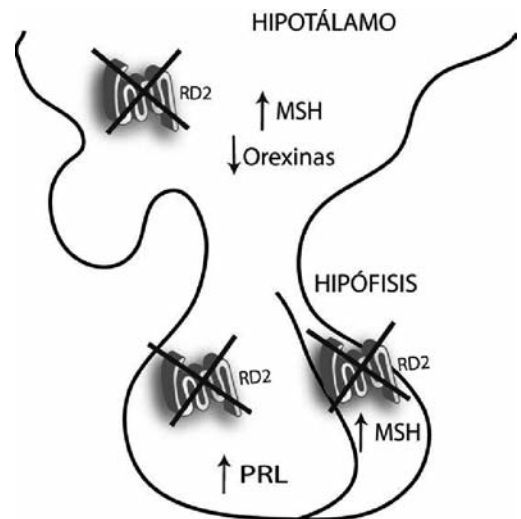


Figura 3. La disrupción del RD2 afecta distintos componentes reguladores de la ingesta. A nivel central se produce una disminución de las orexinas, y un aumento de α MSH. A nivel de la neurohipófisis se produce un aumento de secreción de α MSH por parte de los melanotropos, y en la hipófisis anterior un aumento de prolactina. El gran aumento de prolactina podría estar relacionado con el aumento de la ingesta del modelo, a pesar del descenso de orexinas y el incremento de α MSH (anorexígeno).

hans, regulando en forma inhibitoria la secreción de insulina. Utilizando los modelos animales de mutantes nulos, definimos que la ausencia de la acción dopaminérgica sobre el islote (dada por ejemplo por el uso de drogas que antagonizan al RD2, o en forma constitutiva en los transgénicos), produce una secreción aumentada de insulina, lo que crónicamente conduce a un lento deterioro y agotamiento de las reservas insulínicas del islote (Figura 4) [12].

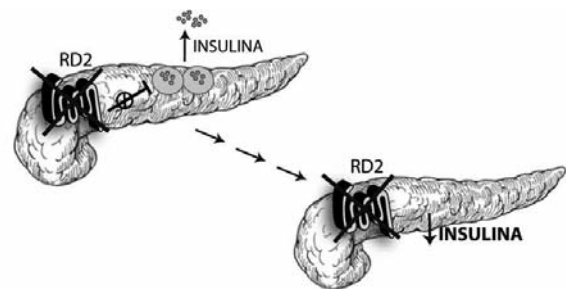


Figura 4. La falta de RD2 en el islote promueve la liberación de insulina, si esto se mantiene en forma crónica los islotes se agotan, y finalmente no descargan insulina en forma adecuada.

Este es un enfoque original, no presentado hasta ahora en la literatura, que resalta al páncreas como posible blanco no deseado de los tratamientos antisicóticos, y destaca la necesidad de desarrollar nuevos fármacos más específicos teniendo en consideración los posibles efectos negativos a este nivel.

Nuestros resultados en su conjunto, traen a la luz las complejas acciones endocrinas de los RD2 a distintos niveles del organismo, el hipotálamo, la hipófisis y el páncreas, destacando que el funcionamiento de estos receptores en forma orgánica y coordinada promueve el éxito reproductivo, el crecimiento, la ingesta y un metabolismo equilibrado.

Referencias bibliográficas

1. Cristina C, García-Tornadú I, Diaz-Torga G, *et al.* The dopaminergic D2 receptor knockout mouse: an animal model of prolactinoma. *Front Horm Res* 2006; 35: 50-63.
2. Cristina C, Diaz-Torga G, Baldi A, *et al.* Increased pituitary vascular endothelial growth factor-A in dopaminergic D2 receptor knockout female mice. *Endocrinology* 2005; 146: 2952-62.
3. Cristina C, Diaz-Torga GS, Goya RG, *et al.* PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. *Mol Cancer* 2007; 6: 4.
4. Cristina C., Diaz-Torga G., Gongora A, *et al.* Fibroblast Growth Factor-2 in hyperplastic pituitaries of D2R knockout female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E1341-51.
5. Luque GM, Perez-Millan MI, Ornstein AM, *et al.* Inhibitory effects of anti-VEGF strategies in experimental dopamine resistant prolactinomas. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337: 766-74.
6. Recouvreux MV, Guida MC, Rifkin DB, *et al.* Active and Total Transforming Growth Factor- β 1 Are Differentially Regulated by Dopamine and Estradiol in the Pituitary. *Endocrinology* 2011; 152.
7. Cristina C, Perez-Millan MI, Luque G, *et al.* VEGF and CD31 association in pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2010; 21: 154-60.
8. Mallea-Gil MS, Cristina C, Perez-Millan MI, *et al.* Invasive giant prolactinoma with loss of therapeutic response to cabergoline: expression of angiogenic markers. *Endocr Pathol* 2009; 20: 35-50.
9. Diaz-Torga G, Feierstein C, Libertun C, *et al.* Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. *Endocrinology* 2002; 143: 1270-9.
10. Garcia-Tornadu I, Rubinstein M, Gaylinn BD, *et al.* GH in the dwarf dopaminergic D2 receptor knockout mouse: somatotrope population, GH release, and responsiveness to GH-releasing factors and somatostatin. *J Endocrinol* 2006; 190: 611-9.
11. Garcia-Tornadu I, Diaz-Torga GS, Risso G, *et al.* Hypothalamic orexin, OX1, α MSH, NPY and MCRs expression in dopaminergic D2R knockout mice. *Neuropeptides* 2009; 43: 267-74.
12. Garcia-Tornadu I, Ornstein AM, Chamson-Reig A, *et al.* Disruption of the Dopamine D2 Receptor impairs insulin secretion and causes glucose intolerance. *Endocrinology* 2010; 151:1441-50.

LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA

Eventos tempranos condicionantes de enfermedades neurodegenerativas

Early events as conditioning factors of neurodegenerative diseases

Eventos precoces condicionantes de doenças neurodegenerativas

Héctor Coirini, María Sol Kruse, Mariana Rey, Marina Roxana Di Pilla, María Cristina Vega

Resumen

Estudios clínicos sugieren que las complicaciones obstétricas están relacionadas con el desarrollo de alteraciones funcionales en el sistema nervioso central del individuo adulto. Una hipótesis establecida indica que las enfermedades neurodegenerativas estarían asociadas a un proceso iniciado por un estrés oxidativo temprano, y mediante distintos modelos experimentales tratamos de identificar cambios que pueden producirse durante la preñez, o al momento del nacimiento, relacionados con trastornos conductuales o cognitivos descriptos en enfermedades neurodegenerativas. De esta manera mediante una asfixia perinatal global que no afecta la sobrevivencia del individuo, hemos descripto alteraciones en las sinapsis de neocórtex e hipocampo, observando agregación proteica y ubiquitinación aumentada así como cambios en el contenido de actina, mientras que en retina describimos alteraciones en la actividad de la óxido nítrico sintasa. Resultados similares fueron reproducidos *in vitro* usando cultivos organotípicos, donde las estructuras del cerebro y las conexiones entre los diferentes núcleos se conservan. En un tercer modelo donde se induce una diabetes gestacional (DG) hemos evidenciado alteraciones importantes en las vías de señalización intracelular en cerebro embrionario involucradas en el proceso de muerte celular programada. En este mismo modelo estamos evaluando los efectos de la DG sobre la expresión de receptores hepáticos X y su relación con la expresión de la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave: estrés oxidativo * cultivos organotípicos * asfixia perinatal * óxido nítrico sintasa * enfermedad de Alzheimer * diabetes gestacional * retina

Summary

Clinical studies suggest that obstetric complications are related to the development of functional alterations in the central nervous system of an adult. An established hypothesis suggests that neurodegenerative diseases would be associated