

# NEUROTENSINA Y OTROS PÉPTIDOS REGULADORES EN EL DESARROLLO HIPOFISARIO HUMANO Y EN ADENOMAS HIPOFISARIOS

---

**Ricardo Reyes<sup>1,2</sup>, Miriam González<sup>2,3</sup>, Francisco Valladares<sup>2,3</sup>, Aixa R. Bello<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>UDI. Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de la Laguna

<sup>2</sup>Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología. Facultad de Medicina. Universidad de la Laguna

<sup>3</sup>Fundación del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC)

---

## ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN
  2. NEUROTENSINA Y OTROS PÉPTIDOS REGULADORES EN EL DESARROLLO HIPOFISARIO
  3. NEUROTENSINA Y ENFERMEDADES TUMORALES
  4. REFERENCIAS
-

## **1. INTRODUCCIÓN**

La Neurotensina (NT) es un tridecapéptido aislado inicialmente a partir de extractos de hipotálamo bovino por Carraway y Leeman, 1973. Además de en el sistema nervioso central, se ha comprobado que la NT está presente en numerosas localizaciones en el organismo siendo producida en el sistema endocrino, tracto digestivo, sistema reproductor, etc. Desde su descubrimiento numerosos estudios han puesto de manifiesto el papel de la neurotensina en un amplio rango de procesos fisiológicos y patológicos en el organismo. A nivel fisiológico, la NT es considerada como neurohormona y/o neuromodulador en mamíferos, donde ha sido implicada principalmente en la regulación de la función hipofisaria, específicamente afectando la secreción de todas las hormonas de la adenohipófisis (Eckland y Lightman, 1987; Watanobe y Takebe, 1993; Vijayan y col., 1994), y en diferentes niveles del sistema neuroendocrino (Vijayan y col., 1994; Rostene y Alexander, 1997). En el sistema nervioso central, la NT se localiza principalmente en varios núcleos hipotalámicos implicados entre otros procesos en el control de la función gonadal (Kahn y col., 1980; Jennes y col., 1982). Además, la expresión de NT a nivel central se solapa con la expresión de receptores de estrógenos (Pfaff y Keiner, 1973; Stumpf y col., 1975; Axelson y col., 1992) y con la expresión del factor liberador de gonadotropinas (GnRH) (King y col., 1982; Witkin y col., 1982), indicando que la expresión de NT está regulada por los niveles circulantes de hormonas sexuales.

Como hormona peptídica, la NT ejerce sus efectos principalmente a través de dos receptores del tipo 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G, el receptor de NT 1 (NTR1), un receptor de alta afinidad, y el receptor de NT 2 (NTR2), un receptor de baja afinidad. El NTR1 se expresa en el sistema nervioso central, en los intestinos delgado y grueso, en el hígado (Mustain y col., 2011), hipófisis (Bello y col., 2004), gónadas (González y col., 2011), mama y próstata (Carraway y Plona, 2006) donde se ha demostrado su papel de factor de crecimiento. De la misma forma se ha estudiado su expresión en neoplasias de estos tejidos indicando su papel proliferativo también en células tumorales. El NTR2 presenta una expresión más extensa en el sistema nervioso central que NTR1 pero no se expresa en el tracto gastrointestinal (Johnson, 2006). Dos receptores adicionales, Sortillina/NTR3 y sorLA/LR1 1, se ha encontrado que se unen a NT entre otros ligandos. Ambos receptores presentan un único dominio transmembrana y se expresan principalmente en el sistema nervioso, aunque también se expresan en el tejido adiposo, gónadas y linfático (Jacobsen y col., 2001). Mientras que los efectos de la NT mediados a través de NTR1 y NTR2 han podido establecerse con cierta precisión, los efectos de la NT mediados por la Sortillina/ NTR3 permanecen aún por dilucidar.

## **2. NEUROTENSINA Y OTROS PÉPTIDOS REGULADORES EN EL DESARROLLO HIPOFISARIO**

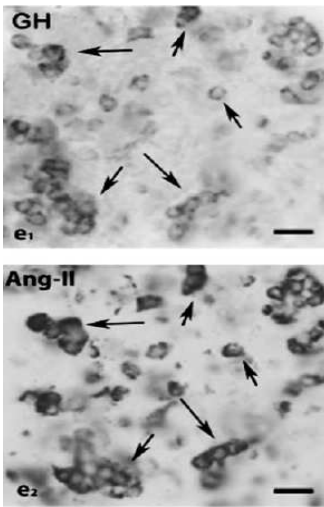
Dado el relevante papel de la hipófisis como glándula principal del sistema neuroendocrino y la importancia de su desarrollo para conocer el establecimiento de sus funciones reguladoras en el adulto, este ha sido ampliamente estudiado en todos los grupos de vertebrados (Schreibman and Margolis-Kazan, 1979; Gasc and Sar, 1981; Moriceau-Hay et al., 1982; Pearson and Litch, 1982; Pearson et al., 1983; Thommes et al., 1987; Batista et al., 1989; Allaerts et al., 1999; Reyes et al., 2008a, 2008b). La expresión diferencial de numerosos genes, algunos generales y otros específicos, han permitido ir construyendo el complejo proceso de desarrollo y diferenciación de la hipófisis. Entre todo el conjunto de factores implicados en dicho proceso, los péptidos presentes en las células hipofisarias adultas regulando sus funciones también parecen jugar un papel relevante en el desarrollo, papel que está aún muy lejos de ser bien comprendido. A pesar de su importancia, el estudio de péptidos en la hipófisis humana es casi inexistente.

Teniendo en cuenta el amplio estudio sobre la NT y su papel en la proliferación tumoral en los últimos años, con el fin de estudiar esta función en los adenomas hipofisarios, decidimos en primer lugar hacer un estudio del desarrollo de las distintas hormonas en humanos y la posible presencia de péptidos en esta fase de la vida, ya que carecemos curiosamente de trabajos en este campo. Los objetivos principales de este trabajo (Reyes y col., 2008) fueron: por un lado establecer la secuencia de aparición de las distintas células secretoras de hormonas y por otro establecer qué péptidos se expresaban y en qué tipos celulares a fin de establecer posibles correlaciones funcionales. Para ello se estudiaron hipófisis de fetos humanos obtenidas tras abortos espontáneos, abortos legales programados o muerte intrauterina. Se analizaron un total de 24 hipófisis correspondientes a los estadios 9, 19, 23, 30, 36 y 37 semanas de gestación. El uso de dicho material así como todo el estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario de Canarias (HUC). Las hipófisis se analizaron mediante una técnica inmunoenzimática indirecta frente a una batería de anticuerpos contra las hormonas hipofisarias: hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona folículo estimulante (FSH), hormona somatotropa (STH) u hormona del crecimiento (GH) y prolactina (PRL) y contra los péptidos angiotensina-II (Ang-II), neurotensina (NT) y galanina (Gal).

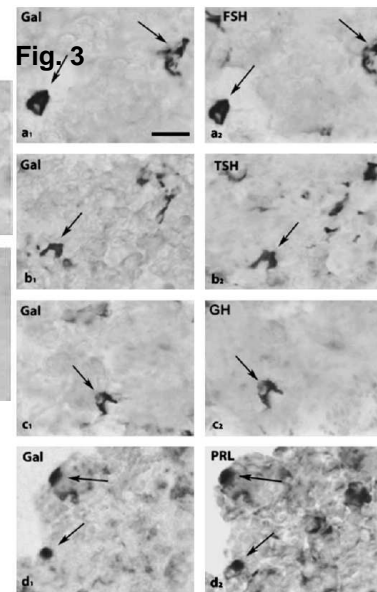
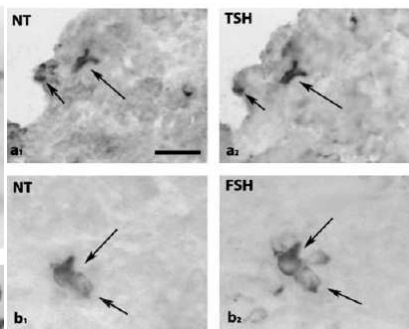
Los resultados de este estudio mostraron una secuencia de diferenciación de los distintos tipos de células secretoras diferente al que se ha establecido en la mayoría de las especies de mamíferos. Las primeras células detectadas a las 9 semanas del desarrollo fetal fueron las células GH-inmunoreactivas (GH-ir) mayoritariamente y en menor número las células TSH-ir y células FSH-ir. Uno de los aportes más interesantes de este estudio fue la detección de Ang-II-ir

colocalizando con GH-ir en las mismas células (Fig. 1). Esta localización fue de un 100%. La GH y la Ang-II experimentaron variaciones similares a lo largo del desarrollo. Al final del mismo, se observaron células Ang-II que no correspondían a células GH-ir. A las 23 semanas de vida fetal se detectaron las primeras células PRL-ir y  $\beta$ End-ir en la zona más externa del lóbulo anterior. En este estadio se detectaron por primera vez las primeras células NT-ir y Gal-ir. A las 30 semanas de desarrollo fetal se detectaron por primera vez el resto de las hormonas derivadas de la pro-opiomelanocortina,  $\alpha$ MSH,  $\beta$ MSH y ACTH. Entre las 30 y las 36 semanas, final del desarrollo fetal, todas las poblaciones de células secretoras aumentaron en número alcanzando la distribución observada en el adulto. Los estudios de colocalización mostraron que la NT estaba presente en células TSH-ir y FSH-ir (Fig. 2) entre otras que no pudieron ser determinadas. La Gal, además de en estos dos tipos celulares, se colocalizó también con la PRL y la GH (Fig. 3). Como aportaciones principales de este trabajo: 1) Se estableció la secuencia de aparición de las células productoras de hormonas de la hipófisis en humanos, encontrando que es la única especie estudiada donde no se diferencian en primer lugar las células ACTH; 2) Se demostró que en humanos las primeras células en diferenciarse son las células productoras de hormona del crecimiento (GH) y no las productoras de ACTH como se ha visto en múltiples especies y que estas últimas se diferencian en la última etapa del desarrollo fetal humano; 3) Se describió por primera vez en el desarrollo hipofisario humano la presencia de 3 péptidos, la Ang-II, la NT y la Gal, estableciéndose su colocalización en los distintos tipos de células secretoras; 4) Se establecieron comparaciones con otras especies de vertebrados en relación a la presencia de péptidos y se concluyó que, la presencia de estos, en tipos celulares concretos, debe estar en relación con el papel de los mismos en el desarrollo y la diferenciación de la hipófisis, mientras que otros, como la NT siguen estando presentes en el individuo adulto en los mismos tipos celulares.

**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Figura 1.** Sección de hipófisis de un embrión de 9 semanas de gestación (E.9) en la que se muestra la presencia de células GH-ir (e<sub>1</sub>) que son también Ang-II-ir (e<sub>2</sub>). Barra de escala 20 µm. **Figura 2.** Sección de hipófisis de un embrión de 23 semanas de gestación (E.23) en la que se muestra la presencia de células NT-ir (a<sub>1</sub>) que son también TSH-ir (a<sub>2</sub>) y células NT-ir (b<sub>1</sub>) que son también FSH-ir (b<sub>2</sub>). Barra de escala 20 µm. **Figura 3.** Sección de hipófisis de un embrión de 23 semanas de gestación (E.23) en la que se muestra la presencia de células Gal-ir (a<sub>1</sub>) que son también FSH-ir (a<sub>2</sub>), células Gal-ir (b<sub>1</sub>) que son también TSH-ir (b<sub>2</sub>), células Gal-ir (c<sub>1</sub>) que son también GH-ir (c<sub>2</sub>) y células Gal-ir (d<sub>1</sub>) que son también PRL-ir (d<sub>2</sub>). Barra de escala 20 µm.)

### 3. NEUROTENSINA Y ENFERMEDADES TUMORALES

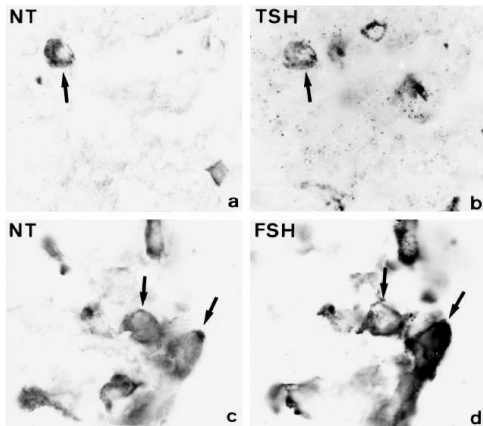
Múltiples estudios apoyan el papel de la NT en la estimulación de la proliferación celular. Su mecanismo de acción no se conoce exactamente pero puede actuar como un factor endocrino, paracrino o autocrino en tumores de distintos tejidos incluyendo el de páncreas, colorrectal, próstata, pulmón y mama (Carraway y Plona, 2006). La secreción de NT y la expresión de receptores de NT por diferentes cánceres de origen epitelial han sido bien documentadas. Nuestro grupo (Rodríguez y col., 2010) ha sido el primero en describir la expresión de NT en tumores de miometrio. Hemos observado una mayor expresión de NT y NTR1 en las células del músculo liso de los leiomiomas en comparación con el miometrio sano. Estos hallazgos fueron aún más evidentes en los tumores procedentes de mujeres tratadas con esteroides sexuales para la fecundación *in vitro* (FIV), de acuerdo con el hecho de que E2 estimula la expresión de NT en la mama y el tejido neuroendocrino (Bello y col., 2004; Dupouy y col., 2009). Alifano y col. (2010) examinaron recientemente una serie de 52 pacientes en tratamiento por melanoma maligno durante un período de 4 años y detectó la presencia de NT y NTR1 en el 71,1% y el 90,4% de los casos, respectivamente. Un dato importante es que la expresión de NT sea un hecho temprano en el cáncer de varios tejidos, por ejemplo en el colon donde Souazé y colaboradores (2006) demostraron que la expresión de NT era

progresivamente mayor desde adenomas a carcinoma. También se había observado en tumores endocrinos de páncreas con un potencial maligno (Carraway y col., 1988; Eriksson y col., 1989), siendo ahora aceptado el cáncer de páncreas como uno de los que expresan NT.

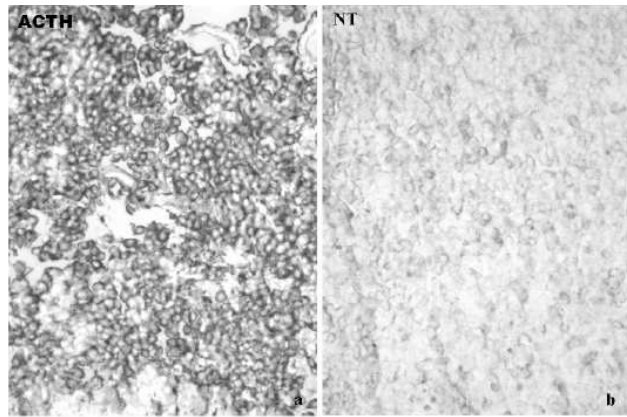
Los adenomas hipofisarios (AH), uno de los tumores endocrinos más frecuentes, aunque benignos en un elevado porcentaje, suelen ser tumores secretores de una determinada hormona dependiendo de su origen, lo que ocasiona una clínica muy llamativa en la mayoría de los casos, como consecuencia de los elevados niveles de hormona. El primero de los trabajos realizados en adenomas hipofisarios (Reyes y col., 2007) tuvo como objetivo saber en qué afectaba la presencia del tumor a la secreción normal de las células hipofisarias y por otro lado, saber si el péptido NTS se expresaba en el tumor aunque fuera de un tipo celular diferente al que lo expresa en condiciones normales. El material fue un tumor de hipófisis diagnosticado como microadenoma cromóforo. El tumor resultó ser un microadenoma benigno secretor de ACTH extirpado a una paciente que presentaba en el momento del diagnóstico un síndrome de Cushing o hipercortisolismo 2º, en este caso a la hipersecreción de ACTH por el microadenoma hipofisario. La muestra, que incluía tejido tumoral además de una porción de tejido sano adyacente al tumor, se fijó en formol al 10% y se realizaron cortes de congelación sobre los que se realizó una técnica inmunoenzimática indirecta para las distintas hormonas hipofisarias así como para los péptidos NT, Ang-II, VIP (péptido intestinal vasoactivo) y SP (sustancia P).

Los resultados mostraron en el tejido sano adyacente al tumor la ausencia de ACTH y hormona de crecimiento (GH), mientras que la expresión del resto de hormonas, FSH, TSH y PRL mostró un patrón normal. Asimismo, la expresión del resto de hormonas derivadas de la POMC ( $\beta$ End,  $\alpha$ MSH y  $\beta$ MSH) fue normal excepto la  $\beta$ End que mostró una inmunoreacción extremadamente débil. Se observó además la expresión de NT en células TSH-ir y FSH-ir (Fig. 4) (igual que en condiciones normales) y la expresión de VIP en células FSH-ir y de SP en células  $\beta$ MSH-ir (Fig. 5). El estudio del tejido tumoral, mostró la expresión masiva de ACTH, confirmando el diagnóstico de microadenoma secretor de ACTH y mostró la presencia de NT y SP en las células tumorales ACTH-ir. La aportación más interesante de este trabajo, fue demostrar por primera vez que la NT y la SP pueden modular la proliferación tumoral en la hipófisis al igual que en otros tejidos (Fig. 6).

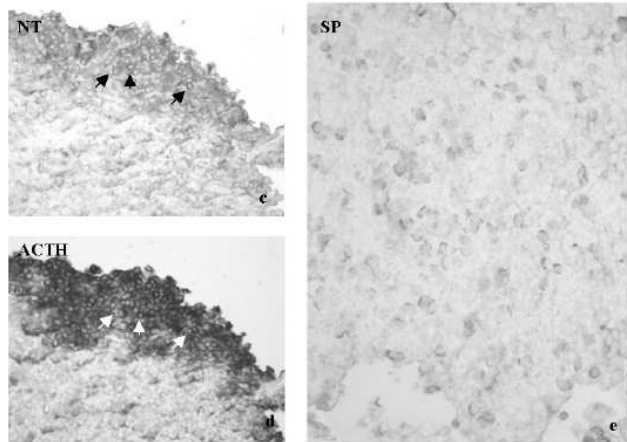
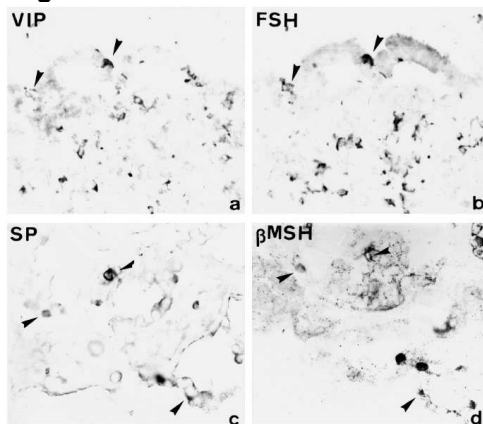
**Fig. 4**



**Fig. 6**



**Fig. 5**



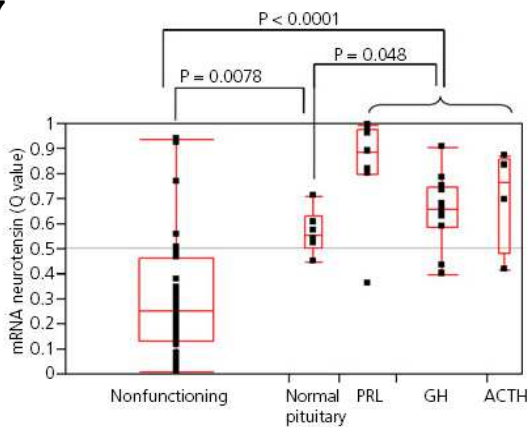
**Figura 4.** Sección de hipófisis adulta correspondiente al tejido periadenomatoso que muestra la presencia de células NT-ir (a) y (c) que muestran también inmunoreacción para las hormonas TSH (TSH-ir) (b) y FSH (FSH-ir) (d) respectivamente. **Figura 5.** Sección de hipófisis adulta correspondiente al tejido periadenomatoso que muestra la presencia de células VIP-ir (a) que muestran también inmunoreacción para la hormona FSH (FSH-ir) (b) y la presencia de células SP-ir (c) que muestran inmunoreacción con derivados de la POMC, en este caso  $\beta$ MSH( $\beta$ MSH-ir) (d). **Figura 6.** Sección de adenoma hipofisario secretor de ACTH que muestra la presencia de intensa inmunoreacción para ACTH (a) así como para los péptidos Neurotensina (b) y Sustancia P (e). Detalle del margen que confirma la presencia de NT-ir (c) en las células tumorales ACTH-ir (d).

Un segundo trabajo que abordamos en colaboración con el grupo de endocrinología celular y molecular de la Universidad de Sao Paulo, fue el estudio de la expresión de NT y de sus receptores (NTR1, 2 y 3) en una serie de 50 adenomas hipofisarios (11 secretores de GH, 8 secretores de prolactina, 4 secretores de ACTH y 27 no funcionales (no secretores)) (Giorgi y col., 2008).

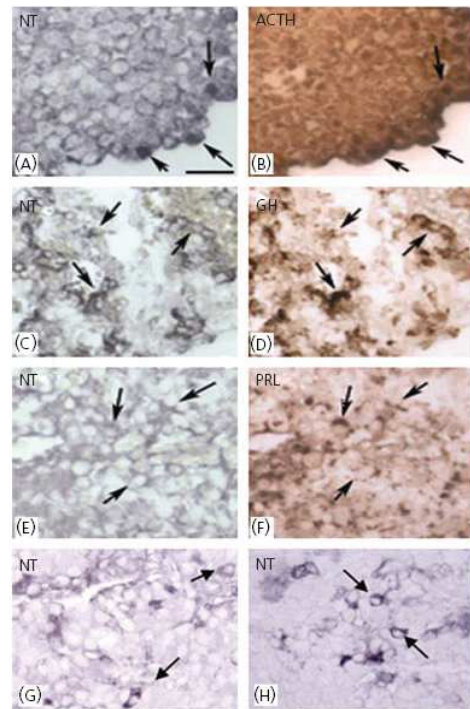
En las muestras se midió por PCR a tiempo real la cantidad de ARNm de NT, observándose expresión en todas ellas, con un nivel significativamente más alto en los adenomas funcionales en comparación con los no funcionales (Fig. 7). El análisis de los

diferentes receptores mostró curiosamente, ausencia de expresión de los receptores NTR1 y 2 mientras que sí se detectó expresión de NTR3 (Fig. 8). La expresión de NT y NTR 3 se confirmó mediante inmunohistoquímica. La presencia de NT se confirmó en todos los adenomas, tanto funcionales como no funcionales (Fig. 9). En los primeros se confirmó la colocalización del péptido con cada una de las hormonas correspondientes producidas por cada tipo de célula origen del tumor. La aportación más interesante de este trabajo fue detectar la presencia de altos niveles de NT y NTR3 en células tumorales corticotropas, lactotropas y somatotropas, que no contienen NT en la hipófisis normal. Esto sugiere un posible papel para la NT mediante estimulación autocrina y/o paracrina a través de su receptor NTR3 en la tumorigénesis de adenomas hipofisarios funcionales.

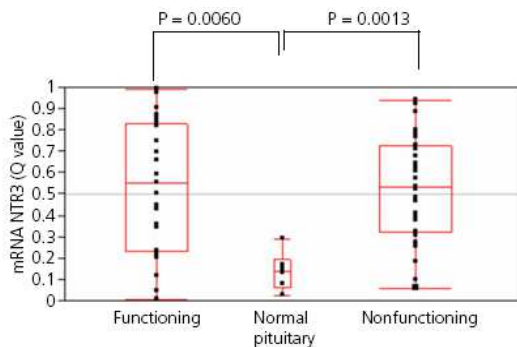
**Fig. 7**



**Fig. 9**



**Fig. 8**



**Figura 7.** Expresión relativa de los niveles de mRNA de NT en 50 adenomas hipofisarios en comparación con 6 hipófisis normales determinados por Real time PCR. Los límites del rectángulo representan los percentiles 25 y 75. La línea horizontal en el interior del rectángulo representa el valor medio. **Figura 8.** Expresión relativa de los niveles de mRNA del receptor 3 de en adenomas hipofisarios funcionales y no funcionales en comparación con hipófisis normal determinados por Real time PCR. Los límites del rectángulo representan los percentiles 25 y 75. La línea horizontal en el interior del rectángulo representa el valor medio. **Figura 9.** Colocalización de Neurotensina (NT-ir) y hormonas en adenomas hipofisarios. (A,B) Células NT-ir (A) que son también ACTH-ir (B). (C,D) Células NT-ir (C) que son también GH-ir (D). (E,F) Células NT-ir (E) que son también PRL-ir (F). (G,H) Células NT-ir en macroadenomas hipofisarios no funcionales. Barra de escala 20  $\mu$ m.



#### 4. REFERENCIAS

Alifano M, Loi M, Camilleri-Broet S, Régnard JF, Forgez P. Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma. *Biochimie* 2010; 92:164–170.

Allaerts W, Boonstra-Blom AG, Peeters K, Janse EM, Berghman LR, Jeurissen SH. Prenatal development of hematopoietic and hormone-producing cells in the chicken adenohypophysis. *Gen Comp Endocrinol.* 1999; 114:213–24.

Axelson JF, Shannon W, Van Leeuwen FW. Immunocytochemical localization of estrogen receptors within neurotensin cells in the rostral preoptic area of the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 1992; 136:5–9.

Batista MAP, Doerr-Schott J, Bello AR. Immunohistochemical study on the development of the adenohypophysial cells in the lizard *Gallotia galloti*. *Anat Embryol.* 1989; 180:143–9.

Bello AR, Reyes R, Hernández G, Negrín I, González M, Tramu G, Alonso R. Developmental expression of neurotensin in thyrotropes and gonadotropes of male and female rats. *Neuroendocrinology* 2004; 79:90–99.

Carraway R, Leeman SE. Isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalamus. *J Biol Chem* 1973; 248:6854–6861.

Johnson LR. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 4th ed. Burlington, MA: Elsevier Academic Press; 2006.

Carraway RE, Plona AM. Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. *Peptides* 2006; 27:2445–60.

Carraway RE, Mitra SP, Feurle GE, Hacki WH. Presence of neurotensin and neuromedin-N within a common precursor from a human pancreatic neuroendocrine tumor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 66:1323-8.

Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS One* 2009; 4:e4223.

Eckland DJA, Lightman SL. Neurotensin in hypothalamo-hypophysial portal blood. *Brain Res.* 1987; 421:161–6.

Eriksson B, Arnberg H, Oberg K, Hellman U, Lundqvist G, Wernstedt C, Wilander E. Chromogranins--new sensitive markers for neuroendocrine tumors. *Acta Oncol.* 1989; 28:325-9.

Gasc J, Sar M. Appearance of LH-immunoreactive cells in the Rathke's pouch of the chicken embryo. *Differentiation* 1981; 20:77–80.

Giorgi RR, Chile T, Bello AR, Reyes R, Fortez MAHZ, Machado MC, Cescato VA, Musolino NR, Bronstein MD, Giannella-Neto D, Côrrea-Giannella ML. Expression of Neurotensin and its Receptors in Pituitary Adenomas. *J Neuroendocrinol.* 2008; 20:1052-1057.

González-Gómez M, Reyes R, Damas C, Sánchez López CR, Alonso R, Bello AR. Effects of prenatal and postnatal exposure to bisphenol-A in the rat pituitary gonadal axis. *Biol Reprod.* 2011; Submitted.

Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, et al. Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem* 2001; 276:22788–96.

Johnson LR. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 4th ed. Burlington, MA: Elsevier Academic Press; 2006.

King JC, Tobet SA, Snavely FL, Arimura AA. LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis. *J Comp Neurol* 1982; 209:287–300.

Moriceau-Hay D, Doerr-Schott J, Dubois MP. Immunohistochemical demonstration of TSH, LH et ACTH cells in the hypophysis of tadpoles of *Xenopus laevis* D. *Cell Tissue Res.* 1982; 225:54–7.

Mustain WC, Rychahou PG, Ebares M. The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011; 18:75–82.

Pearson AK, Wurst GZ, Cadle JE. Ontogeny and immunocytochemical differentiation of the pituitary gland in a sea turtle, *Caretta caretta*. *Anat Embryol.* 1983; 167:13–37.

Pfaff D, Keiner M. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol* 1973; 151:121–158.

Reyes R, Martínez S, González M, Tramu G, Bello AR. Origin of Adenohypophysial Lobes and Cells from Rathke's Pouch in Swiss Albino Mice. Proliferation and Expression of Pitx 2 and Calbindin D28K in Corticotropic and Somatotropic cell Differentiation. *Anat Histol Embryol.* 2008; 37:263-71.

Reyes R, González M, Bello AR. Origin of Adenohypophysial Lobes and Cells from Rathke's Pouch in Chicken (*Gallus gallus*) and Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). Expression of Calcium-Binding Proteins. *Anat Histol Embryol.* 2008; 37:272-8.

Reyes R, Valladares F, Gutiérrez R, González M, Bello AR. Immunohistochemical distribution of regulatory peptides in the human fetal adenohypophysis. *J Anat.* 2008; 212:817-26.

Reyes R, Valladares, Díaz-Flores L, Feria L, Alonso R, Tramu G, Bello AR. Immunohistochemical localization of hormones and peptides in the human pituitary cells in a case of hypercortisolism by ACTH secreting microadenoma. *Histol Histopathol.* 2007; 22:709-17.

Rodríguez Y, Almeida TA, Valladares F, et al. Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas. *Biol Reprod* 2010; 83:641–7.

Rostene WH, Alexander MJ. Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 1997; 18:115–73.

Schreibman MP, Margolis-Kazan H. Immunocytochemical localization of gonadotropin, its subunits and thyrotropin in the teleost, *Xiphophorus maculatus*. *Gen Comp Endocrinol.* 1979; 39:467–74.

Souazé F, Viardot-Foucault V, Roullet N, Toy-Miou-Leong M, Gompel A, Bruyneel E, Comperat E, Faux MC, Mareel M, Rostene W, Flejou JF, Gespach C, Forgez P. Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/ beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* 2006; 27:708–16.

Stumpf WE, Sar M, Keefer DA. Atlas of Estrogen Target Cells in Rat Brain In: Stumpf WE, Grant LD, eds. *Anatomical Neuroendocrinology.* 1975: 104–19.

Thommes RC, Umporowicz DM, Leung FC, Woods JE. Ontogenesis of immunocytochemically demonstrable somatotrophs in the adenohypophyseal pars distalis of the developing chick embryo. *Gen Comp Endocrinol.* 1987; 67: 390–8.

Vijayan E, Carraway R, Leeman SE, McCann SM. Physiological significance of neurotensin in pituitary glycoprotein hormone release as revealed by *in vivo* and *in vitro* studies with neurotensin antiserum. *Neuroendocrinology* 1994; 60:157–64.

Watanobe H, Takebe K. In vivo release of neurotensin from the median eminence of ovariectomized estrogen-primed rats as estimated by push-and-pull perfusion: correlation with luteinizing hormone and prolactin surges. *Neuroendocrinology* 1993; 57:760–4.

Witkin JW, Paden CM, Silverman AJ. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) system in the rat brain. *Neuroendocrinology* 1982; 35:429–38.