



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

MEDICINA INTERNA

EFFECTOS DE LA GASTRINA Y LA  
BOMBESINA, SOBRE LA SECRECIÓN  
DE HORMONA DE CRECIMIENTO  
(GH) EN LA RATA.

AUTOR: Luis Benítez de Castro

DIRECTORES: Eduardo Zamora Madaria

Fernando Domínguez Puente

11 de Noviembre de 1988

D. EDUARDO ZAMORA MADARIAS, CATEDRATICO DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que D. Luis Benitez de Castro, ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Medicina Interna de esta Facultad, la Tesis Doctoral: EFECTOS DE LA GASTRINA Y LA BOMBESINA, SOBRE LA SECRECION DE HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN LA RATA, habiéndolo revisado el que suscribe la presente tesis y estando conforme en su presentación para ser juzgada.

En Sevilla a 12 de Octubre de 1988

V.B.

EL DECANO





DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO  
FACULTAD DE MEDICINA  
SANTIAGO DE COMPOSTELA

*Laboratorios de Neurociencia*

*Ramón Domínguez*

FERNANDO DOMÍNGUEZ PUENTE, PROFESOR TITULAR DE FISILOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA:

CERTIFICA :

Que durante el curso académico 87-88 el Licenciado Dn Luis Benítez de Castro ha estado realizando bajo mi dirección los estudios experimentales encaminados a esclarecer los efectos que la bombesina y la gastrina tienen "in vivo" e "in vitro" sobre la secreción de la Hormona de Crecimiento

El trabajo realizado por el Licenciado Dn. Luis Benítez de Castro ha permitido esclarecer el papel que estos péptidos desempeñan en la neuroregulación de la Hormona de Crecimiento demostrando la existencia de importantes efectos moduladores de señales periféricas sobre el efecto de la bombesina sobre la secreción de la Hormona de Crecimiento

Dado el interés de los datos experimentales obtenidos por el Licenciado Dn. Luis Benítez de Castro, así como su entusiasmo y dedicación a la labor experimental, considero que pueden ser utilizados para optar al Grado de Doctor

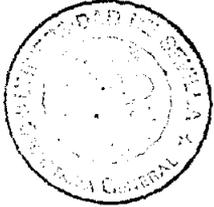
Fdo. Prof.Dr. Fernando Domínguez Puente  
Santiago, Junio de 1988

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 17 número 9 del libro  
correspondiente a  
Sevilla, 20 OCT. 1988

El Jefe del Registro de Tesis,

*Stina Saffelle*



A Mariló, a Macarena y  
a ¿? que viene de camino.

## AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas con las que uno trata durante el tiempo que dura un trabajo, que al menos en mi caso, se ha vivido intensamente. Necesitas ayuda profesional en parcelas que no conoces en absoluto, o simplemente necesitas que alguien escuche tu historia el día que nada te ha salido bien. A sabiendas de que puedo olvidar algunas, hay una serie de personas sin las cuales ésta tesis no sería como es, o simplemente no sería, con las que considero un deber, expresar aquí mi gratitud.

A los Drs. Alipio Mangas y Eduardo Zamora, que me brindaron la oportunidad de hacer esta tesis.

A la Dra. Carmen Barros que me inició en el manejo de los animales de laboratorio.

Al Dr. Fernando Dominguez, que solo me ha dado facilidades en su dirección experimental.

Al Dr. Juan Ramón Lacalle Remigio, que me prestó una ayuda inestimable en el tratamiento estadístico de los resultados.

A Antonio Laguillo, Kiko Bonilla y Manolo Ibañez, que han derrochado paciencia y comprensión para enseñarme a "navegar", en el para mí difícil mundo de la informática.

A José Antonio García-Ceballos y Jesus Freyre, que pienso han realizado un espléndido trabajo con las gráficas.

A todo el Departamento de Fisiología de Santiago, desde el primer profesor, a la señora de la limpieza, que siempre me trataron como un compañero más, y con los que he tenido un trato que nunca olvidaré. Os deseo lo mejor a todos.

Hay cinco personas especialmente, que han tratado esta tesis como algo suyo, que han robado tiempo de su tiempo para dedicarme a mí, y que me han tenido que aguantar, pienso que más que nadie. Cualquier referencia que yo pueda hacer aquí de ellos es insuficiente para lo que ha sido su ayuda, y lo que espero es poderles devolver alguna vez lo que han echo por mí. Para Carlos Dieguez, Federico Mayo, Angela Peñalva, Loli Viñas y Mary Lage, toda mi gratitud. Este trabajo es tan vuestro como mío.

A Mariló, que ha sido de todo, mi mujer, mi secretaria, mi compañera en los momentos buenos y en los malos, y desde luego la persona que más ha tenido que escuchar mis historias de "roedores".

A Maribel Botello y a mi "patrón" Alfredo Gómez, a los que debo que esta tesis se haya presentado cuando yo he querido, entre otras muchas cosas.

A mi familia, a mis amigos y a todos los que durante este tiempo me han animado, y muchas más veces probablemente, soportado.

## INDICE

OBJETIVOS DE NUESTRO TRABAJO.....	6
INTRODUCCION.....	9
1. Neuroendocrinología, funciones tegradas del Sistema Nervioso Central.....	9
2. Morfología del Sistema Neuroendocrino: Hipotálamo.....	10
3. Receptores Hipofisarios.....	21
4. Secreción Hipofisaria: GH.....	30
5. Secreción Fisiológica de GH.....	32
6. Regulación de la secreción de GH.....	37
7. Señales periféricas de feed-back.....	39
8. Señales Metabólicas.....	45
9. Control Neuroendocrino de la secreción de GH.....	49
10. GHRH: Growth Hormone Releasing Hormone.....	54
11. Autorregulación de la GH. Efecto de la administración continuada de GHRH.....	61
12. Somatostatina.....	65
13. Otros RIF'S.....	70
14. Otros Neuropéptidos.....	71
MATERIAL Y METODOS.....	79
I. Experimentos "in vivo".....	79
II. Experimentos "in vitro".....	83
III. Radioinmunoanálisis (RIA).....	85

IV. Péptidos.....	87
V. Descripción de los Experimentos.....	88
VI. Estadística.....	94
RESULTADOS.....	96
DISCUSION.....	157
A.Datos de la Gastrina.....	157
B.Datos de la Bombesina.....	166
CONCLUSIONES.....	189
BIBLIOGRAFIA.....	193

OBJETIVOS DE NUESTRO TRABAJO

## OBJETIVOS DE NUESTRO TRABAJO

Recientemente un buen número de péptidos, muchos de los cuales habían sido identificados originalmente fuera del tejido nervioso, están siendo caracterizados en el sistema nervioso central.

Muchos de estos péptidos pueden tener un papel como neurotransmisores o neuromoduladores en varios mecanismos homeostáticos y endocrinos.

Aunque mucho se ha avanzado en el conocimiento de su localización, síntesis (en los casos en los que se produce), delimitación de las vías en las que existen etc., sabemos muy poco acerca de cual pueda ser su papel sobre la regulación de la secreción anterohipofisaria (pese a que muchos de ellos están bien caracterizados en hipófisis e hipotálamo), y sobre los mecanismos por los que esta pueda producirse, en definitiva en sus funciones fisiológicas.

Dos de estos péptidos la gastrina y la bombesina, la primera bien conocida como hormona del tracto gastrointestinal, y la segunda aislada en principio en la piel de una rana y luego encontrada en el sistema nervioso central y tracto intestinal, han sido el objeto de nuestro estudio.

Acerca de la gastrina, que como hormona intestinal es de sobra estudiada, hemos de decir que posiblemente sea el péptido cuyas funciones sean menos conocidas en el sistema nervioso. La bombesina en cambio es más conocida en sus funciones homeostáticas, pero los datos sobre su papel regulador de la secreción hipofisaria son controvertidos.

El ánimo de nuestro trabajo ha sido intentar profundizar en el papel que estos dos péptidos - gastrina y bombesina-, juegan en el control neuroendocrino de la secreción de la hormona de crecimiento, y los mecanismos por los que éste se produce.

También hemos investigado sobre cual es la modificación que sobre la secreción de hormona de crecimiento y sobre el propio efecto de estos péptidos ejercen una serie de señales periféricas hormonales: los glucocorticoides, los estrógenos y las hormonas tiroideas.

Para ello hemos comparado los efectos de estos péptidos, con dos péptidos liberadores de GH. Uno, el hace poco descubierto factor liberador de la hormona, GHRH (growth hormone releasing hormone), y otro el GHRP (growth hormone releasing péptide), péptido sintético desarrollado por computador, de sólo 6 aminoácidos, sintetizado en su conformación actual, hace sólo 4 años, y del que creemos ser los primeros en hacer un estudio en este sentido.

Pensamos que nuestro trabajo puede aportar algo de comprensión a los complejos mecanismos de la neuroregulación de la hormona de crecimiento.

## INTRODUCCION

## INTRODUCCION

### 1. NEUROENDOCRINOLOGIA: FUNCIONES INTEGRADAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Los organismos superiores, mamíferos y otros vertebrados poseen dos sistemas de comunicación. El sistema nervioso y el sistema endocrino, que tradicionalmente se han considerado como entidades separadas anatómicamente y funcionalmente. Según el concepto clásico, el sistema endocrino produciría en una determinada región una molécula mensajero, la hormona, que sería liberada a la circulación general para actuar a distancia en una célula diana. En el sistema nervioso, la célula secretora sería la neurona, y la molécula mensajero un neurotransmisor.

Las diferencias entre ambos sistemas son obvias, pero también podemos encontrar muchas similitudes entre ellos. De hecho en las últimas décadas, las fronteras de estos sistemas se han ido erosionando progresivamente. Ha quedado demostrado, por ejemplo, que los dos pueden usar el mismo tipo de molécula mensajero. Se han encontrado hormonas fuera del tejido endocrino, entre otras localizaciones en el tejido nervioso y más aún, en una misma neurona pueden darse a la vez un neurotransmisor y una hormona, contenidos en sus vesículas sinápticas.

En definitiva, los sistemas endocrino y nervioso están profundamente interconectados y hoy en día resulta difícil aproximarse a los problemas neurológicos o endocrinos sin tener en cuenta ambos sistemas.

El Sistema Neuroendocrino se desarrolla como una respuesta a la complejidad creciente de los organismos multicelulares. Un organismo unicelular puede responder directamente a su medio exterior, pero no está capacitado para alterar su medio interno de forma marcada.

El desarrollo de un sistema nervioso aferente primitivo, que pueda recoger cambios en el medio, marcha paralelo con el desarrollo de un sistema nervioso eferente y un aparato neurosecretorio simplificado. A medida que los órganos interiores se van haciendo más especializados, los sistemas de control de los mecanismos internos, se hacen más complejos, para asegurar el mantenimiento de unas condiciones internas relativamente constantes.

Los mamíferos y en particular, el hombre, tienen una enorme variedad y riqueza de receptores sensoriales, para responder a cambios tanto en el medio externo como interno. La activación de estos receptores transferiría esta información a unas áreas de integración centrales, resultando unas respuestas endocrinas, autonómicas y de comportamientos coordinadas, organizadas para reestablecer el equilibrio homeostático. Esta integración de la información intero y exteroceptiva y los subsiguientes cambios en la actividad endocrina, autonómica y comportamental, forman las bases de la neuroendocrinología.

## 2. MORFOLOGIA DEL SISTEMA NEUROENDOCRINO: HIPOTALAMO.

En razón de lo antes expuesto, habrá que considerar a la totalidad del organismo como sistema Neuroendocrino (SNE), al menos, todo el sistema nervioso central (SNC).

La interacción, sistema nervioso-sistema endocrino, se realiza fundamentalmente en regiones específicas, pero estas no serán nunca las únicas que influirán en un comportamiento endocrino, ni donde una determinada hormona pueda influir sobre el SNC.

Dicho esto nos centraremos en el estudio del hipotálamo, por ser el lugar donde se efectúan el mayor número de interacciones relacionadas con el sistema endocrino, y la región del SNC más estrechamente relacionada con dicho sistema.

El hipotálamo es una región filogenéticamente antigua, situada en la base del diencéfalo, y que pese a tener una masa en el hombre de sólo 4 gr. (1) cumple numerosas funciones.

Podemos considerar el hipotálamo como el centro regulador neuroendocrino, autonómico y de la homeostasia. Controla la secreción hormonal de la hipófisis anterior y posterior, actúa como modulador de los patrones autonómicos, íntimamente coordinados con los cambios endocrinos, a través de su acción en los sistemas simpático y parasimpático y de su control sobre centros autonómicos del tronco del encéfalo. También interviene controlando o modificando procesos homeostáticos tan dispares como la respiración, la temperatura corporal y la ingesta de sólidos y líquidos.

La integración de respuestas autónomas, endocrinas y motoras que caracteriza al comportamiento emocional generalmente asignada al sistema límbico, es también atribuible en gran parte al hipotálamo. Este es capaz de ejercer su control sobre estas funciones merced a la riqueza de sus conexiones con otras regiones del SNC. Particularmente notables son sus relaciones con la sustancia reticular, el sistema

límbico -sobre todo la amígdala-, y la corteza cerebral.

La mayoría de estas relaciones se conocían de antaño, pero recientes avances en las técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas han revelado detalles que nos han permitido conocer más profundamente la anatomía del hipotálamo y como están organizadas las vías por las cuales los mecanismos neurohormonales gobiernan la secreción pituitaria (2).

### 2.1. Desarrollo.

El hipotálamo deriva del diencéfalo embrionario, el cual es a su vez una división de la más anterior de las tres vesículas cerebrales primitivas, el prosencéfalo (la otra división será el telencéfalo, del cual se formarán los hemisferios cerebrales), (3).

Estudiando el desarrollo del diencéfalo, His propuso el término que quedó definitivamente asignado en la nómina anatómica de Basilea en 1.895 (4).

El hipotálamo se desarrolla como la más baja de las tres protuberancias que crecen en las paredes del diencéfalo, separada de las otras dos, epitalamo y tálamo, por una escotadura longitudinal: el surco hipotalámico. Al ir creciendo en las paredes del diencéfalo estas tres vesículas, la cavidad central entre ellas, se transforma en el tercer ventrículo.

La hipófisis se desarrolla en íntima asociación con el hipotálamo, de hecho la neurohipófisis deriva de una evaginación descendente del diencéfalo, el infundíbulo. La adenohipofisis tiene un origen diferente, ya que deriva de un divertículo epidérmico de la primitiva cavidad oral, la bolsa de Rathke. Este divertículo se va elongando dorsalmente hasta

contactar con el infundíbulo que viene creciendo hacia abajo, con el que acaba fundiéndose de forma que las células de la adenohipófisis rodean y se extienden a lo largo del tallo pituitario, para formar la "pars tuberalis". La hipófisis posterior está en comunicación neural directa con el hipotálamo mientras que la adenohipófisis no. Sin embargo se desarrolla entre hipotálamo e hipófisis una rica red vascular -el sistema porta- que hace que estén en contacto, por medio de la cual el hipotálamo controla la hipófisis anterior.

Un hecho digno de resaltar en el desarrollo del hipotálamo, es la cada vez mayor complejidad de su arquitectura interna a lo largo de la evolución filogenética de los vertebrados, hasta llegar a los núcleos bien diferenciados de los mamíferos (5).

Por otra parte mientras el desarrollo de la eminencia media, la aparición de un sistema porta hipofisario más o menos complejo y los tanicitos (células endimarias modificadas capaces de transportar sustancias hormonales), es muy precoz en los vertebrados, sólo en los mamíferos superiores se encuentran conexiones directas del hipotálamo y la corteza cerebral.

## 2.2. Conexiones hipotalámicas.

El hipotálamo está situado en la base del diencefalo, quedando separado del tálamo por el surco hipotalámico (que delimita la extensión dorsal del hipotálamo), y formando las paredes del tercer ventrículo (3V), a cada lado de la línea media. Su límite rostral se toma convencionalmente como la lámina terminalis, mientras que caudalmente se toma una línea imaginaria que uniría los cuerpos mamilares por debajo y la comisura posterior por arriba (2).

Sin embargo resulta problemático establecer dichos límites (6), los cuales no están bien circunscritos, ya que la observación microscópica del hipotálamo da la impresión de estar en continuidad con las regiones vecinas del SNC.

La superficie basal del hipotálamo queda delimitada entre el quiasma óptico por delante y los cuerpos mamilares por detrás. Entre ambos se encuentra el tuber cinereum, una protuberancia de sustancia gris que se introduce ventralmente en el infundibulum, y que junto con la porción infundibular de la adenohipófisis, forma el tallo pituitario. Esta región infundibular en la base del hipotálamo es la eminencia media, zona crítica para la comunicación vascular entre hipotálamo e hipófisis (2).

Si estudiamos la arquitectura citológica del hipotálamo nos encontramos con la descripción neuroanatómica clásica de centros o núcleos nerviosos y vías de conexión. Podemos individualizar una porción medial de celularidad densa, separada de una lateral por fibras de paso entre mesencéfalo y telencéfalo (7). Los núcleos mejor definidos se encuentran en la región medial circundados de celularidad más difusa.

Desde Golgi se sabía que la relación entre los diversos núcleos hipotalámicos era muy estrecha y hoy en día no puede considerarse independiente ningún núcleo hipotalámico, aunque se puedan distinguir desde un punto de vista funcional, dos reagrupaciones: el hipotalámo medial, dentro del cual los núcleos están en contacto recíproco, y la representada por las conexiones entre el hipotalámo medial y lateral. Este último, que engloba el fascículo telencefálico ascendente, funciona como conector entre el hipotalámo medial y otras regiones del SNC, en particular el sistema límbico, del tal forma que la información nerviosa que entra o sale del hipotalámo me-

dial pasa antes o después por las células laterales (8).

Tantas y tan estrechas conexiones nerviosas se valen de una estructura anatómica definida, el circuito local, donde una interneurona sería el pivote de este circuito nervioso de proyecciones laterales, en cuyo interior operarían sinapsis "no convencionales" dendro-dendríticas, dendro-somáticas, axodendríticas, axo-axónicas, recíprocas y las electrónicas. Las influencias recíprocas de todas las neuronas participantes elaboran una información, de la que depende que se genere o no el potencial axónico (9).

Hacer aquí una relación detallada de las relaciones de cada núcleo con los demás, y describir minuciosamente las conexiones del hipotálamo con el resto de estructuras del SNC se sale por complejo de la finalidad de este trabajo; para aquel que quisiera una visión más profunda, hay algunos magníficos trabajos sobre el tema que han sido consultados por el doctorando (2,3,6).

No hay ninguna forma simple ni totalmente aceptable de describir las conexiones hipotalámicas. Sin embargo si que habrá que hacer alguna puntualización general. Así, mientras algunas están anatómicamente bien definidas, justificando su terminología de vía, fascículo, etc. otras serían "conexiones neuronales", bien descritas histológicamente, pero no organizadas en fascículos.

Por otra parte la terminología empleada suele ser imprecisa. La mayoría de las llamadas vías aferentes llevan también fibras hipotalámicas eferentes, y por otra parte, acepciones como "extrínsecas" o "intrínsecas", "ascendente" o "descendente", solo introducen ambigüedad.

Por último dos consideraciones. La primera ya enunciada, es que algunas conexiones entran directamente al hipotálamo medial, por ejemplo las neuronas monoaminérgicas, mientras que otras muchas lo hacen indirectamente a través del fascículo telencefálico, tras hacer un "relay" en el área hipotalámica lateral (8). La segunda es que otra conexión más del hipotálamo, de enorme importancia en endocrinología, es la vascular, que también funciona en ambos sentidos, eferente -por ejemplo las hormonas hipotalámicas secretadas en el plexo portal, -y aferentes- como por ejemplo los circuitos de feed-back de las hormonas esteroideas-.

### 2.3. Vascularización del eje hipotálamo-hipófisis.

La irrigación del hipotálamo basal, infundíbulo, tallo hipofisario y pituitaria se lleva a cabo por las arterias hipofisarias superiores e inferiores, ramas de las carótidas.

La zona anterior de la eminencia media y la mayor parte del tallo hipofisario, están irrigados por las arterias hipofisarias superiores, la porción posterior de la eminencia media se nutre de vasos independientes que tienen su origen en el polígono de Willis y la zona más ventral del tallo pituitario recibe la sangre de las arterias trabeculares ramas de la hipofisaria superior.

La neurohipófisis, por otro lado está nutrida por las arterias hipofisarias inferiores, que se anastomosan con las superiores a través de las arterias trabeculares (2), sin embargo estas arterias hipofisarias no irrigarían a la hipófisis directamente, sino que lo harían de forma indirecta, a través del plexo capilar portal conocido desde 1.930 en que fué descrito por Popa y Fielding (10).

De esta forma, las arterias que vascularizan la eminencia media, desembocaran en una rica red vascular, el plexo primario, en el que habría una porción externa que estaría en íntimo contacto con el hipotálamo, existiendo conexiones con los núcleos vecinos (11). Otra porción más interna de este plexo, formaría asas capilares más largas que se proyectarían hasta el suelo del tercer ventrículo, entremezclándose con los tanicitos de la zona, lo que podría explicar la presencia de hormonas hipofisarias en el líquido cefalorraquídeo (12).

Desde el plexo primario se dirigen hacia abajo rodeando el tallo hipofisario los vasos portales largos, para alcanzar la adenohipófisis, donde se reúnen con los vasos portales cortos, que surgen de la porción mas ventral del tallo pituitario derivados de las arterias hipofisarias inferiores, y dan lugar al plexo secundario. Aproximadamente el 90% del riego de los sinusoides de la adenohipófisis, dependerá de los vasos portales largos.

El retorno venoso de la sangre pituitaria, se produce a través de las venas yugulares. Ultimamente se ha demostrado la escasez de vasos venosos entre la adenohipófisis y los senos cavernosos, mientras existen numerosos canales venosos entre el seno cavernoso y la neurohipófisis. En base a estas observaciones se ha sugerido que la mayor parte del drenaje venoso de la adenohipófisis se produce por el plexo capilar de la neurohipófisis a través de los vasos porta cortos, de forma que los factores que normalmente regulan este plexo, podrían regular al menos en parte el flujo de sangre que transporta hormonas adenohipofisarias (13).

La conclusión más interesante de todo esto es que la adenohipófisis y la neurohipófisis están íntimamente relacionadas por un lecho capilar común que

posibilita un flujo retrógrado hacia hipotálamo, y un grado de flujo "circular" dentro de la glándula, lo que daría lugar a la recirculación de determinadas hormonas dentro de ella, demostrando la unidad vascular de todo este conjunto glandular.

Un importante detalle de estos capilares portales, es que tienen la estructura de los capilares periféricos, su endotelio es fenestrado, careciendo de los complejos junturales impermeables que caracterizan los capilares cerebrales. La eminencia media por tanto, puede considerarse fuera de la barrera hematoencefálica

Queda por último hacer una consideración sobre la abundante neuroglia hipotalámica -hay mayor número de células gliales que de neuronas-, que se encuentra en íntima relación con los procesos vasculares. Destacan entre ella los tanicitos, células endimarias cuyo polo apical se encuentra en la base del tercer ventrículo en contacto con el LCR, y que se extienden a través de la eminencia media hasta alcanzar los vasos portales, donde terminan con múltiples dilataciones (14). Esta particular estructura es la que ha hecho que se le atribuyan funciones de transporte que ya han sido mencionadas. Sin embargo, recientemente Ouimet y su grupo (15) han demostrado que los tanicitos contienen la fosfoproteína reguladora de la dopamina y adenosina (DARP-32), un marcador específico para células que poseen receptores  $D_1$  de dopamina, lo que sugiere que pueden mediar alguno de los efectos dopaminérgicos en la secreción de hormonas hipotalámicas.

#### 2.4. Control hipotalámico de la secreción hipofisaria.

Que la hipófisis es la glándula que mejor puede expresar la relación recíproca entre sistema

nervioso y sistema endocrino, y que la fisiología de la hipófisis, en definitiva, está controlada por el hipotálamo, es algo que parece claro a la vista de lo anteriormente expuesto.

Sin embargo esto no ha sido siempre entendido así, ya que los estudios funcionales del hipotálamo y su relación con la hipófisis se han producido en los últimos 40 ó 50 años. Cajal por ejemplo (16), describió las neuronas del núcleo ventromedial y supraóptico con sus proyecciones, de forma que sigue siendo válida hoy, pero consideraba la neurohipófisis como un órgano sensorial.

Durante las primeras décadas de este siglo hay una serie de hallazgos y datos clínicos, entre los que hay que destacar los de Cushing, que hacen pensar que hipotálamo e hipófisis están en relación funcional. Resultan fundamentales los trabajos de Harris, que en 1.937 demostró que la estimulación eléctrica del hipotálamo en el conejo daba lugar a ovulación, lo que le llevó posteriormente a concluir que en el hipotálamo hay grupos de neuronas que son capaces de sintetizar sustancias (hipotéticas entonces), que pasarían a la sangre de los vasos portales y de ahí a la adenohipófisis, donde ejercerían su control.

Estas ideas culminan en la formulación del principio de regulación neuro-endocrino (17), el cual ha servido de base a gran cantidad de investigadores posteriormente. Con ello, Harris daba la razón a investigadores anteriores como Brooks (18), el cual estudiando la disposición de los plexos portales, ya había postulado que la hipófisis debía estar controlada por el hipotálamo.

La relación de la neurohipófisis con el hipotálamo es diferente. En realidad, el lóbulo posterior sólo es un reservorio hormonal, ya que las hormonas

posthipofisarias, Oxitocina y Vasopresina, son sintetizadas en el propio hipotálamo por los núcleos paraventricular y supraóptico respectivamente, y vertidas directamente a los capilares de la neurohipófisis, donde se almacenarían gracias a un flujo axonal descrito por Weiss (19), y de donde serían secretadas a la circulación general por impulsos nerviosos hipotalámicos.

La población neuronal de estos dos núcleos hipotalámicos es la clásicamente definida como magnocelular o secretoria, mientras que la población parvocelular del resto de los núcleos, enviaría sus axones a la eminencia media (19) desde donde controlarían la función hipofisaria.

Tendríamos ya por tanto descritas las bases del control hipotalámico de la pituitaria. Por otra parte, la gran afinidad en el desarrollo embriológico, y la íntima relación anatómica y estructural que se manifiesta con un riego sanguíneo común en gran parte, y con estructuras hipotalámicas directamente conectadas a la hipófisis o al tallo hipofisario.

En contra de lo que pudiera pensarse, las influencias del sistema nervioso autónomo, tan relacionado con el hipotálamo, no son decisivas, ya que la adenohipófisis sigue funcionando normalmente tras la sección de la cadena simpática cervical o el ganglio geniculado (1).

Con todo, no nos es posible comprender de una forma clara el control del funcionamiento hipofisario, sin tener en cuenta el complejísimo problema de los RIF'S (releasing and inhibiting factors) hipotalámicos, neurohormonas que estimulan o frenan la liberación de cada hormona anterohipofisaria específica (20), y de los neurotransmisores (21), liberados localmente en la eminencia media, la región del sis-

tema nervioso con mayor concentración de moléculas biológicamente activas (1).

En cualquier caso, una vez que todos estos productos hipotalámicos alcanzan la hipófisis, su acción se lleva a cabo de forma directa sobre la célula hipofisaria, capaz de reconocer estas señales específicas, lo que condiciona la presencia en ellas de receptores.

El estudio de estos temas, campo de batalla de la Neuroendocrinología moderna será expuesto con detalle en los siguientes capítulos.

### 3. RECEPTORES HIPOFISARIOS.

El que una célula secretora hipofisaria libere una hormona es el final de una secuencia, iniciada previamente con una determinada señal expresada por moléculas biológicamente activas, que contacta con dicha célula y es específicamente reconocida. Esta cualidad de reconocer específicamente una señal, le es dada a la célula por la presencia de receptores.

Una vez que el receptor se ha unido a la hormona, la célula elabora en su interior una señal y se produce el efecto biológico: la liberación de una hormona específica. Ahora bien, esta unión hormona-receptor no es necesario que acabe en un proceso de secreción, sino que también la inhibición de la liberación es un proceso activo que se regula de manera específica.

Podríamos pues definir al receptor como un componente celular que realiza dos funciones: reconoce y une selectivamente una determinada molécula y convierte esta unión en señal que es elaborada por la célula, o sea "activar la célula". Funcionalmente

esta definición no basta, ya que la actividad biológica de los receptores, no queda demostrada por la existencia de puntos específicos de unión de una determinada hormona en una célula. Esto es, debe verificarse que se produce una respuesta biológica definida cuando la hormona se une a los lugares específicos (22).

Estas dos funciones del receptor se efectúan por subunidades diferentes del mismo: subunidad de reconocimiento y subunidad efectora, ambas unidas por otra diferente, el "transductor", que hace de puente entre las dos regulando el grado de acoplamiento, esto es, la eficacia con que la unión de una señal a su lugar de acoplamiento es traducido por la subunidad efectora en señal intracelular.

### 3.1. Composición de Los receptores. Localización en la célula.

La estructura de los receptores y la organización de sus componentes no está del todo aclarada por la gran dificultad que supone su aislamiento y purificación.

Ya que todos los receptores pueden degradarse por la acción de enzimas proteolíticas, deben de tener una porción proteínica importante. Los fosfolípidos, el componente lipídico más importante de la membrana celular desempeña un papel fundamental ya que los receptores sufren variaciones considerables en sus propiedades cuando los fosfolípidos se alteran, por ejemplo, la actividad de los receptores hipofisarios para la TRH, depende de los fosfolípidos de la membrana (23).

La membrana plasmática es una estructura clave en la regulación de las relaciones hormona - recep-

tor. Esta membrana, según Singer y Nicolson (24) sería una estructura ordenada, pero no estática, en la cual los dos componentes lipídicos más importantes, fosfolípidos y colesterol formarían un estrato doble, con las extremidades hidrofílicas dirigidas hacia la superficie externa e interna de la célula y las cadenas hidrofóbicas orientadas al interior del mismo. Ahora bien, estos componentes pueden moverse transversalmente sobre la membrana, e incluso, de forma esporádica los lípidos de la capa interna pueden pasar a la externa y viceversa (22).

Si tenemos en cuenta, que la interacción entre las diversas partes del receptor es necesaria para que se produzca actividad fisiológicamente significativa, y que estas subunidades del receptor son proteínas que se encuentran "flotando" entre los lípidos de la membrana, es evidente que las variaciones en su composición química, o en su estado físico, condicionan decisivamente las propiedades biológicas de los receptores.

La composición química de las hormonas es la que condiciona la localización de los receptores en una célula, de hecho las hormonas pueden clasificarse por este concepto.

Las hormonas protéicas, hidrosolubles, no pueden atravesar la barrera de lípidos que supone la membrana celular, por lo que lógicamente, sus receptores se encuentran en la superficie de la célula.

Las hormonas liposolubles, como la tirosina y las esteroideas, atraviesan la membrana celular y se unen directamente a estructuras intracelulares. En el caso de las últimas, los complejos hormona-receptor, se formarían en el citoplasma y de allí se desplazarían al núcleo, mientras los receptores de las hormo-

nas tiroideas se encuentran en el propio núcleo celular.

### Activación celular: formas de acoplamiento a los receptores.

Como ya hemos expresado, es necesario que la célula pueda identificar y "traducir" las señales externas que le llegan, para que esta información se convierta en actividad biológica.

Los receptores de superficie "traducen" la señal en la membrana celular, donde con el concurso de otras proteínas presentes en la misma, la unión hormona-receptor se convierte en señal química en forma de "segundo mensajero", pudiéndose dividir estos receptores en dos clases según el tipo de segundo mensajero que sean.

Un primer grupo de receptores, utilizan el c-AMP y poseen un mecanismo de traducción común (25), donde el c-GTP estaría unido de forma específica a una proteína -la proteína G-, que funcionaría como sistema de acoplamiento para traducir la información de la porción externa del receptor a la adenilciclase, enzima localizada en la porción interna de la membrana y responsable de la síntesis de c-AMP.

Un segundo grupo de receptores, utilizan como segundo mensajero, fundamentalmente al calcio (26), aunque son capaces también de utilizar otros mensajeros (22), por ejemplo, la activación de estos receptores aumentaría los niveles de c-GMP y la síntesis de prostaglandinas, mientras que por otro lado puede llevarse a cabo la hidrólisis del fosfatidilinositol (PI), componente lipídico de las membranas con producción de diglicérido y de inositol 1,2 fosfato cíclico, ambos propuestos como segundos mensajeros (27).

En cualquier caso resulta excesivamente simplista clasificar los receptores de membrana en torno al segundo mensajero, ya que hay ejemplos de receptores que utilizan los dos (22).

Los receptores citoplasmáticos y nucleares, no necesitan de segundo mensajero, ya que al ocurrir la unión hormona-receptor en el interior de la célula, este mismo complejo desarrolla la función de mensajero intracelular (28).

### **3.2.1. Receptores asociados a c-AMP.**

Casi todas las neurohormonas hipotalámicas que regulan la hipófisis anterior actúan activando el c-AMP.

Una actividad de este tipo se ha demostrado para los receptores de TRH, LHRH, CRF y VIP, (22), existiendo de hecho una estrecha relación entre la secreción hormonal hipofisaria y las variaciones de c-AMP: Se puede inducir la secreción "in vitro" de todas las hormonas hipofisarias con el dibutiril c-AMP, un análogo de c-AMP, y potenciar este efecto añadiendo al cultivo un inhibidor de la fosfodiesterasa, enzima que degrada el c-AMP, como la teofilina o la aminofilina (29).

A la inversa factores que inhiben la secreción hipofisaria, como por ejemplo la dopamina, inhibidor endógeno de la liberación de prolactina, disminuye la actividad de la adenilciclase en las células lactotropas (30), y antagoniza la secreción de prolactina inducida por el dibutiril c-AMP (31).

### **3.2.2. Receptores asociados al calcio.**

El calcio ( $Ca^{++}$ ), es un ión que se encuentra en forma libre en el líquido extracelular, y en forma

ligada dentro de las células, el cual resulta fundamental en múltiples procesos celulares. Se piensa que es necesario un aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, para que un estímulo se traduzca en liberación en la gran mayoría de las células con función secretora (endocrinas, nerviosas, exocrinas) (22).

La TRH que estimula la liberación de prolactina y TSH por la adenohipófisis, genera potenciales de acción calcio dependientes (32), requiriéndose la presencia del ión, para que se produzca su liberación, en cultivos de células AP (33).

### 3.2.3. Receptores solubles.

Las hormonas tiroideas se relacionan con sus receptores en el núcleo celular, donde se unirían a la cromatina produciendo m-RNA, que a su vez activa y pone en marcha la síntesis protéica. Aparte de estos bien conocidos receptores nucleares, existen otros, en la mitocondrias, y en la membrana celular, cuya función es por ahora desconocida (22).

Los receptores para hormonas esteroideas, tienen importancia fundamentalmente como intermediarios en los mecanismos de feed-back para el control de la secreción anterohipofisaria.

Determinados comportamientos (maternal, agresividad, y sobre todo el sexual), estarían mediados por la acción de los esteroides adrenales y gonadales en determinadas áreas del SNC (33).

Actualmente existen dos teorías sobre el funcionamiento de los receptores esteroideos. Ambos acaban en el modelo común de ajuste en el genoma del complejo hormona-receptor, con aumento de la producción de m-RNA, que produce a su vez una activación

de la síntesis protéica en los ribosomas. La primera de ellas (34) considera que la unión con el receptor se produce en el citoplasma desde donde el complejo se transporta al núcleo, por mecanismos desconocidos, para seguir la vía común. La segunda, indica que la unión se produce directamente en el núcleo, hasta donde el esteroide difunde antes de ligarse a su receptor (35). Recientemente también se han descubierto receptores esteroides en la membrana plasmática (28).

### 3.3. Regulación de los receptores.

Las células hipofisarias y sus receptores, están sometidas a la interacción continuada de señales químicas que estimulan o inhiben la secreción de sus hormonas. Por otra parte, estas sustancias endógenas estimuladoras o inhibidoras no tienen niveles constantes, sino que fluctúan en respuesta a diversos estímulos fisiológicos, es por ello que el número de receptores hipofisarios, la afinidad de las uniones y las mismas propiedades intrínsecas del receptor, no han de ser constantes, sino que han de adaptarse a las variaciones de su medio.

Revisaremos a continuación tres tipos de regulación: la homóloga o autóloga, en la que la hormona regula su propio receptor, la heteróloga, en la que una segunda hormona regula la unión de otra con su propio receptor, y la inespecífica, debido a modificaciones del lugar de unión motivadas por cambios en el microambiente.

#### 3.3.1. **Regulación homóloga.**

Sabemos que la sensibilidad de una célula a la estimulación por una hormona, suele ser inversamente proporcional a los niveles de dicha hormona a que la

célula ha sido expuesta. Esta adaptación se produce con rapidez, y el receptor es uno de los lugares donde normalmente se lleva a cabo tal regulación. La disminución del número de receptores en respuesta a los cambios en las concentraciones de hormona se conoce como "down regulation", y el aumento como "up regulation".

En general un aumento crónico en los niveles de una hormona, produce una disminución en el número de receptores.

Las células tumorales GH 3, donde el TRH produce secreción de GH y PRL, pierden hasta el 75% de sus receptores para TRH al ser expuestas crónicamente a este péptido "in vitro". Los receptores que se mantienen conservan intacta su afinidad, y la concentración se vuelve normal en unos días tras sustraer la hormona del medio de cultivo. Por otra parte esta regulación del número de receptores es impedida por un antagonista específico de la hormona, lo que demuestra que para que se produzca el fenómeno es imprescindible la unión del TRH con su receptor (36), constituyendo un ejemplo de "down regulation".

La hormona puede también modificar la sensibilidad de su célula diana cambiando la afinidad de sus receptores, sin tener que variar el número. La saturación progresiva de los receptores de insulina reduce la afinidad de estos por la hormona (37), al contrario, la unión de una molécula de O<sub>2</sub> a la hemoglobina, aumenta su afinidad por el oxígeno. Estos fenómenos que implican la cooperación entre las diferentes partes del receptor, se denominan cooperatividad negativa en el primer caso, y positiva en el segundo.

### 3.3.2. Regulación heteróloga.

Una determinada hormona puede alterar la acción de otra modificando los niveles plasmáticos de la misma o la capacidad de respuesta de sus células diana, siendo los receptores los lugares preferentes donde esta regulación se lleva a cabo, modulando tanto su concentración como su afinidad.

La regulación heteróloga suele asociarse a mecanismos de feedback. Por ejemplo, la secreción de tiroxina por el tiroides está regulada por la tirotrópina que a su vez es controlada por la TRH. Las hormonas tiroideas ejercen un efecto de feedback sobre la secreción adenohipofisaria, inhibiendo tanto la secreción normal de TSH, como la estimulada por la TRH. Así, mientras los sujetos normales, responden al TRH con elevación de la TSH, en los hipertiroideos casi no se obtiene respuesta. Este modelo puede reproducirse en cultivos de células hipofisarias normales.

El sistema de actuación, está mediado a nivel de receptores. En presencia de T3 y T4, los receptores al TRH en cultivos de células GH3 se reducen de forma ostensible (38). No es posible una interacción directa entre los receptores, ya que como hemos enunciado los receptores de las hormonas tiroideas se encuentran en el núcleo, y los de TRH en la membrana. Lo que ocurre es que el efecto de la saturación de receptores de hormonas tiroideas se transmite del núcleo a la membrana, limitando el número de receptores al TRH.

### 3.3.3. Regulación inespecífica.

Los cambios en el microambiente físico-químico, en particular pH, temperatura y cambios iónicos, afectan notablemente a los receptores en su es-

estructura y función. Aunque en muchos casos estas alteraciones pueden considerarse inespecífica, no se puede excluir que en algunos casos, los cambios provoquen la propia unión de la hormona con el receptor, que regulando el microambiente, estarían modificando la capacidad funcional del propio receptor.

#### 4. SECRECIÓN HIPOFISARIA: GH.

En el lóbulo anterior hipofisario se distinguen actualmente siete tipos celulares por medio de técnicas de coloración tetracrómica: células tireotropas, foliculotropas, corticotropas, luteotropas, melanotropas, prolactotropas y somatotropas. Cada tipo celular produce de manera específica una hormona hipofisaria, respectivamente: tirotropina (TSH), hormona folículo estimulante (FSH), adrenocorticotropina (ACTH), hormona luteinizante (LH), hormona melanocito estimulante (MSH), Prolactina (PRL), y somatotropina u hormona del crecimiento (GH).

Observando estas células al microscopio electrónico, encontramos que todas tienen una estructura común, con ribosomas desarrollados, donde se lleva a cabo la síntesis del polipéptido o proteína correspondiente, y unos gránulos de almacenamiento, desde donde la hormona correspondiente es secretada a los capilares sanguíneos (1).

La sospecha de algún factor hipofisario relacionado con el crecimiento viene de antiguo. La importancia de la pituitaria en el control del crecimiento quedó firmemente establecida por Evans (39) entre 1.900 y 1.920. Aschner (40) había demostrado ya en 1.912 que la hipofisectomía producía una interrupción del crecimiento. Evans y Lory (41) producían gigantismo en ratas mediante la inyección diaria de homogeneizados hipofisarios, y en 1.930 Smith (42),

demostró que se podía revertir el enanismo que producía en la rata la hipofisectomía, mediante la administración de extractos de hipófisis.

Parecía claro que la hipófisis producía alguna sustancia que inducía al crecimiento, aunque se desconocía si ésta era una hormona específica, o si el crecimiento se debería a la acción asociada de varias hormonas hipofisarias. El problema quedó resuelto cuando Li (43), aislaba en los años 40 un purificado de GH de vaca. Más tarde el mismo autor identificó la secuencia completa de aminoácidos de la hormona (44).

Posteriormente el estudio de la hormona, se realiza con el desarrollo de las técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) (45), que hacen posible medir sus niveles plasmáticos, lo que ha permitido evidenciar, que los estímulos que promueven su liberación están más en relación con el metabolismo energético que con el crecimiento.

Actualmente, la estructura de la GH ha quedado definitivamente establecida, como una proteína de 191 aminoácidos de cadena única, con dos puentes de disulfuro internos entre los aminoácidos 53 y 165, y 182 - 189 ( Cys-SS-Cys), con un peso molecular que según los diversos autores es de 21.000 (46), 21.500 (47), ó 22.000 daltons (48). La secuencia de aminoácidos difiere de un animal a otro, lo que le confiere "especificidad de especie", razón por la cual las somatotropinas de origen animal son ineficaces en el tratamiento clínico de humanos (47).

La GH supone el 4 - 10% del peso seco de la adenohipófisis, sintetizada y secretada como ya hemos expresado por células específicas, las células somatotropas, que se tiñen con colorantes eosinófilos (47) y se encuentran localizadas fundamentalmente en

las porciones laterales de la adenohipófisis (49), representando más del 25% de las células de esta glándula en el humano (50).

La importancia clínica fundamental de la GH, radica en el hecho de que disfunciones en su producción provocan anomalías en el crecimiento.

El efecto fundamental de la GH sobre el tejido óseo se produce a nivel de condrogénesis y calcificación. Cuando se realiza hipofisectomía, cesa la producción de cartilago y las epífisis de los huesos largos se atrofian. La administración de la hormona renueva la formación de cartílagos y ensancha las epífisis (46), efecto que medido en la tibia de la rata es la base analítica para el estudio de la sensibilidad biológica a la GH (test de la tibia).

La hiperproducción de GH en individuos inmaduros, produce gigantismo por excesivo crecimiento de los huesos largos. El mismo problema en el adulto da lugar a la acromegalia, ya que el crecimiento sólo es posible en los lugares en que persiste cartilago. A la inversa, el déficit de GH en el inmaduro, produce enanismo (46,47,49,51).

La secreción de hormona de crecimiento, se encuentra regulada por una muy completa relación de influencias de tipo estimulador o inhibidor. Esta regulación tiene dos componentes fundamentales en las neurohormonas hipotalámicas GHRH (Growth hormone releasing hormone) conocida recientemente y también denominada GRF o GHRF (Growth hormone releasing factor), y la SRIH (somatotroph releasing inhibiting hormone) o somatostatina, aislada e identificada con anterioridad. Otros neuropéptidos, multitud de neurotransmisores y también mensajeros periféricos de tipo metabólico fundamentalmente, regulan asimismo la

secreción de GH, bien actuando directamente en la pituitaria, o modulando la GHRH y somatostatina.

## 5. SECRECION FISIOLOGICA DE GH.

### 5.1. Secreción Basal.

No podemos hablar propiamente de secreción basal de GH, ya que en el hombre, la hormona es secretada de forma episódica y la mayor parte de su liberación ocurre durante el sueño (52,53). Durante el día, sus concentraciones plasmáticas son a menudo indetectables, y los picos secretorios escasos.

Por esta razón, una medida basal disminuida de GH no puede usarse como diagnóstico de sospecha para casos de deficiencia de la misma, y por el contrario, el que un niño de escasa estatura tenga valores detectables de GH no excluye el diagnóstico de enanismo (51). Algunos niños con deficiencias parciales, continúan secretando episódicamente GH, si bien la amplitud y frecuencia de los picos secretorios parece disminuir (54), por esta razón se usan pruebas de estímulo para medir la respuesta de la hormona (51).

La secreción episódica de GH no se relaciona con la actividad física, ni con los niveles de glucosa o insulina en sangre, siendo independiente de las concentraciones de otras hormonas, lo que induce a pensar que se debe a un ritmo intrínseco del SNC, que activaría las neuronas secretoras de GHRH (47).

Los pulsos espontáneos de hormona de crecimiento se observan durante toda la vida, pero son más evidentes durante la adolescencia. En la pubertad aumentan el número, la amplitud de los mismos (55), y los niveles circulantes (48) de la hormona. Sin embargo, otros autores no encuentran diferencias entre

las concentraciones en la pubertad y las del adulto y etapa prepuberal (55), por lo que niegan la participación de la hormona en el estirón puberal.

Niveles muy altos de GH se han descrito en el feto, con valores máximos alrededor de la 24 semana, que se mantienen elevados en los primeros días de vida (47), por contra en el anciano los picos secretorios son escasos (52).

La GH circula en el plasma libremente, su vida media es de 17-45 minutos, y el total secretado durante el día por un adulto normal es de unos 400  $\mu\text{g}$  (47).

En la rata, la secreción de hormona de crecimiento es diferente. También es pulsátil, pero se presenta como ondas secretorias con intervalos de 3-4 horas (47).

Este ritmo de liberación puede suprimirse por múltiples causas. En ratas con hipocalcemia parati-reopriva, la secreción normal es anulada, restableciéndose administrando anticuerpos antisomatostatina, lo que indicaría que sería una actividad aumentada, o un exceso de SRIH, la causa de la falta de pulsatili-dad (56).

La dieta con glutamatomonosódico (MSG), administrada desde el nacimiento también abole los pulsos de GH (57). En este caso lo que se produce es una destrucción de los cuerpos celulares del núcleo arcuato productores de GHRH, y de las fibras GHRH-inmunoreactivas de la eminencia media, o sea una depleción total de GHRH (58).

El dietiltiocarbamato, un inhibidor de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (59) y los inhibidores de la síntesis de norepinefrina, como la  $\alpha$ -metilparatiro-

sina (60) también inhiben la secreción pulsátil, y han sido usados como modelos experimentales para el estudio de la liberación de GH en ratas. Tienen el inconveniente de presentar valores basales casi indetectables, lo que obliga a emplear suero anti-SRIH al usarlos.

La destrucción por cirugía estereotáxica de los núcleos arcuato y ventromedial, también elimina el ritmo normal de secreción de GH (61).

Parece claro que la liberación de GH en la rata depende de un ritmo impuesto por el hipotálamo y directamente relacionado con el GHRH y somatostatina.

Por otra parte, también en la rata, se ha encontrado una mayor respuesta a la GHRH en la pubertad y lo contrario en ratas de mayor edad (62,63,64).

## 5.2. Ritmo Sueño-Vigilia.

Ya hemos indicado que la mayor secreción de GH ocurre durante la noche. Los picos secretorios más significativos, se correlacionan con la aparición del sueño de ondas lentas (SWS) (52,65).

Esta liberación nocturna de GH relacionada con el sueño, se comprueba por los hechos siguientes: Se demora si el sueño se retrasa (66), y desaparece con la privación total del sueño. La abolición selectiva del sueño de ondas lentas, disminuye, pero no hace desaparecer totalmente la secreción (67). La inversión aguda del ritmo sueño-vigilia, modifica paralelamente los picos secretorios, lo que demuestra que es el sueño y no un biorritmo circadiano el regulador de esta secreción nocturna (52). Incluso pueden observarse picos de GH en episodios diurnos de sueño, aunque en este caso los niveles hemáticos de GH son menores. En cualquier caso no todos los episodios de

SWS, se acompañan de picos secretorios. En el anciano, donde las fases de SWS son raras, la secreción de GH en relación con el sueño se observa en menos ocasiones (67), asimismo, tampoco aparecen picos nocturnos en los primeros tres meses de vida (55).

La interacción entre sueño y secreción de GH, no es una relación causa-efecto. Se ha intentado postular un mecanismo serotoninérgico responsable de la liberación de la hormona (66), pero ni el papel de la 5-HT, ni en general el de los neurotransmisores está aclarado (47). Por otra parte dosis altas de glucosa, el incremento de los ácidos grasos libres, ACTH, o la somatostatina (68), parecen inhibir la secreción durante el sueño de la hormona de crecimiento, sin modificar las fases de SWS. Esta secreción nocturna representa en el adulto el 70% de la global en 24 horas (47).

### 5.3. Stress, emociones.

La GH es una hormona sensible a variados estímulos estresantes tanto en el hombre como en el animal de experimentación.

En el humano la respuesta al stress consiste en una elevación de sus niveles, si bien parece que la personalidad del sujeto sometido a stress, es tanto o más importante que el propio tipo o intensidad de éste (67), ya que un individuo puede elevar sus niveles de GH como consecuencia de una simple inyección, mientras que en otro no hay respuesta de la hormona tras por ejemplo una cateterización cardíaca.

Lo mismo podría afirmarse del stress psicológico, aunque aquí si hay discrepancias y no parece estar clara la participación de determinadas emociones en la secreción de GH. En los niños pequeños,

por ejemplo, la privación afectiva provoca una inhibición de la GH (47).

En la rata donde la regulación de GH es distinta al humano, la hormona ante cualquier tipo de stress responde con una brusca disminución de los niveles de GH (66) -al contrario de lo que ocurre con el humano-, probablemente mediada por conexiones inhibitorias del hipotálamo anterior, en las que estaría implicada la SRIH, por lo que puede ser suprimida con suero antiserum GH.

## 6. REGULACION DE LA SECRECION DE GH.

### 6.1. Nucleótidos y Prostaglandinas.

Los que actúan como segundos mensajeros, han sido implicados en la regulación de la GH. El c-AMP o su análogo sintético, el dibutilil c-AMP, producen liberación de GH tanto "in vivo" como "in vitro" (67,69).

Tanto el hipotálamo como la eminencia media contienen concentraciones elevadas de prostaglandinas (PG) (70), la implantación de PG en el hipotálamo medio basal (HMB) de la rata, estimula la secreción de GH (47), y su adición a cultivos hipofisarios produce el mismo efecto (67).

La PGE1 (69) y la PGE2 (71) producen liberación de hormona de crecimiento en la rata, por vía endovenosa. En el caso concreto de la PGE2, el efecto liberador se ejerce a nivel hipotalámico y es mediado por la GHRH, ya que el suero antiserum GH (anti-GH), no modifica la respuesta. Por otro lado las PG favorecen la acumulación de c-AMP en el medio (22), con lo que aumentarían paralelamente la liberación de GH -fundamentalmente en cultivos- donde además su

efecto es aditivo al de la GHRH (72), que también libera c-AMP.

Por el contrario, los inhibidores de la síntesis de PG, reducen la secreción de GH. La administración crónica de ácido acetilsalicílico reduce en el hombre la respuesta de la GH a la insulina (66), y tanto aquel como la indometazina reducen la respuesta a la GHRH (49). Este efecto es muy ligeramente modificado por el suero anti-SS (71), lo que indicaría que el efecto supresor sobre la GH de los inhibidores de la síntesis de PG, no está mediado por la SRIH.

En cualquier caso, no se conoce con exactitud cual puede ser el papel fisiológico de las PG en la regulación de la GH.

## 6.2. Dieta.

La secreción de GH, como se verá con detalle más adelante está sometida al control de los principios inmediatos por lo que es lógico pensar que tanto el contenido calórico como el metabólico de la dieta influyan sobre la hormona.

En el hombre, el ayuno induce un aumento manifiesto de la secreción de la hormona a partir del segundo o tercer día. Este hecho puede interpretarse como un mecanismo de defensa, ya que la GH induce la movilización de los ácidos grasos (47). La malnutrición calórica grave, se acompaña de niveles circulantes bajos, mientras que paradójicamente, en condiciones de malnutrición proteica crónica, los niveles de GH están elevados (66).

El descenso de la glucemia estimula la liberación de GH y de hecho la hipoglucemia insulínica es un test comunmente utilizado para determinar la reserva hipofisaria de GH. Por el contrario, salvo en

situaciones de stress y durante el sueño, la hiperglucemia suprime la liberación de la hormona.

Diversos aminoácidos son capaces de liberar GH y en particular la arginina que es usada como test de reserva de GH. Este mismo efecto se produce al ingerir alimentos de alto contenido proteico.

Un aumento en los niveles de ácidos grasos libres (FFA'S), suprime la secreción de GH.

Los pacientes obesos presentan con frecuencia respuestas disminuidas a estímulos liberadores de GH como la hipoglucemia insulínica, arginina o GHRH (73). La razón de esta baja respuesta no está clara, ya que los cambios inherentes a la obesidad son múltiples. En cualquier caso, tras la pérdida de peso, las respuestas se normalizan.

## 7. SEÑALES PERIFERICAS DE FEED-BACK.

### 7.1. Somatomedinas (SM). Insulin like growth factors (IGF'S). Otros factores de Crecimiento.

Existe una familia de substancias, dependientes de la GH, encargadas al menos en parte, de mediar los efectos de la hormona sobre el crecimiento, entre las que se incluyen SM A, SM C, IGFI e IGF II. Los términos SM e IGF, son usados actualmente como sinónimos y de hecho, la secuencias de aminoácidos del IGF I y la SM C son idénticas (74), y muy parecidas a la insulina.

La SM C es un polipéptido de 70 aminoácidos, sintetizado en el hígado, que circula en el plasma unido a una proteína transportada específica en más del 95%, con una vida media entre 3 y 6 horas (67), habiéndose descrito un patrón débilmente pulsátil de

secreción en la rata a intervalos de dos horas, que no se ha encontrado en el hombre.

Sus valores plasmáticos varían con la edad, alcanzando sus máximos entre los 13 y 15 años (75), para disminuir después gradualmente. Tanto la proteína transportadora, como la SM C se encuentran bajo el control de la GH.

Los niveles de SM están altos en la acromegalia y disminuidos en los enanismos hipofisarios (76), asimismo una simple inyección de GH provoca rápidamente un incremento de los valores de IGF'S y sus proteínas transportadoras (66), habiéndose demostrado igualmente un efecto estimulador de la GHRH en la síntesis de somatomedinas (78).

Ahora bien, para estimular esta síntesis de SMC se necesitan unos determinados niveles de GH, ya que en pacientes con deficiencia de GH, donde los niveles alcanzados en respuesta a la GHRH son menores, la infusión de GRF no lleva consigo la síntesis de SM C (79).

Sin embargo, hay que tener presente que tanto o más que la GH, la insulina y otros factores nutricionales influyen en la producción de somatomedinas. Así una deficiencia insulínica se acompaña de niveles bajos de IGF'S, que se normalizan tras la administración terapéutica de aquella (80), y el contenido protéico de la dieta, influye no sólo en la síntesis de IGF'S, sino también en su acción sobre el cartílago (76).

La observación de que en enfermedades que cursan con niveles bajo de SM, de las que la más típica es el enanismo tipo Laron, se encontraban cifras elevadas de GH, hacía suponer el papel de feedback negativo que las SM tenían sobre la secre-

ción de GH, hecho comprobado en la actualidad. En este sentido el IGF I es considerablemente más potente que los demás, demostrando una más alta afinidad por los receptores IGF, recientemente caracterizados (81).

La inhibición de la secreción de GH se llevaría a cabo tanto a nivel hipotalámico, estimulando la SRIH, como hipofisario, aunque esta última sería más lenta (76).

Las hormonas tiroideas, también parecen modular el efecto del IGF-I sobre las células somatotropas. Se ha demostrado, que los cultivos monocapa de células AP de ratas hipotiroideas, son menos sensibles que los de eutiroides a los efectos inhibidores del IGF-I sobre la secreción basal de GH (82).

En contra de todo lo conocido, Madsen (83) ha comunicado un efecto directo de la GH sobre el cartilago epifisario de la rata. "In vitro", la GH se uniría a los condrocitos y estimularía su proliferación, e inyectada directamente en el cartilago de crecimiento "in vivo", aceleraría el crecimiento longitudinal del hueso. Si estos datos son ciertos y se confirman posteriormente, habría que reconsiderar el papel de las SM sobre el crecimiento.

El factor de crecimiento epidérmico, EGF, estimula a concentraciones fisiológicas la secreción de GH por las células AP en perfusión de rata (84), y es capaz de inhibir "in vitro" la estimulación de la T3 sobre la síntesis y liberación de GH (85). Receptores para el EGF se han encontrado en las membranas de las células pituitarias del hombre y las ratas (81). Cuando los cultivos se han llevado a cabo sobre líneas celulares tumorales, los efectos del EGF cambian. Así, producirían estímulo en la secreción y síntesis de PRL e inhibirían la síntesis de GH (cé-

lulas GH4 C1), o bien producirían una inhibición en el crecimiento celular estimulado por el factor de crecimiento dependiente de las hormonas tiroideas (células GH3 D6), también producido por la adenohipófisis (84).

El factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) así como el recientemente propuesto factor regulador del crecimiento del cerebro fetal, necesitan aún de mayor conocimiento para esclarecer su función (76).

Por último resaltar, que estos factores pueden también regular el crecimiento y multiplicación de las células somatotropas.

## 7.2. HORMONAS.

### 7.2.1. Esteroides sexuales.

Existe actualmente controversia sobre el papel que desempeñan los esteroides sexuales en la secreción de GH. La experimentación y la clínica han mostrado que los estrógenos pueden facilitar la liberación de GH. Las mujeres tienen picos secretorios mayores y más frecuentes que los hombres, tanto durante el día como durante el sueño. Por otra parte, la respuesta a la arginina y la hipoglucemia insulínica también es mayor (48,67). Además es durante la ovulación, en que la secreción de estrógenos es mayor, cuando encontramos una mayor respuesta a la arginina y unos valores basales de GH más altos (67).

Sin embargo, otros autores (86) no encuentran diferencias ni entre las concentraciones de GH en las diferentes fases del ciclo, ni entre hombres y mujeres (47,86), de hecho, incluso en un reciente estudio, se ha encontrado mayor respuesta a la GHRH en hombres que en mujeres (87).

Aunque los estrógenos tengan un efecto estimulador en la liberación de GH, parecen poseer un papel inhibitor sobre el crecimiento en si, ya que se supone que antagonizan los efectos estimulantes de la GH sobre el crecimiento esquelético, al inhibir la síntesis de SM inducida por la hormona (49). Este efecto conocido de antiguo supone la base del tratamiento clásico de la acromegalia con estrógenos.

El lugar de acción de los estrógenos tampoco es unánimemente admitido, mientras Webb (88) no encuentra acción de los mismos sobre las células hipofisarias, suponiendo un efecto a nivel hipotalámico, Jansson encuentra receptores específicos para estrógenos en las células somatotropas adenohipofisarias de la rata y postula que los estrógenos actuarían directamente a este nivel (89).

Si hay acuerdo en el papel de los andrógenos sobre el crecimiento, ya que el tratamiento con andrógenos de niños con pubertad retrasada, aumenta la respuestas de GH a hipoglucemia, arginina y GHRH (90).

En la rata, las hormonas sexuales parecen tener un papel determinante. La secreción de GH tiene un patrón diferente según el sexo, los machos presentan pulsos amplios y basales bajas, y las hembras picos menores y valores mayores entre los pulsos (49), cambios atribuibles a la testosterona (91) pues los machos gonadectomizados disminuyen sus pulsos hasta los niveles de las hembras.

#### 7.2.2. Glucocorticoides.

Los glucocorticoides, tienen un doble efecto sobre la síntesis y liberación de GH, estimulándolas a nivel pituitario, al mismo tiempo que por un mecanismo hipotalámico las inhiben.

La observación clínica hace suponer que el efecto inhibitor hipotalámico predomina sobre el estimulador, ya que los niños con enfermedad de Cushing o en tratamiento crónico con corticoides, no tienen un crecimiento normal, y su secreción de GH en 24 horas se reduce (67).

Por otro lado, en sujetos normales, la administración exógena de glucocorticoides disminuye la respuesta de la GH a la hipoglucemia y ejercicio físico pero no a la arginina (67).

Asimismo, los pacientes con acromegalia tratados con corticoides, tiene disminuida la respuesta de la GH a la GHRH, al igual que los afectos de enfermedad de Cushing. Sin embargo, y sorpresivamente la dexametasona incrementa "in vitro", la respuesta al GHRH en cultivos de células de adenomas hipofisarios de pacientes con acromegalia (92,93,94).

En la rata, los cultivos de células hipofisarias normales, aumentan considerablemente su respuesta a la GHRH tras ser tratadas con dexametasona (95) y el número de receptores para GHRH se incrementa (96), sugiriendo que en la rata, los glucocorticoides ejercen un efecto facilitador sobre la secreción de GH.

### 7.2.3. Hormonas tiroideas.

La secreción y síntesis de GH está en dependencia de las hormonas tiroideas tanto "in vivo" como "in vitro". Los niños hipotiroideos tiene retardo de crecimiento, y como en los adultos la respuesta de la GH a la hipoglucemia, arginina, GHRH y los picos nocturnos están disminuidos (97,98) hallándose también una menor secreción total en 24 horas y unos valores plasmáticos menores de somatomedina C (98).

La triiodotironina (T3), estimula la síntesis de GH, y las respuestas a la GHRH en cultivos de células hipofisarias (67). El mecanismo parece ser esencialmente el mismo que en el caso de los glucocorticoides, mediante el cual la hormona se liga a un receptor nuclear de la célula hipofisaria e incrementa la transcripción del gen regulador de la GH (99). Se ha propuesto un sinergismo entre hormonas tiroideas y glucocorticoides en su acción sobre la GH, ya que el efecto de ambas hormonas juntas es mucho mayor que el de cada hormona sola (100).

Además de su efecto directo sobre la pituitaria, las hormonas tiroideas pueden actuar sobre la producción hipotalámica de GHRH y somatostatina. La T3 produce liberación de somatostatina en células hipotalámicas de rata "in vitro" (101), lo que podría suponer un efecto inhibitorio central, en contraposición a su acción hipofisaria, y de hecho, en ratas hipotiroideas se ha encontrado una disminución en el contenido hipotalámico de somatostatina (101) y de GHRH (102), desconociéndose por ahora los mecanismos por los que ocurren estos hechos.

#### 7.2.4. Calcitonina.

Se han encontrado receptores de calcitonina en el hipotálamo (49), lo que sugiere que puede tener algún papel regulador neuroendocrino.

La calcitonina de salmón inhibe la liberación de GH en el humano, mientras la extraída de anguilas administrada a la rata por vía intracerebroventricular suprime la secreción de la hormona en el animal sin anestesia. Sin embargo no se han encontrado efectos de esta calcitonina en cultivos hipofisarios de rata (103).

#### 7.2.5. Glucagón.

El glucagón es capaz de estimular la secreción de GH en el hombre, si bien no existe acuerdo sobre el mecanismo de este efecto. Algunos autores piensan que sería una acción secundaria a modificaciones en la glucemia, y otros, que la hormona actuaría directamente a nivel hipotalámico por un mecanismo catecolaminérgico. Esta segunda hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el bloqueo de los receptores  $\beta$  favorece esta acción estimuladora del glucagón (47).

### 8. SEÑALES METABOLICAS.

El mecanismo general por el cual las señales metabólicas son capaces de influenciar sobre la GH no se conoce. Se sabe que en el hipotálamo hay células capaces de detectar las concentraciones de varios metabolitos en sangre, que podrían transferir esta información a la hipófisis y modular la secreción de GH. Estas células podrían ser las células de la glia, o las neuronas productoras de GHRP o SRIH, también podrían ser otras células específicas que transmitirían su información a las neuronas GHRH o SRIH (67). En el presente sólo existen evidencias indirectas de esta regulación hipotalámica, y todos estos mecanismos están pobremente comprendidos en la actualidad.

#### 8.1. Glucemia.

En el hombre la elevación de los niveles plasmáticos de glucosa inhibe la secreción de GH, tanto basal como tras estímulos y por contra la caída de estos niveles produce un efecto estimulador sobre la hormona, mientras la rata responde a la hipoglucemia, ayuno y diabetes con una disminución de la secreción (104), es decir, justamente al revés que el hombre.

El comportamiento de la GH frente a la glucosa, no parece ser de tipo homeostático, ya que antes de que la GH secretada pueda actuar sobre el metabolismo de los carbohidratos, la glucemia se ha normalizado (47). Tampoco depende de los valores absolutos de la glucemia, sino más bien de las variaciones de esta, ya que puede producirse liberación de GH incluso en la fase de caída de una curva de sobrecarga de glucosa, o tras la infusión de 2 D-glucosa, un análogo no metabolizable (51).

Por otra parte podría atribuirse en parte al stress, no pudiéndose descartar la activación de un mecanismo del SNC que funcionaría a través de receptores (47), ya que la hiperglucemia no puede inhibir la secreción de GH tras la sección del tallo hipofisario, y las células somatotropas en cultivos no modifican para nada su actividad aumentando la concentración de glucosa en el medio. El mecanismo por el cual la hipoglucemia causa liberación de GH no se conoce, pero parece ser independiente de la GHRH. La GHRH y la insulina tiene efectos aditivos cuando se administran juntas, sobre la secreción de GH (105), si bien después de una primera dosis de GHRH, dosis posteriores no siguen produciéndose picos de GH, mientras la insulina si los produce (106). El bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos, que inhibe la respuesta de la GH a la GHRH, sólo produce una ligera disminución de la respuesta de GH a la hipoglucemia (107), sugiriéndose que la hipoglucemia produciría la liberación de GH reduciendo la liberación de somatostatina por el hipotálamo (108), aunque la hipótesis debe confirmarse.

## 8.2. Acidos grasos libres (FFA'S).

Los cambios en las concentraciones plasmáticas de FFA'S tiene los mismos efectos que la glucosa en

el hombre. La elevación de los mismos inhibe la secreción de GH, su disminución la estimula. El efecto inhibitor parece ser más potente que el de la hiperglucemia ya que los picos secretorios de GH que no se modifican por la glucosa, son suprimidos por los FFA'S, así como por la propia hipoglucemia, ejercicio físico, L-Dopa, clonidina y arginina (109), cuando se administran a sujetos normales.

Este mismo efecto se observa en pacientes con FFA'S y/o triglicéridos elevados (111). Esta acción de los FFA'S debe estar causada por una elevación de la somatostatina, ya que también inhiben el estímulo de la GHRH sobre la GH (109), y su efecto supresor no se produce en ratas tratadas con suero anti-SS (110), habiéndose postulado además un efecto directo sobre la hipófisis (112).

### 8.3. Aminoácidos.

Ya hemos indicado el efecto estimulador de varios aminoácidos sobre la secreción de GH. Ya que los aminoácidos estimulan también la liberación de insulina, ambas hormonas podrían actuar sinérgicamente estimulando la síntesis proteica (67).

Si los aminoácidos actúan como señales metabólicas ó específicamente como mensajeros, y su forma de actuar sobre la GH se desconoce. Se ha propuesto que podrían activar la secreción de GH en mono, compitiendo con la síntesis de serotonina, que no dispondría de precursores, si estos son utilizados como cadenas para construir proteínas (113). En cualquier caso, y dado que tampoco está claro que la serotonina inhiba en el hombre la secreción de hormona de crecimiento, el problema no está aclarado.

#### 8.4. Elementos traza.

El nickel (Ni ++) y el cobalto (Co ++), son dos metales de transición que antagonizan el calcio en una variedad de sistemas orgánicos. Ambos inhiben la secreción de GH activada por la GHRH, pero no la basal (114), lo cual es lógico si pensamos que se necesita redistribución de calcio en la estimulación de GH, pero no en la secreción normal.

Igualmente las ratas tratadas con selenio, tienen abolida la respuesta a la GHRH, y las concentraciones de SM-C en el plasma son bajísimas (38), aunque esto último pudiera deberse a la toxicidad hepática que posee el metal.

### 9. CONTROL NEUROENDOCRINO DE LA SECRECIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO: (GH)

#### 9.1. Áreas cerebrales implicadas en la regulación de la GH.

##### 9.1.1. Hipotálamo.

El papel del hipotálamo es fundamental en la secreción de GH tanto en el animal de experimentación como en el hombre.

Los tratamientos quirúrgicos que conllevan destrucción del hipotálamo o sección del tallo hipofisario, se acompañan de una disminución de los niveles de GH, y de abolición o muy escasa respuesta a la hipoglucemia insulínica y arginina en el hombre. Pequeñas lesiones de la eminencia media (EM) y del hipotálamo medio basal (HMB) en el mono, bloquean la secreción de GH inducida por stress e hipoglucemia insulínica, mientras que en la rata joven la lesión del hipotálamo ventro medial (HVM) retarda el creci-

miento y produce caída de los niveles plasmáticos de GH (47).

La estimulación eléctrica de HVM induce en las ratas liberación de GH que característicamente se produce a los 10-15 minutos de cesar los impulsos eléctricos (47,66). Estos hechos se interpretan como un efecto de la estimulación eléctrica sobre la somatostatina a la que seguiría una secreción de GHRH, como fenómeno de rebote al acabar los impulsos.

La estimulación del área preptica inhibe en cambio la secreción de GH en la rata y el humano (66), y las lesiones de dicha zona facilitan la secreción de la hormona, hechos fácilmente comprensibles si tenemos en cuenta que en dicha región se han encontrado grandes cantidades de somatostatina.

#### 9.1.2. Otras zonas del SNC.

La secreción del GH es modificable por la manipulación de varias áreas del SNC que tienen conexiones directas o indirectas con el hipotálamo. Así, la estimulación eléctrica de los núcleos mesencefálicos interpedunculares, el "locus coeruleus" y los núcleos del rafe, producen una rápida liberación de GH (67).

La estimulación eléctrica del hipocampo y la porción basolateral de la amígdala, causan secreción de GH, mientras que la estimulación de la amígdala corticomediales inhibe su liberación. Se supone que la primera está conectada al HVM, y se sabe con certeza que su porción corticomediales inerva el área preóptica, por lo que tanto el efecto estimulador como el inhibidor tendrían una explicación clara (66).

Los estudios referidos con anterioridad están desarrollados en ratas, cuya regulación de GH ya

sabemos que es distinta al hombre. Sin embargo la estimulación de la amígdala en el hombre durante operaciones quirúrgicas también provoca liberación de GH (66), mientras que las lesiones del septo se asocian con secreción disminuida de GH y enanismo, justamente los efectos contrarios a los producidos en el hamster (67).

## 9.2 RIF'S. FACTORES INHIBIDORES Y ESTIMULADORES DE LA SECRECIÓN ANTEROHIPOFISARIA.

La transferencia de información en el SNC, implica la liberación de neurotransmisores a nivel sináptico, que comunicarían una neurona con otra.

Sorprendentemente, hasta los años 60 sólo se conocían tres sustancias con actividad como neurotransmisores : las aminas acetilcolina, noradrenalina y serotonina.

El número actual de transmisores se encuentra en continua expansión desde que se conoce que hay aminoácidos que funcionan como neurotransmisores y se descubrieron las neurohormonas hipotalámicas y otros neuropéptidos que se han reconocido o propuesto como tales.

Sin embargo para atribuir a un péptido u otra sustancia el papel de neurotransmisor, tendríamos que revisar primero que entendemos por este y que condiciones se requieren para considerarlo así.

Los neurotransmisores (116), son moléculas que liberadas por terminaciones nerviosas, alterarían la actividad eléctrica de las neuronas adyacentes o modificarían a distancia la actividad fisiológica de diversos órganos. Deben existir en concentraciones altas en las terminales neuronales, ser liberados tras la despolarización de la correspondiente neurona

y sus acciones deben reproducir los efectos de la estimulación de la neurona postsináptica.

Algunos péptidos no cumplen con claridad estos requisitos, y se les ha propuesto un papel de neuro-moduladores, sustancias que modificarían las acciones de los neurotransmisores clásicos o modificarían su "turnover" (117).

Esta diferenciación solo es semántica y no hace más que esconder lo poco que se sabe de los mecanismos internos de las sinapsis, ya que lo que está claro es que cualquier sustancia peptidérgica o no, que se libera al despolarizarse una neurona, puede transmitir información importante a las adyacentes.

Todas las sustancias peptidérgicas se sintetizarían y liberarían por las células del sistema neuroendocrino difuso, constituido por la división central y periférica del sistema APUD (amine precursor uptake and decarboxilation). La división central incluiría las células endocrinas y neuroendocrinas del eje hipotálamo-hipofisario y glándula pineal y la periférica las células APUD del resto del organismo, la gran mayoría de las cuales se encuentran en el tracto gastrointestinal y páncreas. Esta es la razón de que estos péptidos se encuentren en el SNC y aparato digestivo y raramente en otras localizaciones (118).

No existe ninguna característica anatómica ni estructural propia de las neuronas peptidérgicas, a no ser los gránulos de almacenamiento del péptido en la sinapsis, que suelen ser mayores que los de los neurotransmisores clásicos. Sin embargo la dinámica de los hechos en las neuronas en las que se realiza la transmisión peptidérgica si es distinta. Por ejemplo, los péptidos que se liberan en la sinapsis

no tienen mecanismos de reciclaje, ni pueden ser sintetizados localmente, con lo que cada molécula debe ser sustituida por otra que se originaría como precursor en el soma de la neurona y llegaría a la sinapsis por transporte axonal (119).

Estos mecanismos, aparentemente más ineficaces que los de los neurotransmisores se compensan por otras características, ya que se necesitan concentraciones mucho más bajas para activar los receptores -las concentraciones de péptidos encontradas en el SNC vienen a ser unas 1.000 veces menores que las de monoaminas, y 100.000 veces menores que las de aminoácidos-, serían liberados intermitentemente, y su efecto sería más duradero (119).

Existen evidencias de la presencia de péptidos semejantes a los de los mamíferos en organismos unicelulares (120), algunos con estructura similar a los RIF'S, donde desempeñarían un papel de información como mensajeros solubles, y que dada su importante función se habrán conservado en la evolución filogenética, adaptando su función a medida que se desarrollaran el sistema nervioso central y el endocrino.

Se conoce de antiguo que una misma célula puede contener más de un mensajero, un péptido y un neurotransmisor, fenómeno muy común en las células APUD del tubo digestivo por ejemplo. La coexistencia de un neurotransmisor y un péptido en una sinapsis se explicaría como consecuencia de la demanda de una información más rápida y eficaz por parte de los mamíferos, que desarrollarían las vesículas sinápticas pequeñas, para sintetizar, almacenar y liberar exclusivamente transmisores clásicos, que se añaden a las vesículas más grandes, donde se almacenarían los péptidos, o ambos, péptidos y neurotransmisores (121). Estudios en el tejido nervioso periférico han demostrado que esta coexistencia puede hacer que

ambos mensajeros actuen de forma sinérgica en una determinada vía efectora, o que los efectos del péptido pueden ser independientes, e incluso no directamente relacionados con el mecanismo de transmisión.

Una vez explicados todos estos mecanismos de funcionamiento peptidérgico, diremos que los RIF'S (releasing and inhibiting factors), son neurohormonas hipotalámicas constituidas estructuralmente por péptidos de reducido peso molecular, que oscilan entre 3 y 44 aminoácidos, son sintetizados por neuronas hipotalámicas y secretados en la eminencia media, donde a través de los vasos porta alcanzarían la hipófisis anterior, ejerciendo de manera específica un efecto liberador o inhibidor sobre la secreción de una hormona adenohipofisaria determinada. Actualmente se ha demostrado también que su presencia es necesaria para que las células encargadas de la síntesis de una hormona hipofisaria se diferencien como tales y en una proporción relativa con las demás (122).

La hormona de crecimiento se encuentra bajo la influencia de dos RIF'S estimulada por la GHRH (growth hormone releasing hormone) e inhibida por la somatostatina (SRIH, somatotropin release inhibiting hormone).

#### 10. GHRH: GROWTH HORMONE RELEASING HORMONE.

La GHRH, ha sido el último de los factores hipotalámicos, reguladores de la secreción adenohipofisaria descubierto. Sin embargo el volumen de literatura acumulada sobre su estudio, así como la transición en el breve espacio de tiempo de 6 años de la investigación básica al desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y su empleo en la terapéutica clínica no tienen precedentes.

La existencia de factores hipotalámicos que controlarían el funcionamiento hipofisario se sospechaba desde los trabajos de Harris (17), básicos en la moderna neuroendocrinología.

En el año 80 y gracias a los trabajos de Schally y Guillemin, estos factores estaban ya identificados excepto el CRF -corticotropin releasing factor- y el GRF. La GHRH quizás debido a la mayor complejidad estructural de su molécula seguía sin identificarse.

Sin embargo su existencia se sospechaba desde mucho antes. La primera evidencia de su existencia la obtuvo Reichlin (123), que demostró como lesiones del núcleo ventromedial de la rata producían parada, del crecimiento y deficiencia de GH. Posteriormente numerosos grupos de investigación buscaron la GHRH de extractos hipotalámicos, pero o no conseguían identificar el péptido, o cuando conseguían aislar alguno, este no cumplía los requisitos biológicos necesarios para considerarlo como GHRH.

Además a los problemas propios de identificar una molécula compleja, se une el hecho de que el hipotálamo contiene en relación con otros RIF'S muy poca GHRH, y en cambio grandes cantidades de somatostatina. Por ello, para identificar la GHRH se precisaba bien preparar un extracto hipotalámico sin somatostatina, o encontrar una fuente de GHRH que estuviera libre de ella.

Se empezaron a describir tumores que producían acromegalia, localizados fuera de la hipófisis (124,125,126), que se interpretaron como focos ectópicos de producción de GHRH, incluso en uno de ellos, se llegó a purificar parcialmente la molécula (51).

Por fin Rivier, de un tumor pancreático que causaba acromegalia a una mujer joven (identificado por Thorner (127)), logró aislar y caracterizar el GRF (128,129), que resultó ser un péptido de 40 aminoácidos, el hp GRF (human pancreatic GRF). Independientemente y de otro tumor diferente, Guillemin (130), caracterizó otro péptido, éste de 44 aminoácidos, con un grupo amino carboxi-terminal, el hp GRF 1-44. Dentro de este mismo tumor se encontraron otros dos péptidos el hp GRF 1-40 -idéntico al de Rivier- y el hp GRF 1-37, que se suponían productos de degradación del hp GRF 1-44. El péptido 1-37 y el 1-40, son idénticos a los primeros 37 y 40 aminoácidos respectivamente, del péptido 1-44.

Parte del primer tumor fué también analizado por el grupo de Guillemin (131), y la caracterización obtenida fué la misma que la del otro grupo. Todos estos autores desarrollaron análogos de síntesis de las sustancias que habían extraído, mostrando la misma actividad biológica que los péptidos originales (128,129,130,131).

Una vez identificada la GHRH hipotalámica, se ha visto que el hipotálamo humano contiene tanto el GRF 1-44, como el GRF 1-40 y el GRF 1-37, lo que hace pensar que los tres péptidos son variantes naturales del mismo compuesto. En cualquier caso el extremo terminal de la molécula no parece ser importante, ya que toda la actividad biológica se encuentra en los primeros 29 aminoácidos, tanto "in vivo" como "in vitro" (132).

Estructuralmente la GHRH forma parte de la familia péptidos gastrointestinales glucagón-secretina, que incluye también al VIP (vasoactive intestinal polypéptide), y al GIP (gastric inhibitory polipéptide) (67). Deriva de un polipéptido precursor, de 107 o 108 aminoácidos, -la pre-pro GHRH- (133), y el

gen encargado de su síntesis se encuentra en el cromosoma 20. Su vida media en plasma es de alrededor de 7 minutos, siendo rápidamente degradada por la dipeptidilaminopeptidasa, produciéndose un metabolito muy estable, la GHRH 3-44, que es unas 100 veces menos potente que el GHRH 1-44 en producir liberación de GH, pero conserva toda la inmunoreactividad (134).

El GRF de la rata (r GRF) fué descubierto en 1.983 por Vale y River. Se trata de un péptido de 43 aminoácidos, de los que 14 son diferentes al h GRF (135), por ello aunque los h GRF'S sintéticos son potentes secretagogos de GH en la rata, el r GRF es dos o tres veces más potente (135).

#### 10.1. Localización.

Block y cols. (136), utilizando anticuerpos contra el GRF 1-40, han hecho posible los estudios de localización del péptido por inmunocitoquímica. Usando esta técnica encontraron que tanto en el hombre como en la rata, las neuronas inmunofluorescentes al GRF están confinadas al núcleo arcuato (también llamado en otros trabajos infundibular) y al núcleo ventromedial. Estas neuronas, proyectarían sus axones hacia el área posterior de la eminencia media, donde entrarían en íntimo contacto con los vasos portales. Esta topografía es la típica de un sistema neurosecretor hipotalámico, y podría considerarse como una vía GHRH-érgica.

En un estudio reciente (137), usando un RIA específico para la GHRH, se ha encontrado que aunque las concentraciones más altas se encuentran en el núcleo arcuato y el tallo hipofisario, hay también cantidades significativas, aunque bastante más bajas en el área periventricular, núcleo paraventricular y núcleo supraóptico, que no habían sido detectadas por inmunocitoquímica.

Christofides y Cols (138), estudiando la distribución de la GHRH en el cerebro e intestino humano, han hallado inmunorreactividad a la GHRH (IR-GHRH) en el septum y la substancia innominada, aunque las concentraciones más altas siguen apareciendo en hipotálamo. También encontraron IR-GHRH en la mucosa del intestino superior, fundamentalmente en yeyuno, con valores más bajos en duodeno y estómago. En cualquier caso la IR-GHRH del aparato digestivo no ha demostrado ser auténtica GHRH 1-44 ó GHRH 1-40.

El hecho de que los niveles plasmáticos en sangre periférica de GHRH se eleven tras una comida, tanto en sujetos normales como en acromegálicos (139), ha hecho pensar que la GHRH puede producirse de forma natural en tejidos periféricos. En cualquier caso, la producción ectópica de GHRH, no produce más disturbio endocrino que la acromegalia, y esta en una proporción sorprendentemente baja.

Aparte de los dos tumores en los que se aisló, se han referido otros productores de GHRH (140,141,142), que además han demostrado ser idénticas a la GHRH hipotalámica y poseer su misma actividad sobre la secreción de GH (143,144).

Asa y Cols (145) han encontrado IR-GHRH positiva en 4 de 24 tumores endocrinos pancreáticos, 1 de 5 tumores carcinoides bronquiales, 2 de 15 carcinoides intestinales, 1 de 2 carcinoides del timo, 2 de 20 carcinomas medulares de tiroides, 1 de 12 feocromocitomas y 5 de 20 carcinomas pulmonares de células pequeñas. Solo 2 de los tumores pancreáticos y el carcinoinde bronquial estaban asociados a acromegalia.

Recientemente, y en nuestra ciudad, ha sido identificado como otro tumor productor de GHRH, un tumor carcinoinde bronquial (146).

## 10.2. MECANISMOS DE ACCION. FUNCIONES FISIOLOGICAS.

La GHRH, estimula la liberación y la síntesis de GH.

La liberación de GH se produce tras la acción de la GHRH sobre sus receptores específicos, situados en la membrana de las células somatotropas (96), lo que produce la activación de la adenilciclasa incrementando el c-AMP intracelular por un mecanismo calcio-dependiente (147). La GHRH también incrementa el "turnover" del fosfatidil inositol, que es inhibido a su vez por los antagonistas de la lipooxigenasa, lo que sugiere que esta vía también es importante para la secreción de hormona de crecimiento (147).

La síntesis de GH se produce por un mecanismo que estimula la transcripción del gen de la misma y depende del c-AMP pero no del calcio (148). La GHRH, también estimula "in vitro", la secreción de GH por adenomas hipofisarios de células somatotropas (149), lo que indica que las células somatotropas tumorales también poseen receptores-GHRH.

Midiendo la unión de análogos sintéticos marcados radioactivamente, a los receptores, se ha comprobado que la mayor afinidad la posee la porción carboxi-terminal de las moléculas de 29 y 32 aminoácidos (135) y como ocurre con otros sistemas celulares similares, solo se necesita una ocupación parcial de estos receptores para que la GHRH sea efectiva, de forma que un 10% de ocupación es suficiente para reproducir la totalidad el efecto biológico (150).

El resto de los péptidos de la familia de la GHRH (glucagón/secretina), no compiten por los receptores hipofisarios de ésta, mientras que la GHRH, puede reaccionar con los receptores gastrointesti-

nales del VIP, estimulando la adenilciclase y activando la secreción de enzimas digestivas por el páncreas (67).

Los receptores de GHRH son dependientes de los glucocorticoides. Al adrenalectomizar ratas, se produce una caída de su número, que es restaurado a la normalidad tras administrar exógenamente glucocorticoides, en menos de ocho horas (96).

La producción de c-AMP dependiente de la GHRH es inhibida parcialmente por la somatostatina, por lo que ésta bloquea parcialmente la secreción de GH inducida por la GHRH (135,150,151), sin embargo, este efecto supresor no se manifiesta sobre la síntesis (135,150). El mecanismo de inhibición de la secreción de GH por la somatostatina, no es competitivo con la GH-RH (135,150).

La respuesta de la GH a la GHRH, es dosis dependiente y equipotente para el hp GRF 1-37, hp GRF 1-40, hp GRF 1-44 y sus análogos sintéticos (151). La administración endovenosa de GHRH, produce en el hombre una liberación de GH que ya es detectable a los 5 minutos, alcanza su pico máximo sobre los 30 - 60, y retorna a valores basales a las 2 ó 3 horas, aunque hay que destacar grandes variaciones individuales en la respuesta (147). En los niños y adultos jóvenes se observan respuestas similares, mientras que en los ancianos ésta se va reduciendo paulatinamente.

La dosis media (ED/50) a la cual la GHRH produce su actividad biológica en el hombre es de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ., con un rango de respuestas entre 0,1 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ., las dosis más bajas producen una respuesta monofásica, mientras que las más altas -entre 3,3 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ., dan lugar a una elevación de GH más prolongada, que tiene además un segundo incremento dos

horas después del bolo, dando lugar a una característica curva bifásica (152).

Los niveles séricos de SM-C, aumentan unas 24 horas después de la administración de la GHRH, indicando que la estimulación de GH por la GHRH tiene un efecto biológico (135).

Utilizando estas dosis, no se afectan otras hormonas hipofisarias, sin embargo a dosis más altas se produce una débil liberación de PRL (153), efecto mucho más marcado en los acromegálicos (154). A dosis 100 veces mayores que las que se necesitan para liberar GH, la GHRH induce secreción de LH, FSH y opiáceos endógenos, interaccionando directamente con los receptores de LHRH, ya que los antagonistas de esta hormona bloquean dicho efecto (155).

La potencia liberadora de la GHRH sobre la GH es mayor que la de otros secretagogos convencionales. Laron (156), encontró que de 6 pacientes diagnosticados de deficiencia de GH, que no respondían a hipoglucemia, arginina y clonidina, 2 tuvieron respuestas positivas a la GHRH, lo que le llevó a proponer la prueba como diagnóstico diferencial de las deficiencias de GH de origen hipofisario e hipotalámico.

Por último hacer notar que en un trabajo reciente (157), se ha comprobado que en la rata, la GHRH no solo induce secreción de GH digamos "convencional", sino que bajo su control se encuentran al menos otras 17 proteínas que presentan inmunoreactividad cruzada con la GH, cuya secreción es además abolida por la somatostatina, por lo que los autores plantean la hipótesis de que al menos en la rata, hubiera múltiples variedades de GH o de r GH-genes.

11. AUTORREGULACION DE LA GH. EFECTO DE LA ADMINISTRACION CONTINUADA DE GHRH.

La infusión prolongada o los bolos intravenosos repetidos de GHRH, producen una disminución en las respuestas subsiguientes de la GH a la GHRH tanto "in vitro" como "in vivo". (158,159).

La infusión continua de GHRH causa en el hombre una liberación aguda de GH, cuyos niveles permanecen altos durante 5 1/2 ó 6 horas, para a partir de ese momento decrecer, aunque continúe la infusión de la hormona estimuladora (158). Por otra parte, la administración pulsátil crónica de bolos de GHRH, muestra una respuesta total de GH similar (160), con la salvedad de que si bien durante el día la respuesta a un segundo pulso está marcadamente disminuida, durante la noche se produce normalmente, fenómeno que no puede asociarse a la fase SWS, ya que 9 sujetos de los 12 que se sometieron a la prueba estaban despiertos. La deficiencia puede deberse a la depresión en la secreción de somatostatina durante la noche.

En la rata, como es habitual, la situación es diferente, la desensibilización se produce tanto "in vivo" como "in vitro" (161,162), si bien el tiempo necesario para conseguirla es mayor -alrededor de 24 h.-, y la GH no vuelve a sus valores basales, sino que se mantiene constantemente elevada en aproximadamente el doble de estos (162). La administración pulsátil de GHRH no desensibiliza la rata, el patrón pulsátil se mantiene, si bien los picos son considerablemente mayores (163), y la respuesta a los bolos subsiguientes se produce siempre, al menos durante las primeras 30 horas (200, observaciones personales).

La pérdida de respuesta en sujetos normales no se aprecia en los pacientes acromegálicos "in vivo"

ni "in vitro", sugiriéndose alguna anomalía en la activación de la adenilciclase por su proteína acopladora (Ns), dentro de las células tumorales (164).

Este efecto tampoco se aprecia cuando se administra simultáneamente GHRH y somatostatina (159). Ya que el tratamiento con GHRH tiende a deplecionar las células somatotropas de GH y sabiendo que este efecto es impedido por la somatostatina, que inhibe la secreción de GH inducida por la GHRH (151), es lógico pensar que la depleción de GH sea uno de los factores implicados en éste fenómeno. Esto podría entenderse así en la rata, donde la infusión continua de GHRH da lugar a una pérdida drástica, del orden del 65-70% del total de GH (161). Sin embargo en el hombre los trabajos que han medido la cantidad de GH perdida por las células somatotropas sometidas a infusión continua de GHRH, no han encontrado nunca una pérdida mayor del 10% (1-1,5 mgr. sobre el total del 15 mgr. que contine la adenohipófisis) (150). Por lo tanto explicar el fenómeno de la desensibilización refiriéndonos solo a esta hipótesis parece aventurado. Es evidente que hay otros mecanismos implicados.

El pretratamiento con GRF in vitro, con o sin somatostatina, produce una disminución del c-AMP liberado en respuesta a la GHRH y un aumento en la ED/50 necesaria para estimular tanto c-AMP como la GH (162). Este fenómeno es específico para GH, ya que células somatotropas incubadas en medio con GHRH, que han perdido parte de su GH intracelular, y en las que la GHRH ya no induce liberación de GH, conservan sin embargo, aunque lógicamente algo disminuida su capacidad de respuesta a otros estímulos como el forskolin y el (Bu)<sub>2</sub> c-AMP, que estimulan directamente a la adenilciclase para producir c-AMP (162).

Otro de los mecanismos implicados es el fenómeno de "down regulation" que la GHRH ejerce sobre

sus propios receptores (165). El pretratamiento con GHRH "in vitro", induce una pérdida del 50% de los mismos, pero la relevancia fisiológica de este hecho es cuestionable, ya que sólo se necesita un acoplamiento del 10-20% de los receptores pituitarios de la GHRH para que la hormona ejerza la máxima respuesta secretora de GH (135,150).

Muy recientemente, el grupo de Cardiff (166), ha propuesto, que conjuntamente con la depleción de GH, la pérdida de responsividad a la GHRH también sería debida a una falta de acoplamiento de la proteína que regula la activación de la adenilclasa, o proteína acopladora (Ns), con la subsiguiente reducción de los niveles de c-AMP.

Por otra parte tanto el pretratamiento durante dos semanas con GHRH (152), como su infusión continua durante la noche (167), producen un marcado incremento de los picos de secreción nocturna, sin cambiar el patrón secretorio, que parece ser de gran importancia para el crecimiento. Ambos métodos se propusieron en consecuencia para el tratamiento de las deficiencias de GH. La comprobación de que los efectos sobre la secreción total de GH son similares en el caso de la administración pulsátil, que antes se suponía mucho más efectiva, y en la administración continua, ha supuesto un importante paso adelante en el tratamiento de las deficiencias de GH, que quizás permita el uso de análogos sintéticos de acción prolongada y liberación lenta, con la comodidad que ello conlleva para el paciente (160).

El problema de la autoregulación de la GH se complica si pensamos en otros factores también implicados, como las señales de "feed-back" que pueden producir las somatomedinas y la propia GH, y en la liberación de somatostatina y GHRH.

La GH estimula "in vitro" la liberación de somatostatina por células hipotalámicas (168), y la administración de la hormona a sujetos normales, disminuye considerablemente, o bloquea su liberación en respuesta a la GHRH. Este comportamiento se observa pretratando a los voluntarios con GH sólo 3 horas antes de la administración de GHRH, y por tanto sin que puedan producirse cambios en la SM-C inducidos por la GH, por lo que esta también produciría liberación de somatostatina "in vivo" (169), aunque sólo a nivel de la circulación portal y no se reflejaría en la circulación periférica (170), lo que tampoco es extraño, teniendo en cuenta la extremadamente corta vida media de la somatostatina (151). El pretratamiento con GH también bloquea el estímulo liberador de la clonidina, y no se modifica por el empleo de anticuerpos anti-SS, lo que indica que la reducción en la liberación de la GHRH también juega un importante papel en el autofeed-back de la GH (171).

La GHRH y la somatostatina, podrían también autoregular su propia secreción a través de un mecanismo de feed-back ultracorto, en el que ambas sustancias independientemente de su papel como neurohormonas actuarían como neurotransmisores a nivel hipotalámico. La GHRH inhibe "in vitro" su propia secreción y estimula la de somatostatina (172), mientras que la somatostatina también inhibe "in vitro" su propia liberación (173). Adicionalmente, la inyección ICV de dosis muy bajas de GHRH, provoca en la rata una bajada en los niveles de GH (174), mientras que las mismas dosis de somatostatina producen el efecto contrario (173,175).

Hay por último una observación reciente de importancia en relación con la desensibilización de las células somatotropas. Como ya se ha indicado la hipoglucemia insulínica induce liberación de GH por un mecanismo no dependiente de la GHRH, ya que tras

un primer bolo de esta, las respuestas a dosis subsiguientes no se producen, mientras que las respuestas de GH a la hipoglucemia estan preservadas (106), y ambas juntas, GHRH e hipoglucemia insulínica, tienen efectos aditivos sobre la GH (105). Seria por tanto posible que las células somatotropas tuvieran diferentes "pools" de liberación, y que el pretratamiento con GHRH produjera una depleción en el "pool" GHRH-dependiente, sin afectar al dependiente de la hipoglucemia (106).

## 12. SOMATOSTATINA. SRIF. (SOMATOTROPIN RELEASE INHIBITING HORMONE).

Desde que Krulich y sus colaboradores, en 1.968 (177) extrajeron una fracción de hipotálamo de rata y oveja, que inhibia "in vitro" la secreción de GH por células hipofisarias de rata, existía la evidencia de un factor hipotalámico inhibidor de la liberación de hormona de crecimiento. Más tarde, en 1.978, Brazeau (178), que investigaba la existencia de la GHRH, aisló un péptido en el hipotálamo de la oveja, capaz de inhibir la secreción de GH en cultivos hipofisarios tanto humanos como de rata.

Al clarificarse su estructura, se vió que era un péptido lineal de 14 aminoácidos, con un puente disulfuro entre los aminoácidos, 3 y 14 (Cys-SS-Cys), al que se llamó en base a su primer efecto conocido somatostatina, growth hormone-release inhibiting hormone (GH-RIH), o somatotropin-release inhibiting hormone (SRIH). Los análogos sintéticos que se desarrollaron a continuación, mostraron la misma actividad biológica que el péptido original (178,179).

Posteriormente se descubrieron varias formas moleculares de la hormona, una de ellas, de importancia biológica, parece ser una extensión de la porción

N-terminal del péptido original de 14 aminoácidos (SS - 14), hasta 28, y se la denomina somatostatina 28 (SS - 28) (151).

Al igual que la GHRH, la somatostatina se sintetiza a partir de un precursor de 116 aminoácidos (pre-pro-somatostatina), que incorpora tanto la SS-14 como la SS-28. Este polipéptido precursor está constituido de una primera porción de 24 aminoácidos (pre-región), a la que sigue una porción "conectora" de 64 (pro-región), que se continúa con la somatostatina 28 (que a su vez contiene la somatostatina 14) (180).

Se sabe que una vez sintetizado en los cuerpos neuronales, este polipéptido es transportado por flujo axonal hacia las terminaciones nerviosas de la neurona, hasta entrar en contacto con los vasos portales. Las funciones de los restos moleculares una vez generadas las SS-14 y SS-28, no se conocen.

### 12.1. Localización.

La somatostatina es con mucho el péptido hipotalámico más ampliamente distribuido, ya que existe y en concentraciones notables en todo el tracto gastrointestinal, fundamentalmente en el páncreas, donde además parece que puede ser sintetizado y liberado (151).

Centrándonos en el hipotálamo, se ha demostrado por técnicas de inmunohistoquímica, que los cuerpos celulares de las neuronas que contienen somatostatina se encuentran fundamentalmente en el núcleo paraventricular y en el área preóptica medial, en el hipotálamo anterior (181), localización muy similar a la encontrada utilizando métodos de radioinmuno ensayo (182).

Desde aquí, las neuronas proyectarían sus axones a la eminencia media y el tallo pituitario con ramos de menor importancia dirigidos a los núcleos ventromedial y arcuato, y a la región periventricular. Fibras IR-SS positivas se han encontrado también en la neurohipófisis, indicando la existencia de un tercer sistema neurosecretor hipotálamo-hipofisario (181).

Patel y Reichlin (182), encontraron el siguiente orden decreciente de concentración de somatostatina: islotes pancreáticos y eminencia media, hipotálamo, médula espinal, corteza cerebral, lóbulo olfatorio, cerebelo y glándula pineal.

Refiriéndonos a su localización subcelular, las mayores concentraciones de SS se encuentran en las sinapsis, lo cual es típico de una sustancia que actúa como neurotransmisor o neuromodulador (183).

## 12.2. Acciones hipofisarias.

La somatostatina es un potente inhibidor tanto "in vivo" como "in vitro" de la secreción de GH, siendo capaz de suprimir las respuestas de GH a la hipoglucemia insulínica, arginina, ejercicio, L-Dopa, clorpromazina, morfina, neurotensina, sustancia P, dibutiril c-AMP, estimulación eléctrica del núcleo ventromedial, prostaglandinas y stress, así como de los picos nocturnos de la hormona (184). Por otro lado las hipersecreciones de GH de los enanismos tipo Laron, las respuestas anormales de algunos pacientes con síndrome carcinoide y los niveles elevados de GH de los acromegálicos, también son abolidos por la somatostatina (151).

Aparte de estas acciones sobre la GH, la somatostatina inhibe la secreción de TSH inducida por la TRH y la secreción nocturna de la misma en sujetos

normales, por un mecanismo no competitivo con el TRH y dosis-dependientes (20). También reduce la ACTH secretada por adenomas hipofisarios productores de esta hormona (21).

Los efectos inhibidores de la SS-28, sobre la GH parecen ser más potentes y de acción más prolongada que los de el tetradecapéptido, por contra, su efecto sobre la liberación de TSH sería igual (185). Estas diferencias en el poder inhibitor de las SS 14 y SS 28, y el hecho de que su comportamiento ante los receptores sea también diferente (185), con una afinidad tres veces mayor por parte de la SS 28, sugieren que la somatostatina 28 no sería únicamente un precursor de la 14, sino una molécula con funciones fisiológicas independientes (186).

### 12.3. Mecanismos de acción.

La somatostatina ejerce su efecto uniéndose a receptores específicos en las membranas de las células hipofisarias normales, habiéndose encontrado también receptores de somatostatina en células tumorales de adenomas productores de PRL y GH (187). En el caso concreto de estos últimos que causaban acromegalia, los niveles de GH eran inversamente proporcionales a la densidad de receptores SRIH, sugiriendo que la somatostatina está implicada en el control de GH en los acromegálicos.

El mecanismo por el cual la somatostatina inhibe la secreción de GH y TSH no está claramente definido. Se sabe que es independiente de la síntesis de proteínas, ya que la cicloheximida, un potente inhibidor de ésta, no previene la inhibición de la GH (188).

También sabemos que no es un mecanismo competitivo con la GHRH ni la TRH, ya que no bloquea la

unión de ambas hormonas estimuladores a sus receptores (188).

Por otro lado, como la somatostatina reduce el c-AMP, tanto basal como tras estimulación, se ha sugerido que podría actuar bloqueando la formación y acumulación de c-AMP intracelular, que es el paso inicial del proceso secretorio de GH y TSH (49). Sin embargo, la SS es capaz de inhibir la secreción de GH, aún con niveles de c-AMP muy aumentados (como por ejemplo, tras la administración de dibutiryl c-AMP) (151,184).

Otro mecanismo que se ha postulado estaría mediado por el calcio, ya que la somatostatina puede reducir los niveles citoplasmáticos de este, disminuyendo su entrada a través de la membrana o su reciclaje entre distintas estructuras intracelulares, lo cual bloquearía aquellas funciones que necesitan del mismo, entre las que se encuentra la secreción de GH (151).

La secreción SS, va a ser influenciada a su vez por los cambios en las concentraciones de ciertas iones intra y extracelulares. Niveles altos de  $K^+$  que producen despolarización de la membrana, estimulan la liberación de SS por un mecanismo  $Ca^{++}$  dependiente, ya que concentraciones bajas de este o el uso de antagonistas específicos como el Verapamil, abolen dicho efecto, y por otro lado, el aumento de las concentraciones intracelulares de  $Ca^{++}$ , producen liberación de SS incluso en ausencia de  $K^+$ . Este efecto liberador inducido por la despolarización de la membrana, se ve además potenciado por niveles bajos de  $Na^+$  extracelular (189), y se puede bloquear por los inhibidores de calmodulina, a pesar de unos niveles intracelulares normales de  $Ca^{++}$ , lo que implica también a esta sustancia en la regulación de la secreción de SRIH (190).

### 13. OTROS RIF'S HIPOTALAMICOS.

La TRH no modifica los niveles de GH en el adulto sano, si bien en determinadas ocasiones patológicas como la acromegalia, depresión, anorexia nerviosa, fallo renal, y en general en aquellos casos en los que las respuestas de GH están disminuidas frente a estímulos del SNC, puede producir la liberación de la hormona (47).

Esta acción se debería a la existencia en estas enfermedades de una desconexión funcional entre SNC y pituitaria, habiéndose demostrado experimentalmente un efecto directo de estimulación de la liberación de GH por la TRH, en ratas a las que se había destruido previamente la eminencia media o el núcleo ventromedial (191).

La TRH administrada i.c.v. a ratas normales, inhibe sin embargo la secreción normal de GH, y la respuesta de la GH a la GHRH (192), efecto que puede revertirse administrado a los animales suero anti-SS, con lo que cabe suponer que en estas condiciones la TRH estimule la secreción de SRIH.

La hormona estimuladora de corticotropina puede influenciar también la secreción de GH, ya que la administración i.c.v. de CRF a ratas en "freely moving" causa una inhibición dosis-dependiente de la secreción de GH que no es achacable al stress, y que también se puede prevenir pretrantando con suero anti-SS (193).

Para la MSH se ha postulado un efecto activador de GH, y el efecto contrario para lla LHRH (47) cuya especificidad y significado son por el momento dudosos.

## 14. OTROS NEUROPEPTIDOS.

### 14.1 GASTRINA (GAS)

En los últimos años se han descubierto un buen número de péptidos localizados tanto en el cerebro como en el tracto gastrointestinal. Algunos de estos péptidos, como la GAS que hacía tiempo se conocía como hormona gastrointestinal, han sido encontrados hace poco en los tejidos del SNC.

La GAS, en su forma antral mas abundante, es un heptadecapéptido (gastrina-17), cuya actividad biológica se debe al tetrapéptido terminal con un grupo amino. Es de gran interés evolutivo y genético, mencionar que la secuencia central de la molécula de GAS es similar a la secuencia 29-35 de la GH humana, y que el tripéptido N-terminal es similar al TRH, por su parte el pentapéptido carboxi-terminal es idéntico al de la colecistokinina (CCK) (194).

En 1.975 Vanderhaeghen y cols. (195), aislaron en extractos cerebrales de varios vertebrados un nuevo péptido, que identificaron como GAS, por reaccionar con antisueros dirigidos contra ella.

Un año después Dockaray (196) y el propio grupo de Vanderhaeghen, observaron que el nuevo péptido era el octapéptido carboxi-terminal de la colecistoquinina (CCK-8), que presenta reacción cruzada con muchos sueros anti-gastrina, debido a que el pentapéptido terminal de ambas hormonas, como ya hemos indicado, es igual.

Sin embargo, usando antisueros específicos para diferentes secuencias de la CCK y la GAS, la presencia de verdadera gastrina en el cerebro quedó demostrada (198). Poco después se la encontraba tam-

bién en nervios periféricos como el vago, y posiblemente en el núcleo vagal (199).

Parece que la GAS se encuentra en muy pequeñas cantidades en el cerebro, mientras que las concentraciones en hipotálamo e hipófisis son mas importantes (200,201). Dentro de estas localizaciones, la GAS se ha encontrado en los núcleos paraventricular y supraóptico (neuronas hipotálamo-hipofisarias) y en las células corticotropas, melanotropas y neuronas de la hipófisis (194,201). El péptido es contenido tanto por los cuerpos celulares como por los procesos terminales de las neuronas, apoyando la idea de que la GAS puede actuar como mensajero en el sistema nervioso (199).

Además, la GAS es sintetizada en la pituitaria. No es posible que la gastrina detectada en hipófisis provenga del plasma. Las concentraciones de GAS en hipófisis son del orden de 100-1.000 veces mayores que las plasmáticas, y, definitivamente, los péptidos precursores de la GAS, localizados en las pituitarias de los felinos, no están presentes en el plasma (194).

Las células corticotropas y melanotropas y las neuronas hipofisarias, contendrían por tanto el gen de la gastrina, que en su forma humana ha sido recientemente descubierto (202).

La GAS forma parte, por lo tanto de un sistema de múltiples señales, contenido en las células mencionadas, junto con ACTH,  $\beta$ -lipotropina, endorfina, MSH y oxitocina (194).

Una distribución tan diferenciada hace pensar que la GAS tendría una significación fisiológica. La GAS administrada i.c.v. induce rumiación en el carnero (203), e inyectada en el hipotálamo lateral provo-

ca la secreción ácida por el estómago de la rata, efecto que no se produce, si la GAS se administra i.c.v. (204,205), lo que hace pensar que hay funciones comportamentales que están mediadas centralmente por la GAS.

Poca información tenemos sin embargo sobre la influencia de la GAS en la secreción hipofisaria. El péptido inhibe los niveles de ACTH tanto "in vitro" com "in vivo", administrado i.c.v. (206); Utilizando la misma vía de administración, pero en ratas ovariectomizadas, la GAS suprime los niveles basales de LH, PRL y TSH, e incrementa los de GH. "In vitro" no ejerce efecto más que sobre la TSH, inhibiéndola ligeramente (207).

Estos resultados indicarían que la GAS puede modificar la secreción hormonal de la pituitaria a través de un mecanismo hipotalámico de acción en el caso de LH, PRL, GH y de un efecto tanto central como hipofisario en el caso de la TSH y ACTH. La relevancia fisiológica de éstas observaciones, sin embargo, aún no se ha aclarado.

#### 14.2 BOMBESINA

La bombesina es un tetradecapéptido que debe su nombre a haber sido aislado por primera vez en la piel de la rana bombina (208). Se la puede considerar el más representativo de una familia de péptidos representada al menos por 10 miembros, 8 de ellos aislados de la piel de anfibios (209) y 2 del tejido gástrico de cerdos y gallinas (210). Es un claro ejemplo de como el descubrimiento de un péptido en la piel de un anfibio, puede preceder y facilitar el descubrimiento de sus análogos en el tracto gastrointestinal y SNC de los mamíferos.

Los péptidos aislados del cerdo y gallina, de 27 aminoácidos ambos, se denominaron GRP (gastrin releasing péptide) por su capacidad de liberar gastrina del tracto intestinal. Pero sus similitudes en la secuencias de aminoácidos y en el extremo carboxi-terminal, hace que ambos deben ser reconocidos como miembros de la familia de péptidos de la bombesina, sugiriéndose además que estos péptidos no serían auténticas hormonas activas, sino precursores mas grandes, de las cuales se ecindirían péptidos mas pequeños que serían los encargados de actuar en las células diana (211). La totalidad del efecto biológico de la BBS, lo ejerce el nonapéptido carboxi-terminal.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica, RIA, y radioreceptores, ha quedado inequívocamente demostrado, que el cerebro de los vertebrados contiene tanto bombesina, como receptores específicos para ella.

Los estudios en ratas han encontrado que las concentraciones más altas de BBS se encuentran en hipotálamo, niveles intermedios en tálamo y estructuras centrales del cerebro y en mucha menor cuantía en corteza parietal hipocampo y médula. No se ha encontrado en cerebelo (212,213,214).

Analizando áreas mas pequeñas, se han encontrado las concentraciones mayores (>2 fmoles/mg proteína) en el núcleo arcuato hipotalámico, núcleo interpeduncular, sustancia gelatinosa del trigémino y en médula (215). En el hombre las concentraciones mayores también se encuentran en hipotálamo, y en sustancia gris periacueductal, núcleo acumbens, glomus pallidus y caudado (216).

La BBS se localiza subcelularmente en las vesículas sinápticas de las neuronas, de donde puede

además liberarse por un mecanismo  $Ca^{++}$  dependiente (217).

Las más altas concentraciones de receptores de BBS se encuentran en la zona anterior límbica, hipocampo, amígdala y en hipotálamo (218). Como se observa, no es estrictamente paralela la distribución cerebral de la BBS con la de sus receptores.

La BBS parece modular un gran número de funciones centrales. Resulta de hecho el péptido más eficaz en producir hipotermia en la rata administrado i.c.v., de forma dosis-dependiente y específica (219). Administrado también i.c.v. y dosis-dependiente reduce o bloquea completamente la secreción ácida gástrica y el vaciamiento gástrico (216), produce liberación de gastrina (220), e induce una marcada hiperglucemia (221). Su administración produce también una clara disminución de la ingesta, tanto de sólidos como de líquidos (222).

La BBS también parece tener un papel modulador sobre la secreción adenohipofisaria, si bien los datos son contradictorios. "In vivo" se ha notificado un efecto liberador de GH y PRL en ratas tratadas con estrógenos (223), y por contra una inhibición de la secreción de GH (220) y PRL (224,225) en ratas normales.

En cultivos AP de células normales, no se ha encontrado efecto alguno de la BBS sobre la secreción de GH y PRL, lo que induce a pensar en que la BBS pueda modular la secreción AP de GH y PRL a través de su acción en el SNC.

#### 14.3 GHRP (GH-RELEASING PEPTIDE)

El GHRRP-6 (His-D Trp-Ala-Trp-D Phe-NH<sub>2</sub>, (his, Lys 6) GHRP), es un hexapéptido sintético, desarro-

llado por programas de energía en relación a la conformación, síntesis, y test de actividad biológica (226).

El péptido libera GH tanto "in vivo" como "in vitro", y de manera específica, ya que dicha liberación no se acompaña de la de LH, FSH, TSH o PRL (227).

No parece ser especie-específico, ya que la liberación de GH se produce en ratas, monos, corderos, terneros, y en gallinas. Por el momento no se han efectuado estudios en el hombre, pero el hecho de que el péptido sea activo en el macaco resus, parece indicar esta posibilidad (227)

El GHRP es activo en ratas tanto en administración i.v., s.c. ó i.p.. Tras la inyección i.v., la elevación de los niveles de GH se produce ya a los dos minutos, y vuelven a la normalidad sobre las 2 horas (227). Su dinámica de respuesta es diferente al GRF, produciendo el máximo pico secretorio aproximadamente a los 15'.

La secreción de GH es mayor en ratas jóvenes que en adultas, y dentro de esta edad mayor en machos que en hembras, resultados que se invierten con la maduración sexual (228).

Tanto "in vivo" (59) como "in vitro" (229), resulta menos potente que el GRF para liberar GH, necesitándose mayores dosis de péptido para conseguir elevar los valores de la hormona hasta los niveles que lo hace a menor dosis el GRF.

En cultivo monocapa de células AP, su estímulo sobre GH es aditivo al de GRF incluso a dosis máxima, y sus condiciones idóneas de cultivo son diferentes a las del GRF (229), lo que habla claramente de recep-

tores específicos y diferentes mecanismos de liberación de GH.

Su administración continuada produce ganancia de peso en la rata (227), y un aumento considerable de las respuestas de GH al péptido (228). Sorprendentemente, una única inyección de GHRP produce una marcada disminución de esta respuesta, efecto que no puede explicarse además por la falta de "pool" liberable de GH, ya que el MRZ 2.549, un agonista opiáceo (el GHRP remeda una met-enkefalina), continúa liberando GH después de la inyección de GHRP (228).

En resumen, pensamos que el GHRP-6, como potente secretagogo de GH tanto "in vivo" como "in vitro", es un buen modelo para investigar sobre la función pituitaria, y que además puede tener en un futuro importantes aplicaciones, dado que en una amplia variedad de especies produce -vía acción pituitaria directa- ganancia de peso, añadiendo incluso, la facilidad y bajo coste de síntesis de un péptido de sólo 6 aminoácidos.

MATERIAL Y METODOS

## MATERIAL Y METODOS

Todos los experimentos se realizaron en ratas macho adultas de raza Wistar, entre 250 y 300 gr. de peso, (Pan-Lab, Barcelona), mantenidas en el animalario en condiciones constantes de luz, con un ciclo de 12 h. de luz y 12 h. de oscuridad (luz de 8 a.m. a 10 p.m.), y temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), con agua y comida a libre disposición.

### I. EXPERIMENTOS EN VIVO

#### a) Anestesia.

En los experimentos se han usado dos anestésicos diferentes: pentobarbital y xylazina-ketamina. Como anestésico de trabajo, cuando ha sido necesario desarrollar previamente a los experimentos alguna técnica, se ha usado por su mayor seguridad, duración del efecto anestésico y facilidad para la recuperación, la equitesina.

al.-Equitesina: La equitesina es un anestésico con varios componentes. Para una disolución de 100 ml las proporciones son las siguientes: 0.972 mg de pentobarbital sódico, disueltos en 11.5 ml. de alcohol de 96°, 4.25 gr. de hidrato de cloral, disueltos en 42.8 ml. de propilenglicol y 2.126 gr. de sulfato magnésico disueltos en 45.7 ml. de agua destilada.

Se mezclan las tres disoluciones y la disolución resultante se inyecta intraperitonealmente (i.p.) a razón de 0.4 ml. por 100 gr. de peso de la rata. Lo que da unas dosis de 40 mg/kg de pentobarbital, 170 mg/kg de hidrato de cloral y 85 mg/kg de sulfato magnésico.

a2.-Pentobarbital: Solución de pentobarbital sódico en agua destilada inyectando i.p. a dosis de 60 mg/kg.

a3.- Xilazina-ketamina: Es un anestésico de dos componentes. 42.5% de ketamina de 50 mg/ml (Ketolar, Parke-Davis, Morris Plains N.J., USA) y 20% de xilazina de 2 mg/ml (Rompún, Bayer Leverkusen, R.F.A.) mezcladas con un 37.5% de solución salina fisiológica. La disolución es inyectada i.p. a razón de 0.2 ml por 100 gr de peso, con lo que las dosis/kg son las siguientes: 2 mg/kg de ketamina y 5 mg/kg de xilazina.

b) Técnicas quirúrgicas.

Tres han sido las técnicas que se han tenido que realizar con anterioridad a la realización de los experimentos: canulación intracerebro-ventricular (i.c.v.), canulación aguda de la vena yugular y canulación crónica de la vena yugular.

b1.- Canulación intracerebro-ventricular (i.c.v.).

En la rata anestesiada con equitesina, se introdujo una cánula de polietileno (0.3 mm  $\phi$  externo, 0.15 mm  $\phi$  interno), en el ventrículo lateral izqdo de la rata siguiendo las coordenadas esterotáxicas del Atlas de König y Klippel (230), que en nuestro caso concreto fueron +0.2 mm anteroposterior y +1.5 mm lateral, tomando como referencia craneométrica el punto Bregma.

El extremo a introducir se corta en pico de flauta con un bisturí, y su borde inferior penetra 4 mm desde duramadre. Previamente hicimos un tope, dilatando la cánula con calor sobre una guía de acero, que quedó situado a 5 mm del extremo inferior.

Las cánulas fueron fijadas al cráneo por tornillo y cemento dental. Su correcta colocación se comprobó morfológicamente inyectando un colorante a través de las mismas, inmediatamente después de sacrificado el animal.

b2.- Canulación aguda de la vena yugular.

Una vez que se ha anestesiado el animal se fija en decúbito supino y se practica una incisión longitudinal en el tercio medio de la línea supraclavicular. Separando el tejido celular subcutáneo se expone la vena yugular en el punto en que cruza el músculo pectoral mayor. Se disecciona la vena del tejido subyacente y se colocan 2 ligaduras, una superior con la que se clampa la vena y otra inferior con la que se sujeta una cánula de silicona (Silastic, Dow Corning Co. Midland, Michigan, U.S.A.) de 0.4 mm de  $\phi$  exterior, y 0.25 mm de  $\phi$  interior, que se introduce intraatrialmente a través de un pequeño ojal practicado en la yugular. La sangre se hepariniza en este momento con una solución de heparina sódica al 10%

b3.- Canulación crónica de la vena yugular.

En la rata anestesiada con equitesina, se procede a canular la vena yugular como se ha descrito anteriormente, si bien la cánula en si no es igual. Solo el extremo que se introduce 3cm en la vena es de silicona, el resto de la cánula es de tubo de polietileno (1 mm  $\phi$  exterior, 0.5 mm  $\phi$  interior), más rígido que permite la fijación de la cánula al pectoral mediante un punto y no se colpasa al exteriorizar la cánula mediante un trayecto subcutáneo que termina en la línea media detras de las orejas.

El extremo libre de la cánula se hace pasar a través del cono de una jeringa de plástico que es fijado a la piel por dos puntos, y queda protegido

por un muelle de acero fijado a éste. Las cánulas se rellenan de una disolución de polivinil-pirrolidona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) al 40% en suero fisiológico para evitar la coagulación en su interior, y se sellan al calor. A partir del segundo día tras la operación, las cánulas son purgadas diariamente con suero salino, y vueltas a rellenas con la misma solución.

c) Cronología de los experimentos.

Todos los experimentos se desarrollaron siguiendo una misma sistemática, siempre por la mañana, comenzando aproximadamente a la misma hora (10 a.m.).

El protocolo que nosotros hemos seguido ha sido:

\* -45' anestesia

\* 0', primera extracción (basal), e inmediatamente después introducción de la/s sustancia/s que correspondan. A partir de aquí los tiempos de extracción fueron diferentes en el caso de los experimentos con GAS, o con BBS. En el caso de la gastrina se han tomado nuestras a 15', 30', y 60'y con la BBS a 5', 10', 15'y 30'.

En todos los casos, la cantidad de sangre que se ha extraído con jeringa estéril ha sido de 0.3 ml.

Los experimentos llevados a cabo en ratas sin anestesiar, constituyen lógicamente, una excepción a este protocolo. Sus diferencias se explicarán con detalle al describir cada experimento.

Una vez recogida la sangre fué inmediatamente centrifugada, y el plasma separado y guardado a -20° C hasta su análisis.

## II. EXPERIMENTOS "IN VITRO". CULTIVOS MONOCAPA DE CELULAS ADENOHIPOFISARIAS.

Tras decapitar los animales (10-15 por experimento aproximadamente) y en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar y con material esterilizado se sigue el siguiente protocolo:

1) Separación de la hipófisis anterior y posterior.

2) Las adenohipófisis se depositan en solución de Earle BBS (Gibco ltd, Paisley, Scotland, U.K.), desprovista de Ca y Mg., llamaremos a esta solución A.

3) Se cortan las adenohipófisis en pequeños trocitos con un bisturí y se suspenden en la solución anterior.

4) Centrifugación a 600 g. durante 5 minutos.

5) Se descarta el sobrenadante y el precipitado se vuelve a suspender en otra solución compuesta de 80 mg de colagenasa tipo IV, 40 mg de dispasa y 20 mg de hialuronidasa disueltos en una solución al 10% de Foetal Calf Serum (F.C.S.) (Gibco) en solución A. La llamaremos solución B.

6) Resuspensión cada 15 minutos con una pipeta de 1 ml del precipitado disuelto en la solución B durante 90 a 120 minutos.

7) Centrifugación a 500 g durante 5 minutos

8) Resuspensión del precipitado en 20 ml de la solución A.

9) Se vuelve a centrifugar a 500 g durante 5 minutos

10) Resuspensión (del precipitado anterior) en una nueva solución que llamaremos solución C, compuesta de medio esencial mínimo ( $\alpha$ -MEM, Gibco) con 10% de suero de rata, 2.5% de FCS y 1% de antibióticos: penicilina, estreptomina y fungizona, a un ph de 7.4. Las 15 pituitarias se resuspenden en 200 ml, lo que da una concentración aproximada de 40.000 cels/ml.

11) Se deposita 1 ml de la suspensión anterior en cada "pocillo" (1.67 cm<sup>2</sup> de superficie) del plato de cultivo (Linbro, Flow Lab. Inc., Mc. Lean, Virginia, U.S.A.).

12) Se colocan los platos en el incubador a 37° C, y con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 días.

13) Se aspira la solución C de cada pocillo, y se hacen 3 lavados consecutivos con Earle's BSS

14) Se deposita en cada pocillo 1 ml de una solución de  $\alpha$ -MEM, en la que previamente hemos disuelto las substancias a estudiar a las concentraciones deseadas.

15) Se vuelven a colocar los platos en la incubadora 2-3 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

16) La solución de cada pocillo es aspirada y depositada en un tubo de plástico, congelándose inmediatamente a -20° C hasta su análisis.

### III. RADIOINMUNOANALISIS (RIA).

#### 1.- RIA de la r GH.

La cuantificación de la GH de la rata se ha llevado a cabo utilizando un radioinmunoensayo con separación de las fracciones libre y unida, por el método del segundo anticuerpo.

El RIA consiste en la realización de una curva standard, 10 standards por duplicado, de valores comprendidos entre 0.25 y 125 ng/ml, que contenían una cantidad de suero de rata hipofisectomizada equivalente al utilizado en el suero de las ratas problema (generalmente 20 $\mu$ l). Tras esto se añaden 200  $\mu$ l del primer anticuerpo (NIADDK), a una dilución final 1: 10.000 y 20-30.000 cpm de GH 125 (ver apartado marcaje de hormona) por muestra.

Los sueros se dejan después de este paso incubando a temperatura ambiente durante 24 h., tras las cuales se añaden 100  $\mu$ l del segundo anticuerpo (anticuerpo anti IgG de mono (Nordick)), y se vuelven a incubar los sueros 24 horas en las mismas condiciones, pasadas las cuales se añade 1 ml de polietilenglicol (20%), y se centrifuga a 4.000 rpm durante 45'.

Tras aspirar el sobrenadante se añade 1 ml de solución salina fisiológica y se vuelve a centrifugar a 4.000 rpm durante otros 45'. El sobrenadante vuelve a aspirarse y el precipitado se cuenta en un contador gamma (LKB Wallac). Las concentraciones de rGH en las muestras problema, se han obtenido por lectura en un ordenador (LKB Wallac), utilizando el programa RIA calc.

## 2.- Marcaje de r GH.

La rGH fué iodada utilizando el método de la cloramina T. A efectos prácticos este método consiste en añadir a una alícuota de 5  $\mu\text{g}$  de rGH (suministrada por el NIADDK) 50  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato, 1 mc de I 125 (Amershan Lab., Buckingham-Shire, England), y 20  $\mu\text{l}$  de cloramina T (Sigma) a una concentración de 1mg/ml. Tras 25" se añaden 50  $\mu\text{l}$  de metabisulfito sódico a una concentración de 1 mg/ml. La purificación de la hormona así marcada se ha llevado a cabo en una columna de Sephadex G-50 (25 x 1.5 cm), utilizando un tampón barbital (0.05 M) para la elución de la hormona.

## IV. PEPTIDOS.

Durante los experimentos hemos usado los siguientes: Gastrina (Leu-gastrina, Sigma). Bombesina (Península Laboratories Inc., San Carlos, CA., USA). GHRH (GRF 1-29, Seronno, España). GHRP (Península).

## V. DESCRIPCION DE LOS EXPERIMENTOS.

### A. EXPERIMENTOS CON GASTRINA

#### A1. Experimentos "in vivo"

Experimento 1 : Efecto de la administración intravenosa de gastrina sobre la secreción de GH en la rata anestesiada con pentobarbital.

Una vez anestesiado el animal se procede a canular la vena yugular de forma aguda como se ha descrito. Un grupo de animales es inyectado a través de la misma vena con 5  $\mu$ gr de gastrina disueltos en un volumen de 0.3 ml de suero salino fisiológico. Otro grupo, control de este experimento, fué inyectado con 0.3 ml de suero salino. Se recogieron las muestras de sangre de la forma ya indicada.

Experimento 2 : Efecto de la administración i.c.v. de gastrina sobre la secreción de GH en la rata anestesiada con pentobarbital.

Una vez hecha la canulación i.c.v. siguiendo el procedimiento descrito, los animales se colocan en jaulas individuales y se dejan descansar 5-6 días. En el día del experimento se anestesian las ratas con pentobarbital. Un grupo es inyectado i.c.v. con 5  $\mu$ l de gastrina disueltos en 5  $\mu$ l de suero salino y otro grupo recibe i.c.v. 5  $\mu$ l de salino. Los tiempos de extracción son los ya indicados.

**Experimento 3 : Efecto de la administración i.c.v. de gastrina en la rata anestesiada con xilazina-ketamina.**

Protocolo similar al experimento 2 cambiando el anestésico empleado.

**Experimento 4 : Efecto de la administración i.c.v. de gastrina en la rata sin anestesiarse.**

Este experimento se ha realizado sobre 2 modelos diferentes:

- ratas decapitadas.
- ratas con canulación crónica de la vena yugular.

a) Ratas decapitadas.

Los animales son canulados i.c.v., depositados en cajas individuales y dejados descansar por 5-6 días. El día del experimento aproximadamente 1 hora antes de empezar el mismo, se sacan del estabulario, se llevan a una habitación tranquila, donde solo están el investigador y sus ayudantes y se las deja tranquilizarse y habituarse a su nuevo ambiente. 15 minutos antes de la hora en la que se procederá a la inyección de la sustancia correspondiente se coloca a cada animal una prolongación de tubo de polietileno del mismo grosor que la cánula i.c.v., que se conecta a la jeringa de Hamilton y se saca fuera de la caja, dejando nuevamente tranquilo al animal durante este tiempo para que se acostumbre al tubo.

En el tiempo 0', a los animales se les inyectaban 5  $\mu\text{g}$  de gastrina en 10  $\mu\text{l}$  de salino, o 10  $\mu\text{l}$  de salino como control, alternando siempre una rata con gastrina y un control. Todos los animales fueron inyectados a la misma hora en la misma habitación y en las mismas condiciones. Un grupo con su correspondiente control fué decapitado a los 15', otro a los 30' y otro a los 60'.

b) Ratas con canulación crónica de la vena yugular.

Unos 5 ó 6 días antes del experimento las ratas son canuladas i.c.v. y se les coloca además una cánula crónica en la vena yugular como hemos descrito previamente.

El procedimiento de manejo de los animales es similar al modelo anterior, salvo que antes de introducir la substancia correspondiente a través de la cánula i.c.v., se coloca un tubo prolongador en la cánula yugular a través del cual se realizan las extracciones de sangre mientras el animal se mueve libremente en su caja.

Se toma un valor basal (tiempo 0') tras el cual se inyectan 5  $\mu\text{g}$  de gastrina en 10  $\mu\text{l}$  de suero salino, o 10  $\mu\text{l}$  de salino como control, y se hacen extracciones sucesivas cada 20' durante 3 horas (20', 40', 60', 80', 100', 120', 140', 160 y 180'). El volumen de sangre obtenido de cada extracción era más pequeño que en los experimentos anteriores (200  $\mu\text{l}$ ).

Tras el experimento los animales se dejaban reposar durante una semana si volvían a ser utilizados, y en este caso cambiando la substancia que se introducía, esto es, la rata en que se había estudiado el efecto de la gastrina era inyectada con salino y a la inversa.

## A2. Experimento "in vitro".

**Experimento 6 : Efecto de la gastrina sobre la secreción basal de GH y estimulada por el GRF 1-29 en cultivos monocapa de células adenohipofisarias.**

Una vez realizada la preparación de las células AP como se ha descrito, se dejaron 3 filas de pocillos como control, añadiéndose a las demás GAS sola (10 a la -5, 10 a la -6, 10 a la -7 M), GRF solo (10 a la -7, 10 a la -9, 10 a la -11 M) o bien GRF ( a las mismas concentraciones indicadas) más GAS (10 a la -5 M).

## B. EXPERIMENTOS CON BBS.

### B1. Experimentos "in vivo".

todos ellos realizados en ratas anestesiadas con pentobarbital.

**Experimento 1 : Efecto de la BBS sobre la secreción basal de GH.**

Una vez anestesiados los animales, se procede a la canulación de la vena yugular como se ha indicado. Los animales se dividen en dos grupos. Uno de ellos recibe 25 $\mu$ g de BBS disueltos en 300 $\mu$ l de salino y el otro un volumen similar de salino.

**Experimento 2 : Efecto de la BBS sobre la secreción basal de GH, en la rata pretratada con Estrógenos (E2).**

El protocolo del experimento es idéntico al anterior, pero los animales habían sido tratados 3

días antes con 250  $\mu\text{g}$  s.c. de Estradiol (Proginon, Schering Co., U.S.A.). Dosis a la cual los E2 manifiestan con certeza actividad biológica (231,232).

**Experimento 3 : Efecto de la BBS sobre la secreción de GH estimulada por el GRF 1-29.**

Tras proceder a la anestesia y canulación de vena yugular, dividimos a los animales en 2 grupos. El primero recibe un bolo de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de GRF disuelto en 250  $\mu\text{l}$  de salino, y el segundo grupo 2 bolos, uno de igual dosis de GRF e inmediatamente después 100 $\mu\text{g}$  de BBS disueltos en 300 $\mu\text{l}$  de salino.

**Experimento 4 : Efecto de la BBS sobre la secreción de GH inducida por el GHRP-6.**

Se procede como en el experimento anterior, pero los dos grupos son diferentes. Uno recibe 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  de GHRP disuelto en 300 $\mu\text{l}$  de salino, y el otro un bolo similar de GHRP, seguido inmediatamente de 100 $\mu\text{g}$  de BBS disueltos en 300 $\mu\text{l}$  de suero salino.

**Experimento 5 : Efecto de la BBS sobre la secreción de GH inducida por GRF 1-29, en la rata tratada con Dexametasona (Dex).**

Los tratamientos con Dexametasona (Fortecortin, Merck, España) se han realizado de manera aguda y crónica. La actividad biológica de la Dex a las dosis empleadas, está previamente documentada (233).

5a). Tres horas antes del experimento se inyectan los animales con Dex i.p. a dosis de 4 mg/kg. Los

grupos y dosis de GRF y BBS son idénticos a los usados en el experimento 3.

5b). Los animales fueron divididos en los mismos grupos y dosis que en 5a), pero fueron pretratados con 1mgr/kg i.p. de Dex diario durante 21 días. Dado que las condiciones de vida de estos animales no son idénticas a las ratas del experimento 3, pensamos que ambos valores no son comparables, y realizamos un control interno del experimento, inyectando durante 21 días otros dos grupos de animales con suero salino (0.1 ml i.p.), que recibieron las mismas dosis de GRF y BBS que los animales problema.

**Experimento 6 : Efecto de la BBS sobre la secreción de GH inducida por GHRP-6, en la rata tratada con Dex.**

6a). Los grupos y las sustancias y dosis son los mismos del experimento 4. El pretratamiento con Dex idéntico al del 5a).

6b). Los animales bebieron durante 15 días agua con Dex disuelta (4mg/litro). Se dividieron los animales en 2 grupos uno de los cuales recibe GHRP 10 $\mu$ g/rata (aprox. 25 $\mu$ g/kg) y el otro GHRP a la misma dosis e inmediatamente otro bolo de BBS 100 $\mu$ g/rata. Se realizó un control interno de este experimento con ratas sin tratar a las que se administró 10 $\mu$ g/rata de GHRP.

**Experimento 7 : Efecto de la BBS sobre la secreción de GH estimulada por GRF en la rata pretratada con estrógenos (E2).**

También en este caso se han realizado tratamientos agudos y crónicos.

7a). Los animales reciben un pretratamiento con 250  $\mu\text{g}$  de estradiol s.c. 3 días antes del experimento. Los grupos y dosis son los mismos que en el experimento 3.

7b). Los animales fueron tratados con 250  $\mu\text{g}$  s.c. de estradiol cada 3 días, durante 15 días. Los mismos grupos y dosis que en el experimento 3.

**Experimento 8 : Efecto de la BBS sobre la secreción de GH estimulada por GHRP-6, en la rata pretratada con E2.**

8a). El pretratamiento es el mismo del experimento 7a. Los grupos y dosis los mismos que el experimento 4.

8b). Pretratamiento idéntico al experimento 7b. Los mismos grupos y dosis del experimento 4.

**Experimento 9 : Efecto de la BBS sobre la secreción de GH estimulada por GRF 1-29, en la rata pretratada con triiodotironina (T3).**

Los animales de este experimento, fueron previamente tratados durante 5 días, con 75 $\mu\text{g}$  s.c. de T3 (Sigma), preparada como se describe: Se realiza una disolución con 5 mg de T3 y 150 $\mu\text{g}$  de NaOH 2M, añadiendo a continuación agua destilada hasta un volumen total de 2 ml de disolución.

La T3 a las dosis usadas por nosotros, tiene con certeza actividad biológica (234,235).

Los grupos y dosis de este ensayo son los mismos que los del experimento 3.

**Experimento 10 : Efecto de la administración previa de anticuerpos anti-somatostatina (Ac. anti SS), sobre la secreción de GH inducida por GRF 1-29 en la rata pretratada con Dex.**

El anticuerpo para la realización de este experimento ha sido cedido por el Dr. F. Sanchez-Franco, del Dpto de Endocrinología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Tiene una especificidad del 100% contra la SS-14 con una reacción de cruce del 20% contra SS-28. Está desarrollado inyectando al conejo SS-14 unida a tiroglobulina bobina mediante el método del glutaraldehído (comunicación personal del Dr. Sánchez Franco).

Los animales de este experimento se dividieron en dos grupos:

1) Este grupo de ratas se inyectó 3 horas antes del experimento con Dex i.p. a dosis de 4 mg/kg. Una hora antes del comienzo del ensayo, con las ratas ya canuladas y anestesiadas se les inyecta por la cánula yugular 0.5 ml por rata de suero de conejo conteniendo el Ac anti SS. Pasada la hora se administra 1µg/kg de GRF disuelto en 250 µl de salino.

2) El mismo procedimiento que el grupo anterior, pero inyectando 3 horas antes suero salino i.p. en lugar de la Dex.

## B2. Experimento "in vitro".

Experimento 11 : Efecto de la BBS sobre la secreción basal y estimulada por el GRF 1-29 de GH en cultivos monocapa de células AP.

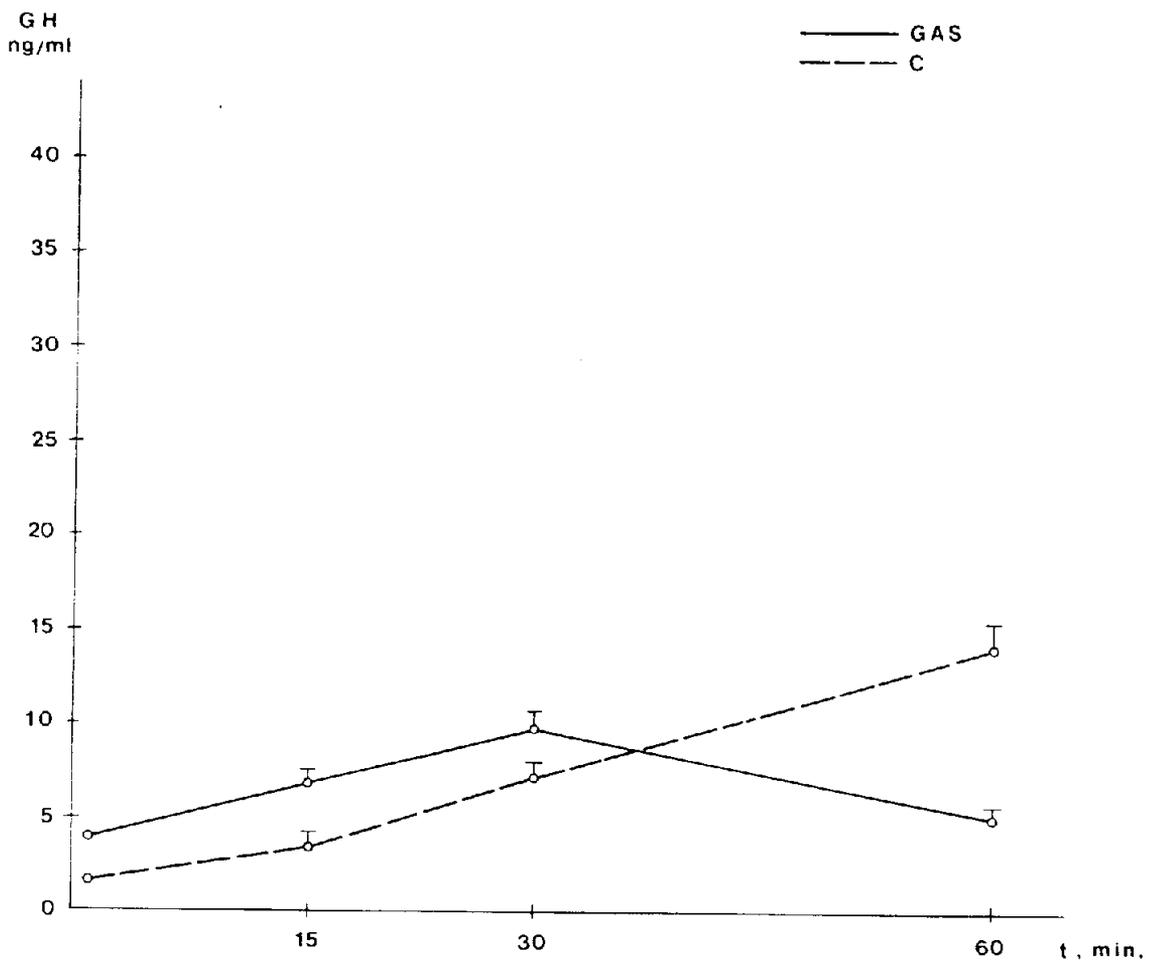
Realizada la preparación de células AP como hemos descrito, se dejan 3 filas de pocillos como control, añadiéndose a las demás, diversas concentraciones de BBS (10 a la -10M, 10 a la -9M, 10 a la -8M, 10 a la -7M, 10 a la -6M) o estas mismas concentraciones de BBS con la adicción de GRF (10 a la -9M).

## V. ESTADISTICA.

El tratamiento estadístico de los datos se ha realizado en la Cátedra de Medicina Preventiva y Social de nuestra Facultad, bajo la dirección del Dr. Juan Ramón Lacalle Remigio.

Para la evaluación de las diferencias estadísticas entre los grupos, se ha aplicado la T de Student para datos no apareados, previa realización de un análisis de la varianza. Para la realización de estos cálculos se ha usado el programa estadístico SSPS/PC, en los ordenadores del servicio informático de esta Cátedra.

## RESULTADOS



Graf. 1

## RESULTADOS

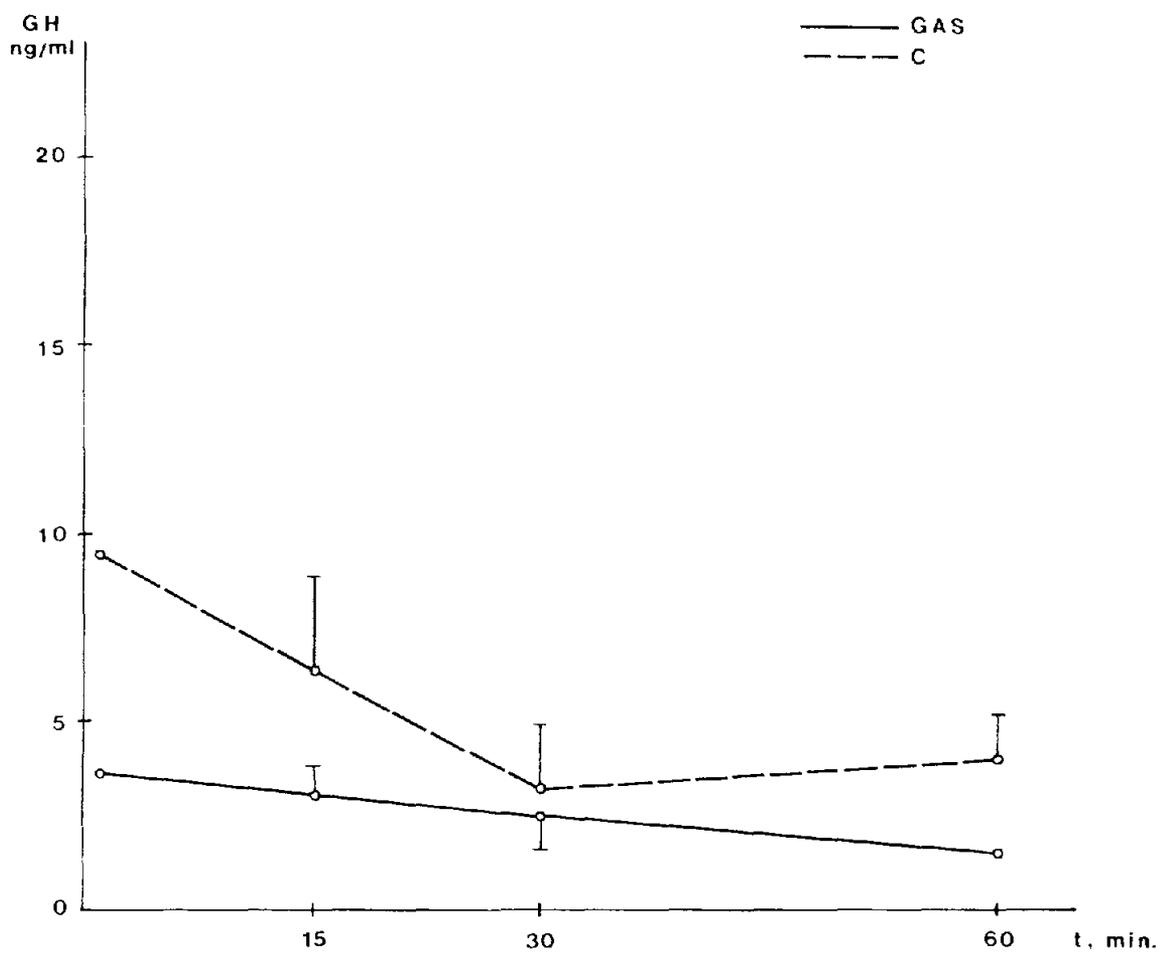
En todos los casos los puntos de las gráficas se representan como media  $\pm$ SEM. El número de animales empleado por experimento, se expresa como (n= ).

### GRAFICA 1

Efecto de la administración i.v. de Gastrina, sobre la secreción de GH, en la rata anestesiada con pentobarbital.

Comparamos un grupo de ratas (n=8) inyectado con 5  $\mu$ g de GAS i.v., con otro al que se le inyectó suero salino (n=7).

No se observan diferencias significativas entre los dos grupos.



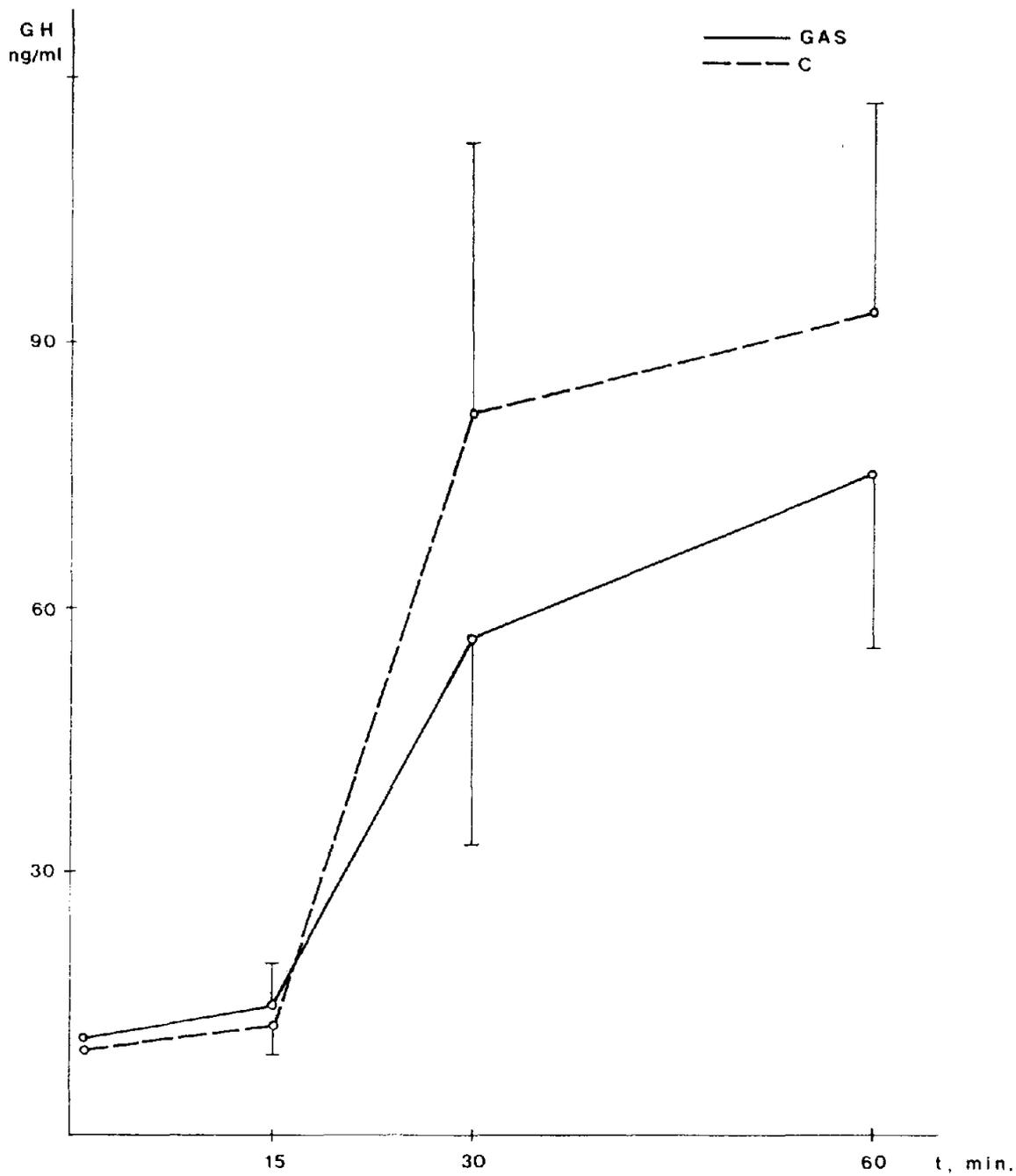
Graf. 2

## GRAFICA 2

Efecto de la administración i.c.v. de Gastrina, sobre la secreción de GH, en la rata anestesiada con pentobarbital.

Comparamos un grupo de ratas inyectado i.c.v. con 5  $\mu$ g de GAS (n=11) con otro al que se inyectaron i.c.v. 5  $\mu$ l de suero salino (n=9).

No hay diferencias significativas entre los dos grupos.



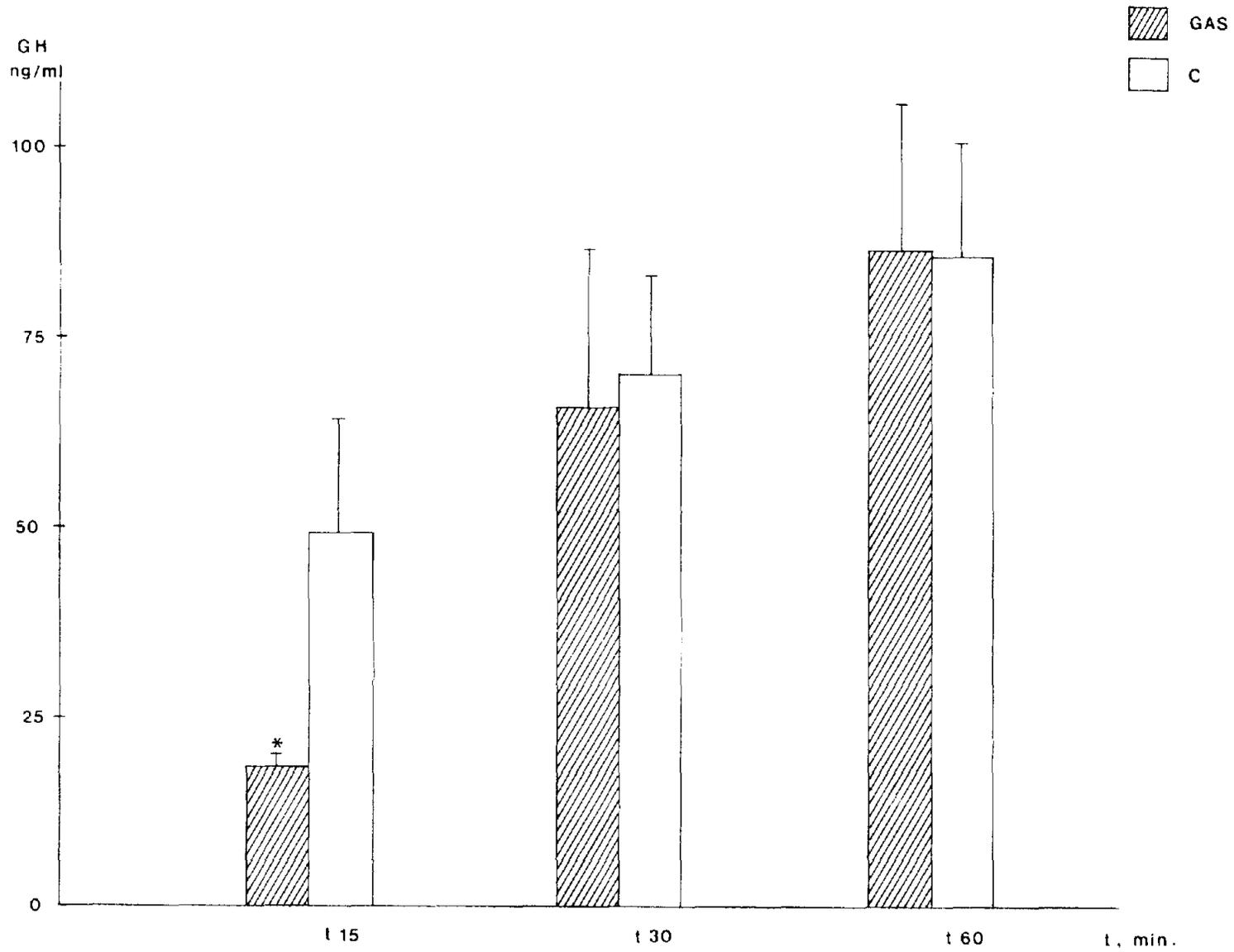
Graf. 3

### GRAFICA 3

Efecto de la administración i.c.v. de Gastrina, sobre la secreción de GH, en la rata anestesiada con xilazina-ketamina.

Comparación entre un grupo de animales que ha recibido 5  $\mu$ g de GAS i.c.v. (n=11) con otro que se inyectó i.c.v. con 5  $\mu$ l de salino (n=6).

Se produce un pulso en el tiempo esperado, pero no hay diferencias entre ambos grupos ni antes de producirse el pico (t0' - t15' ), ni después con las ratas pulsando.



Graf. 4

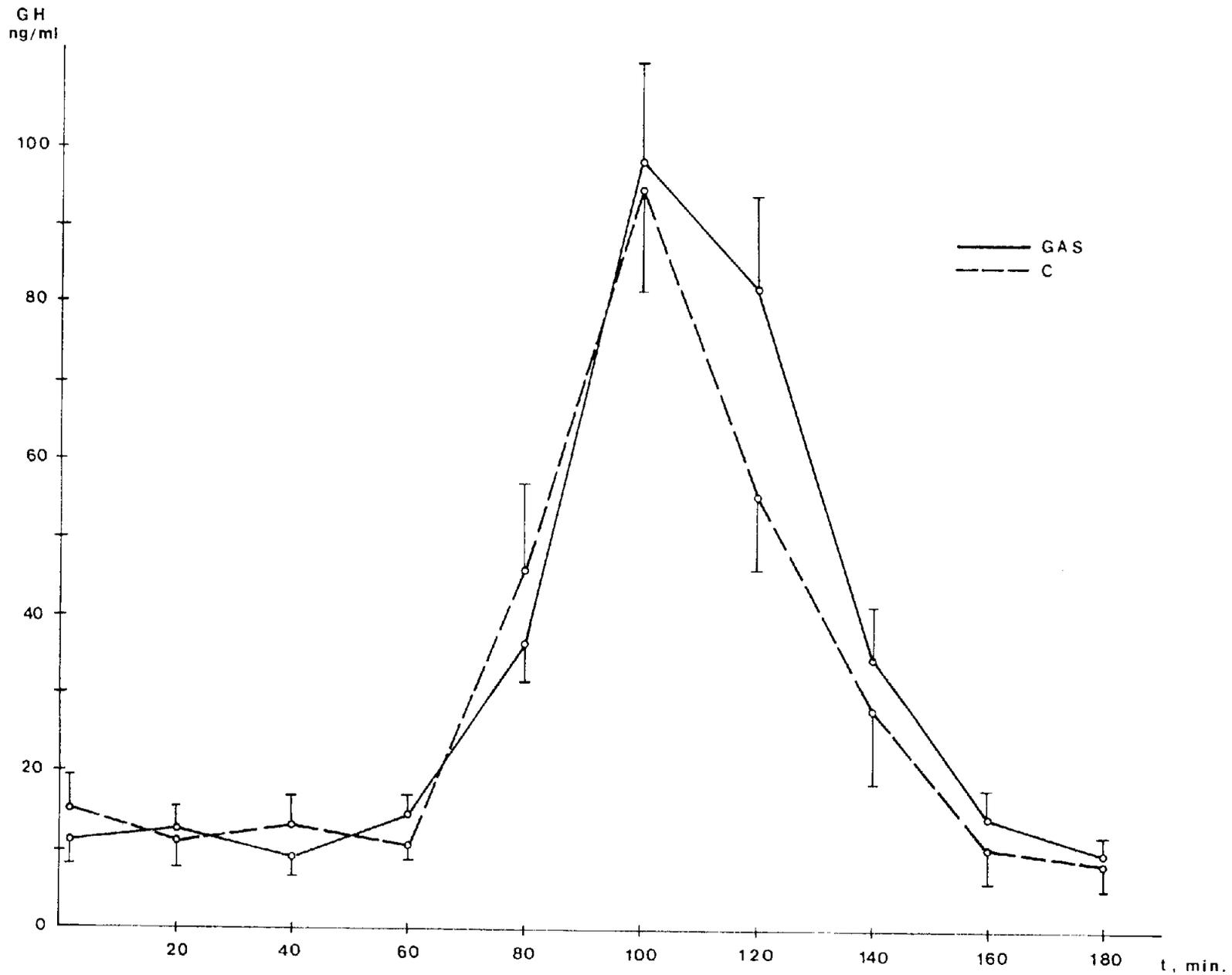
#### GRAFICA 4

Efecto de la administración i.c.v. de Gastrina, sobre la secreción de GH, en la rata sin anestesia. (Modelo de ratas decapitadas).

Comparación entre un grupo de ratas (n=7) inyectadas i.c.v. con 5  $\mu$ g de GAS disueltos en 10  $\mu$ l de suero fisiológico, y otro que recibió 10  $\mu$ l i.c.v. de suero salino (n=5).

Hay una diferencia significativa entre los dos grupos (18 $\pm$ 3 vs 49 $\pm$ 15 ng/ml media  $\pm$ sem) en el tiempo 15, al empezar los animales un pulso, que consideramos aleatoria (los dos grupos de animales empiezan un pico secretorio, y es posible que un grupo lo haga un poco antes que el otro. o que los valores del grupo control se eleven con más rapidez), ya que luego los valores se igualan, no apreciándose, más diferencias.

\* p<0.05.



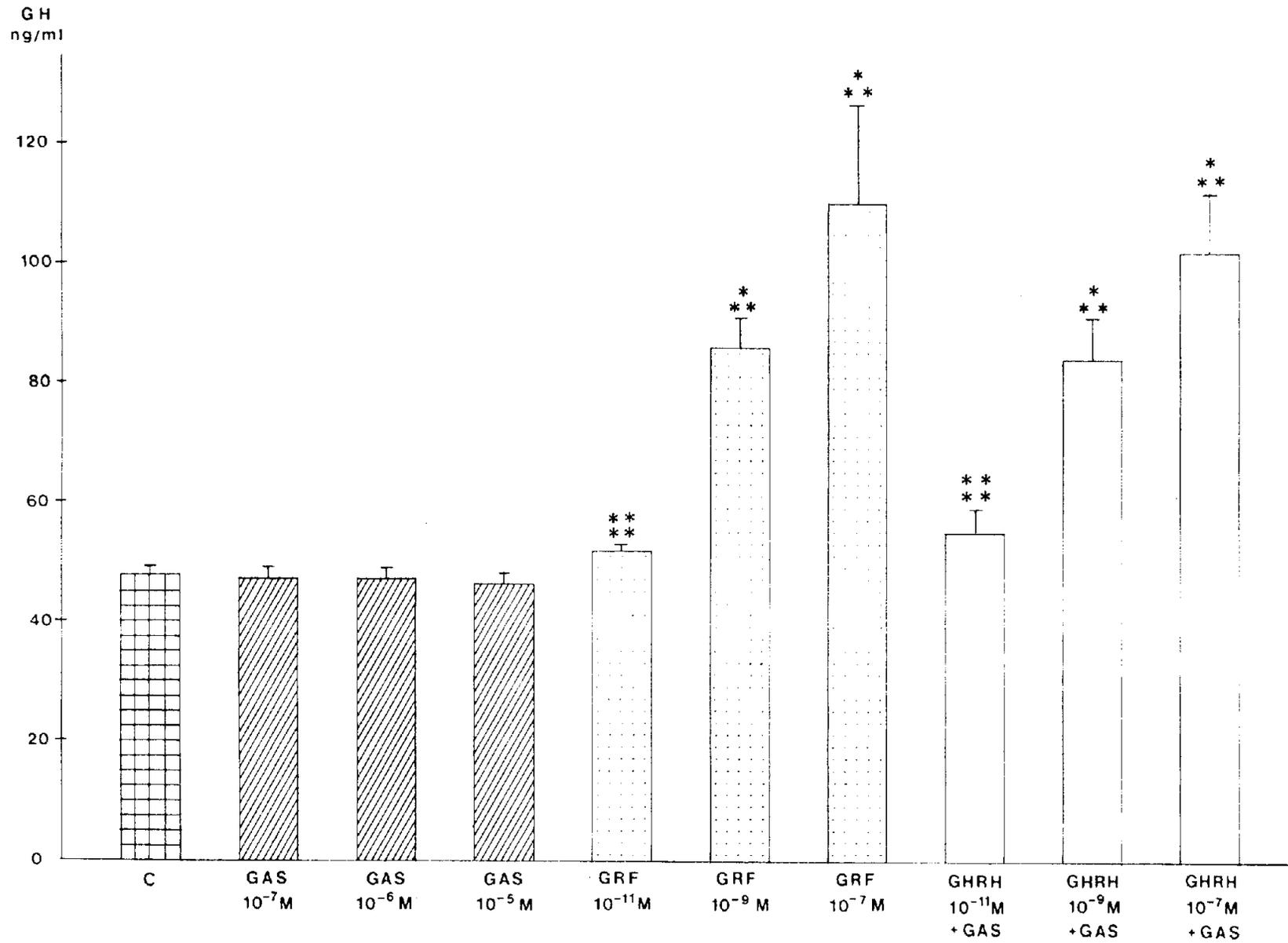
Graf. 5

### GRAFICA 5

Efecto de la administración i.c.v. de Gastrina, sobre la secreción de GH, en la rata sin anestesiar. (Animales en "freely moving").

Comparamos un grupo de animales, inyectado i.c.v. con 5  $\mu$ g de GAS, disueltos en 10  $\mu$ l de salino, (n=10) con otro grupo que recibió una inyección similar de 10  $\mu$ l de salino (n=6).

No se observan diferencias entre los dos grupos en ningún punto de la curva, ni antes ni durante el pulso.



Graf. 6

## GRAFICA 6

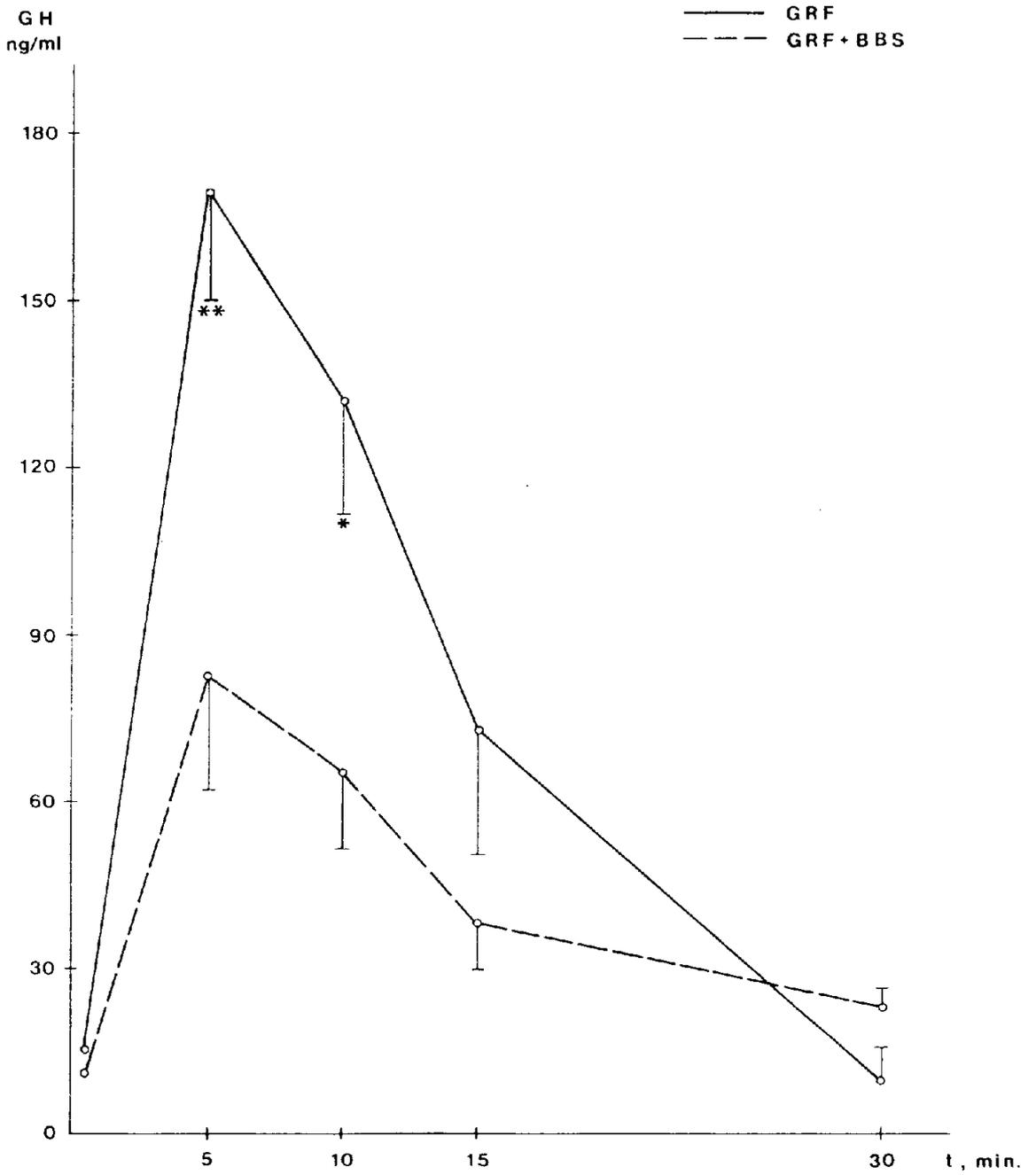
**Efecto de la administración de Gastrina, sobre la secreción basal y estimulada por GRF de GH, en cultivo monocapa de células adenohipofisarias.**

Comparamos la adición a los pocillos de cultivo de GAS (10 a la -7M, 10 a la -6M, 10 a la -5M), GRF (10 a la -11M, 10 a la -9M, 10 a la -7M), o estas mismas concentraciones de GRF + GAS (10 a la -5M).

No hay diferencias entre el control y los pocillos con gastrina. Tampoco las hay entre el GRF sólo, o éste más gastrina. El GRF estimula la secreción de GH en forma dosis dependiente ( $59 \pm 1$  vs  $47 \pm 0.1$ ;  $84 \pm 8$  vs  $47 \pm 0.1$ ;  $112 \pm 11$  vs  $47 \pm 0.1$  ng/ml media  $\pm$ sem, respectivamente para 10 a la -71, 10 a la -9 y 10 a la -7M).

\*\*\*  $p < 0.01$

\*\*\*\* $p < 0.001$



Graf 7

### GRAFICA 7

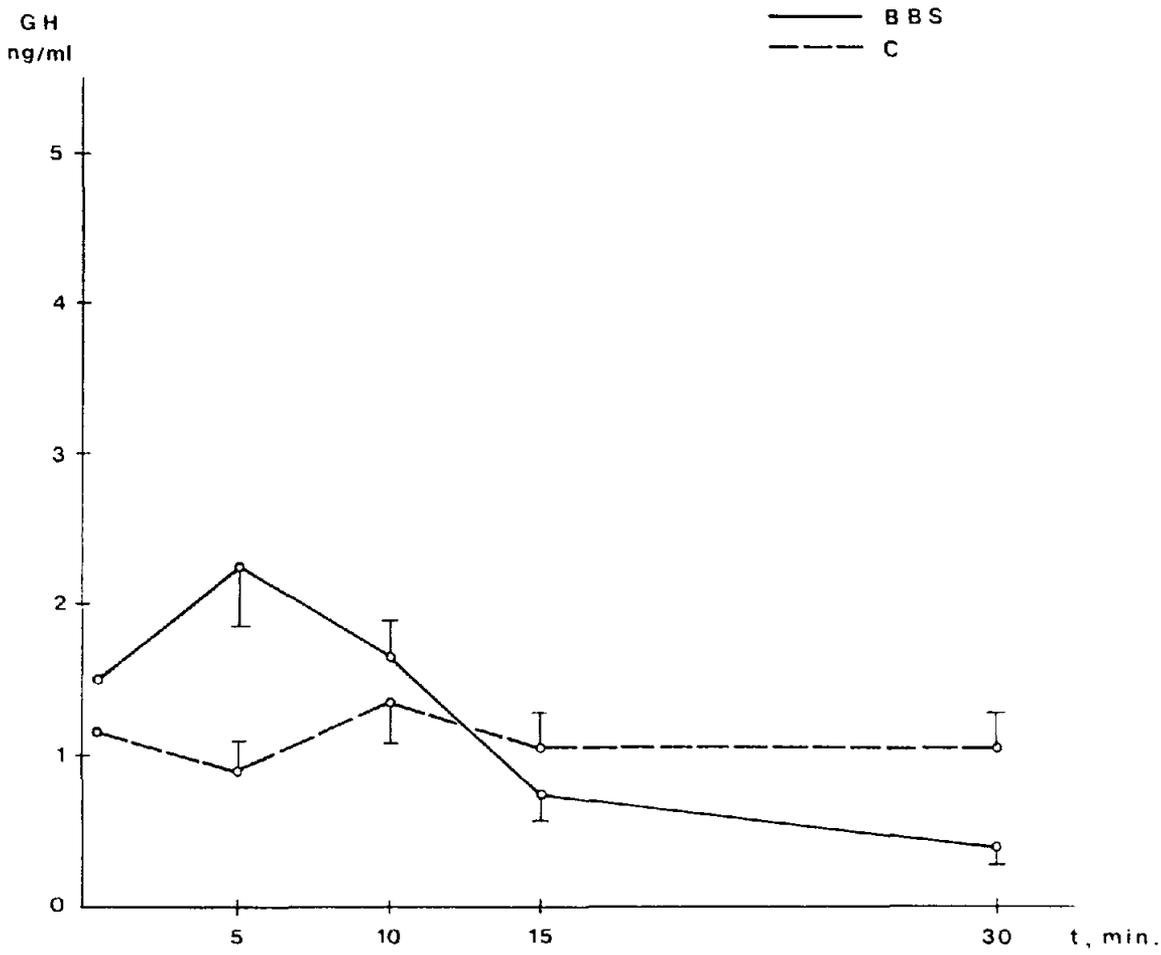
**Efecto de la administración de BBS sobre la secreción de GH inducida por GRF.**

Comparamos un grupo de ratas que se inyectó i.v. con 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de GRF, (n=9) con otro al que se inyectó esta misma dosis de GRF, mas 100  $\mu\text{g}/\text{rata}$  de BBS (n=5).

Observamos que la BBS produce una significativa inhibición de la respuesta al GRF en los tiempos 5' (168 $\pm$ 18 vs 83 $\pm$ 20 ng/ml media $\pm$ sem) y 10' (132 $\pm$ 20 vs 64 $\pm$ 15 ng/ml media $\pm$ sem).

\*p<0.05

\*\*p<0.02



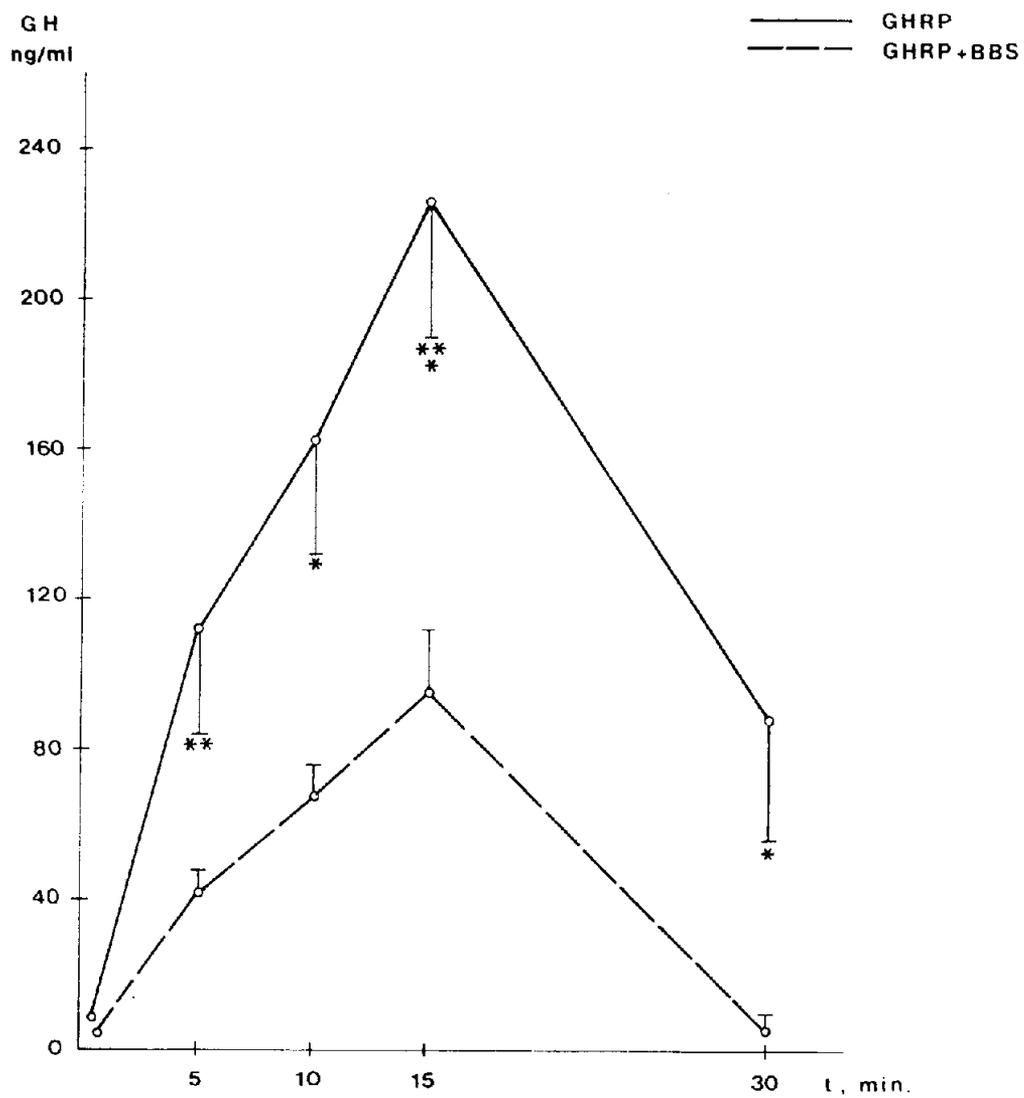
Graf. 8

### GRAFICA 8

**Efecto de la administración de BBS sobre la secreción basal de GH.**

Comparamos un grupo de animales inyectado con 25  $\mu\text{g}$ /rata i.v. de BBS, (n=6), con otro al que se inyectó salino (n=7).

Observamos una progresiva disminución de los valores de GH a partir del tiempo 10' en los animales a los que se había administrado BBS, pero las diferencias no son significativas.



Graf. 9

### GRAFICA 9

**Efecto de la administración de BBS sobre la secreción de GH inducida por GHRP.**

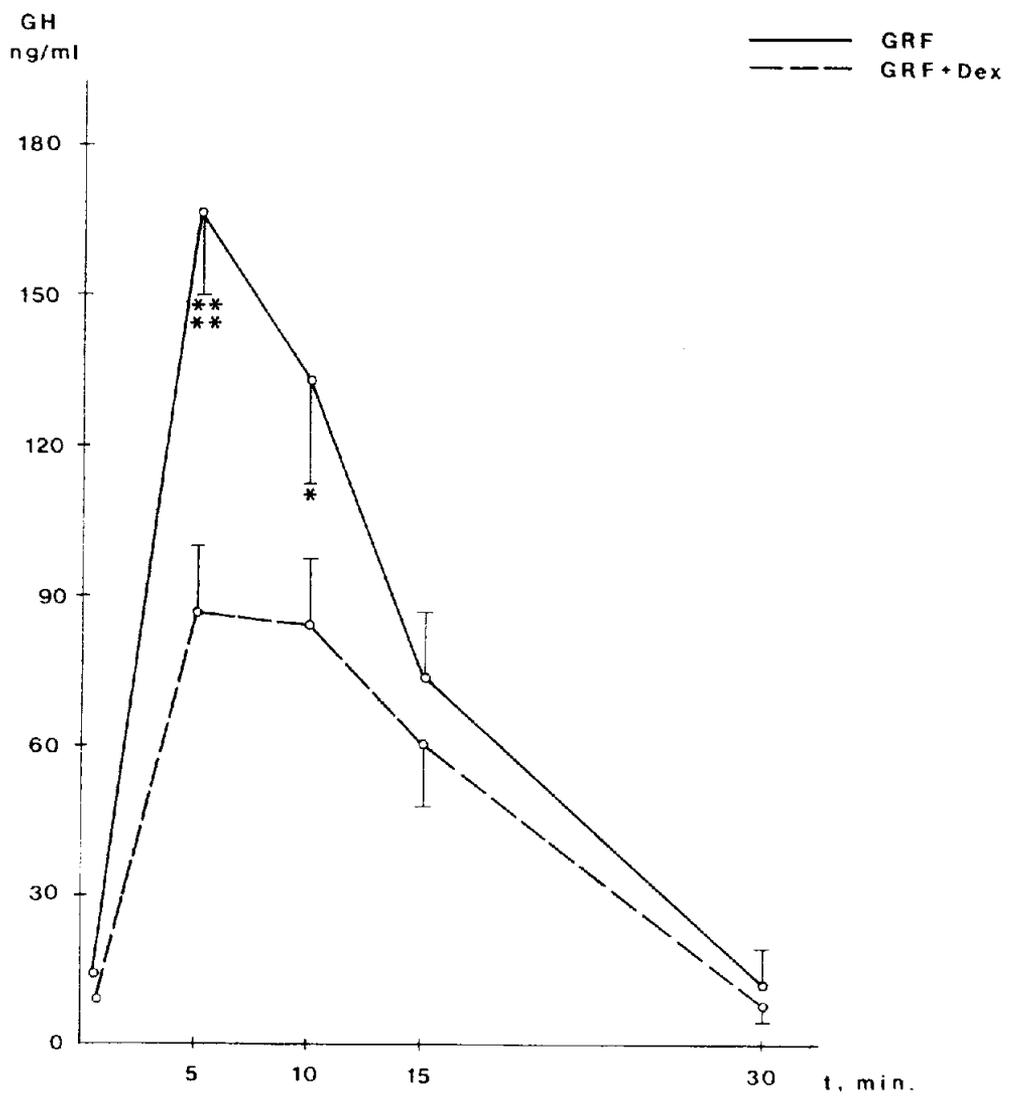
Se compara un grupo de ratas que recibe 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GHRP (n=14), con otro grupo (n=7), que recibe ésta misma dosis de GHRP, más 100 $\mu\text{g}/\text{rata}$  de BBS.

Observamos una inhibición significativa del estímulo del GHRP sobre la secreción de GH, en las ratas que habían recibido BBS, a lo largo de toda la curva: tiempo 5' (112 $\pm$ 7 vs 41 $\pm$ 5 ng/ml media  $\pm$ sem); tiempo 10' (162 $\pm$ 28 vs 67 $\pm$ 8 ng/ml, media $\pm$ sem); tiempo 15' (226 $\pm$ 31 vs 96 $\pm$ 10 ng/ml media $\pm$ sem); tiempo 30' (89 $\pm$ 28 vs 6 $\pm$ 1 ng/ml media $\pm$ sem).

\* p<0.05

\*\*p<0.02

\*\*\*p<0.01



Graf. 10

### GRAFICA 10

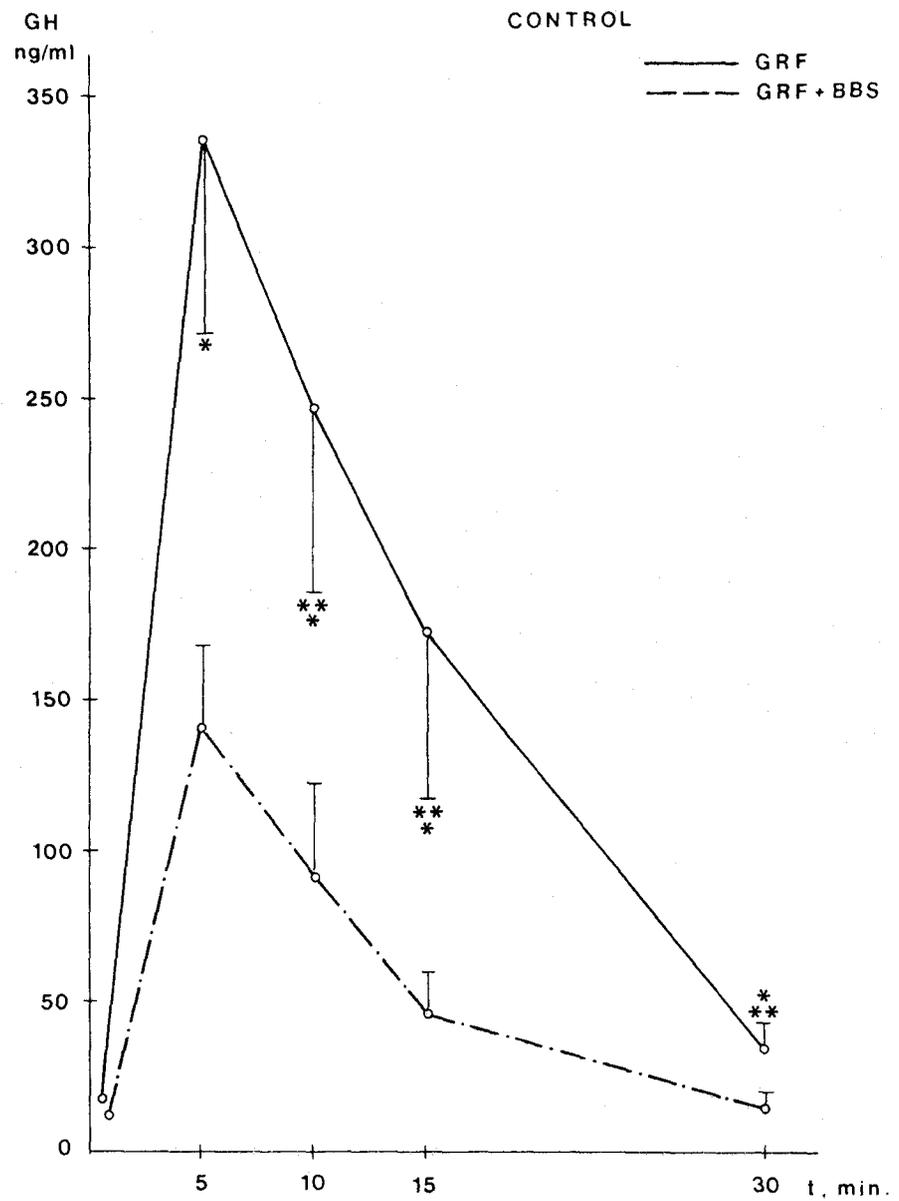
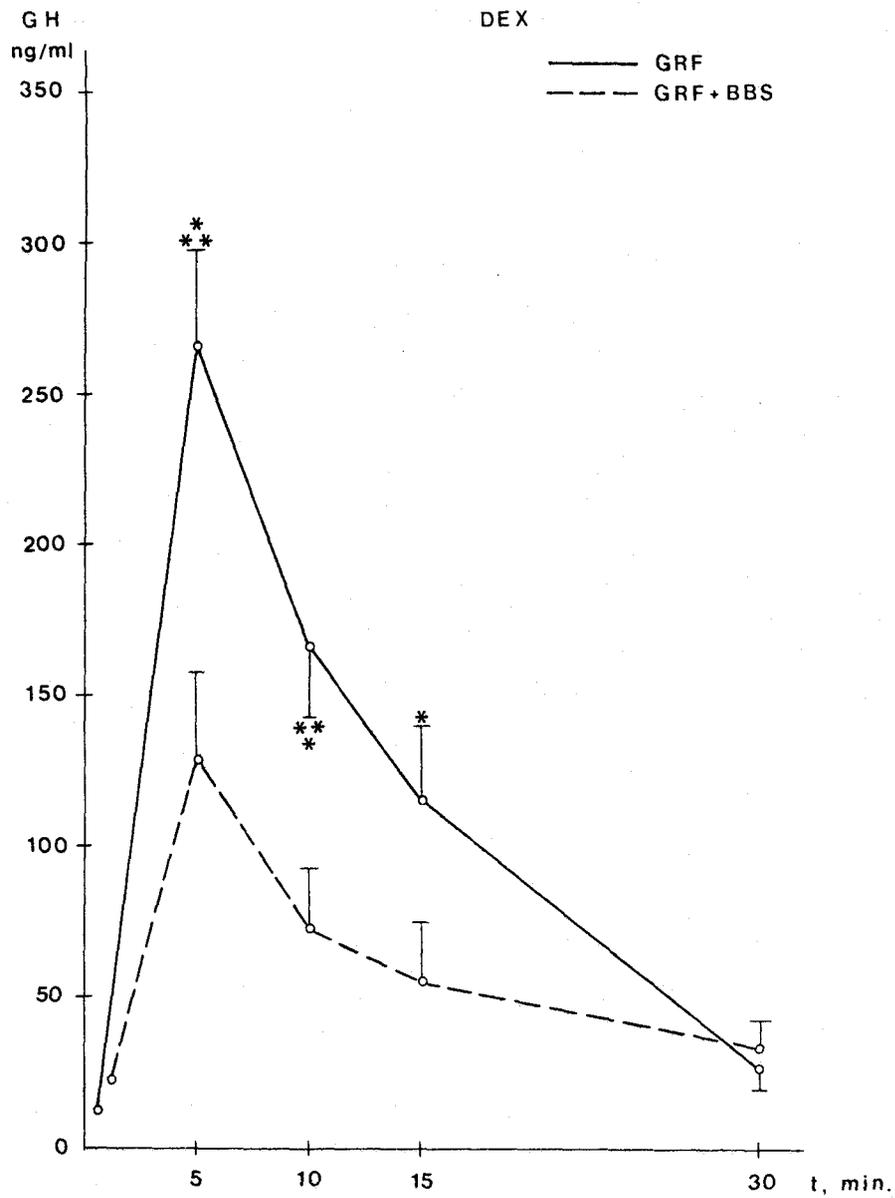
**Efecto del tratamiento agudo con Dexametasona sobre la secreción de GH estimulada por GRF.**

Comparamos dos grupos de ratas, uno al que se administra 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GRF (n=9), y otro que recibe igual dosis de GRF, pero tratado previamente con 4 mg/kg i.p. de Dex. 3 horas antes.

Observamos una inhibición de la respuesta al GRF, en las ratas tratadas con Dex. Tiempo 5' (168 $\pm$ 18 vs 86 $\pm$ 11), tiempo 10' (132 $\pm$ 20 vs 82 $\pm$ 11).

\* p<0.05

\*\*\*\* p<0.001



Graf. 11

### GRAFICA 11

Efecto de la administración crónica de Dex sobre la secreción de GH estimulada por GRF. Acción de la BBS en estas condiciones.

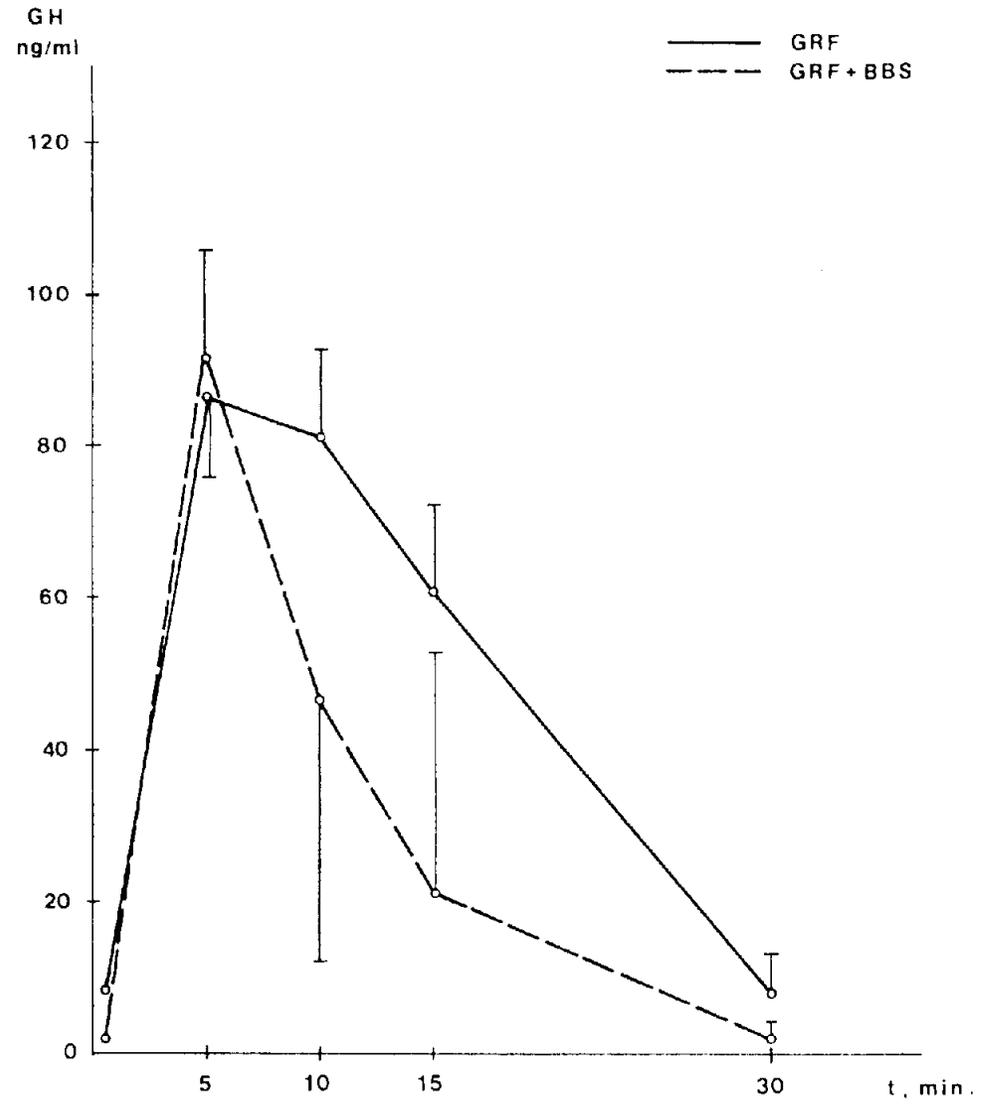
Comparamos cuatro grupos de animales. Dos de ellos recibieron durante 21 días una inyección diaria i.p. de 1 mg/kg de Dex, de estos dos grupos, uno recibe 1  $\mu$ g/kg i.v. de GRF (n=12), y otro la misma dosis de GRF mas 100 $\mu$ g/rata de BBS (n=9).

Los otros dos grupos, control interno del experimento, recibieron una inyección diaria de 100  $\mu$ l de salino durante 21 días, y se inyectaron con los mismos péptidos y a las mismas dosis que los grupos anteriores. (n=11, n=8, respectivamente).

No hay diferencias entre las secreciones de GH estimuladas por GRF, entre las ratas tratadas con Dex o con salino, y en ambos casos, la BBS inhibe esta secreción. En tiempo 5' (269 $\pm$ 30 vs 128 $\pm$ 31 ng/ml, media $\pm$ sem) , para el grupo inyectado con Dex.; 335 $\pm$ 64 vs 139 $\pm$ 26 ng/ml media $\pm$ sem en los inyectados con salino.

\* p<0.05

\*\*\* p<0.01



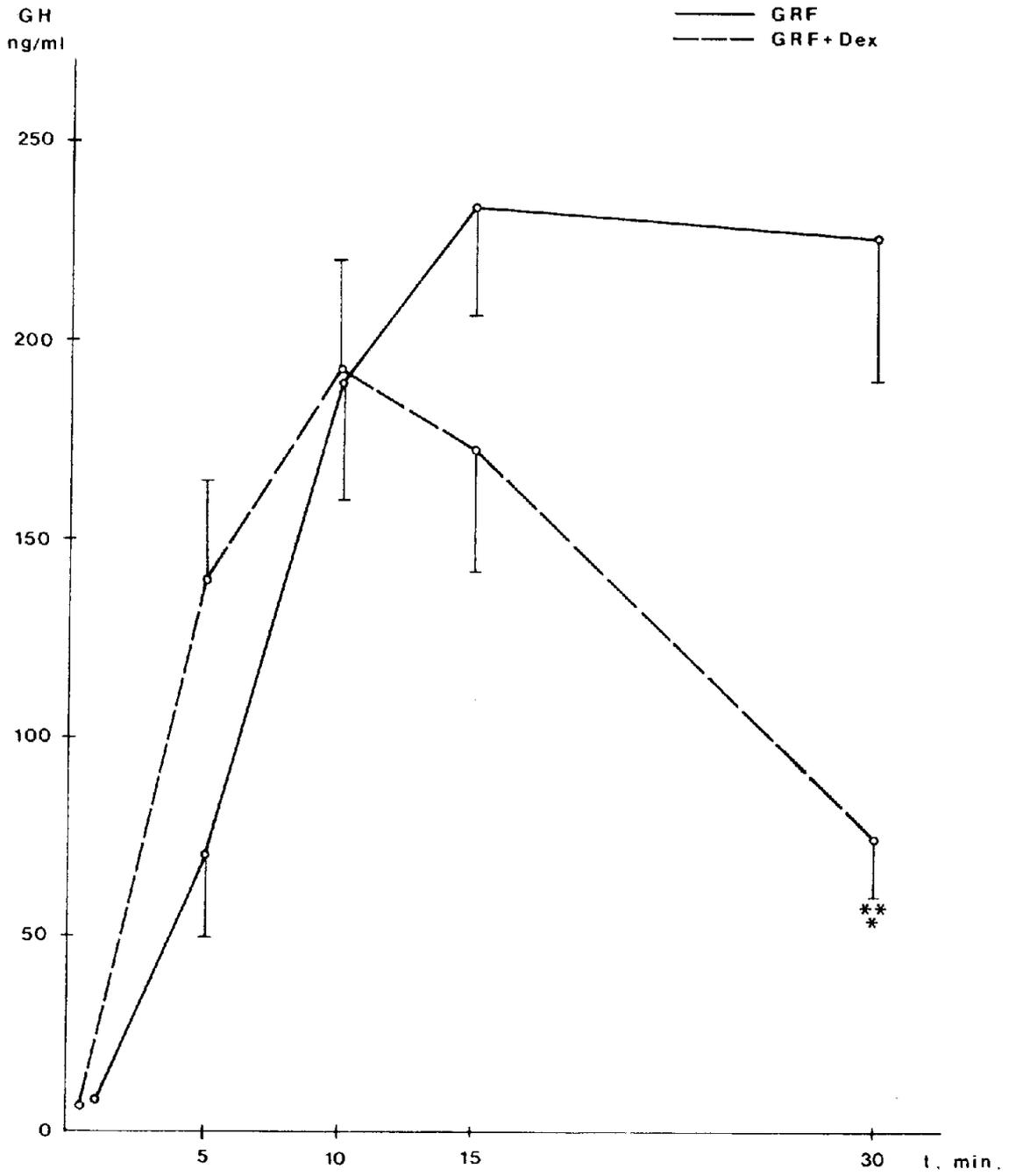
Graf. 12

## GRAFICA 12

Efecto de la BBS sobre la secreción de GH inducida por GRF en la rata pretratada agudamente con Dex.

Comparamos un grupo de animales que fué inyectado con 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GRF (n=17), con otro, que recibió esta misma dosis de GRF, más 100  $\mu\text{g}/\text{rata}$  de BBS (n=5). Ambos grupos tratados 3 horas antes con 4 mg/kg i.p. de Dex.

No se observan diferencias en los valores de GH, entre los dos grupos.



Graf. 13

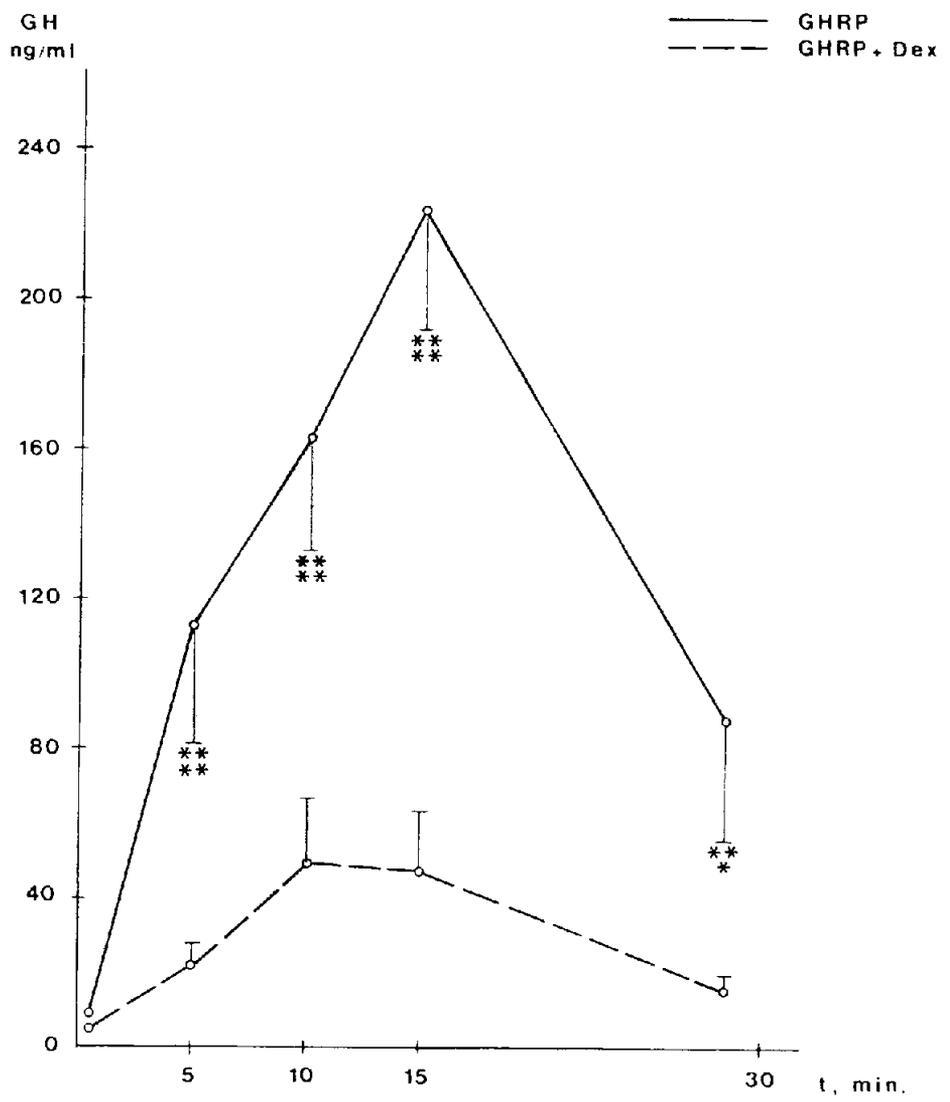
### GRAFICA 13

**Efecto de la administración previa de Ac-anti SS sobre la secreción de GH inducida por GRF en la rata pretratada agudamente con Dex.**

Comparamos un grupo de animales inyectado 3 horas antes del experimento con 4 mg/kg de Dex. i.p. (n=8), con otro al que se inyectó con 250  $\mu$ l de salino i.p., (n=5). Una hora antes del experimento se administra a todos los animales 0.5 ml i.v. de suero anti-SS, y en el momento indicado 1  $\mu$ g/kg i.v. de GRF.

No se observan diferencias en ambos grupos en los picos secretorios en respuesta al GRF, encontrando que ambos grupos son significativamente distintos en el tiempo 30' (226 $\pm$ 42 vs 74 $\pm$ 17 ng/ml mediatsem).

\*\*\*p<0.01



Graf. 14

#### GRAFICA 14

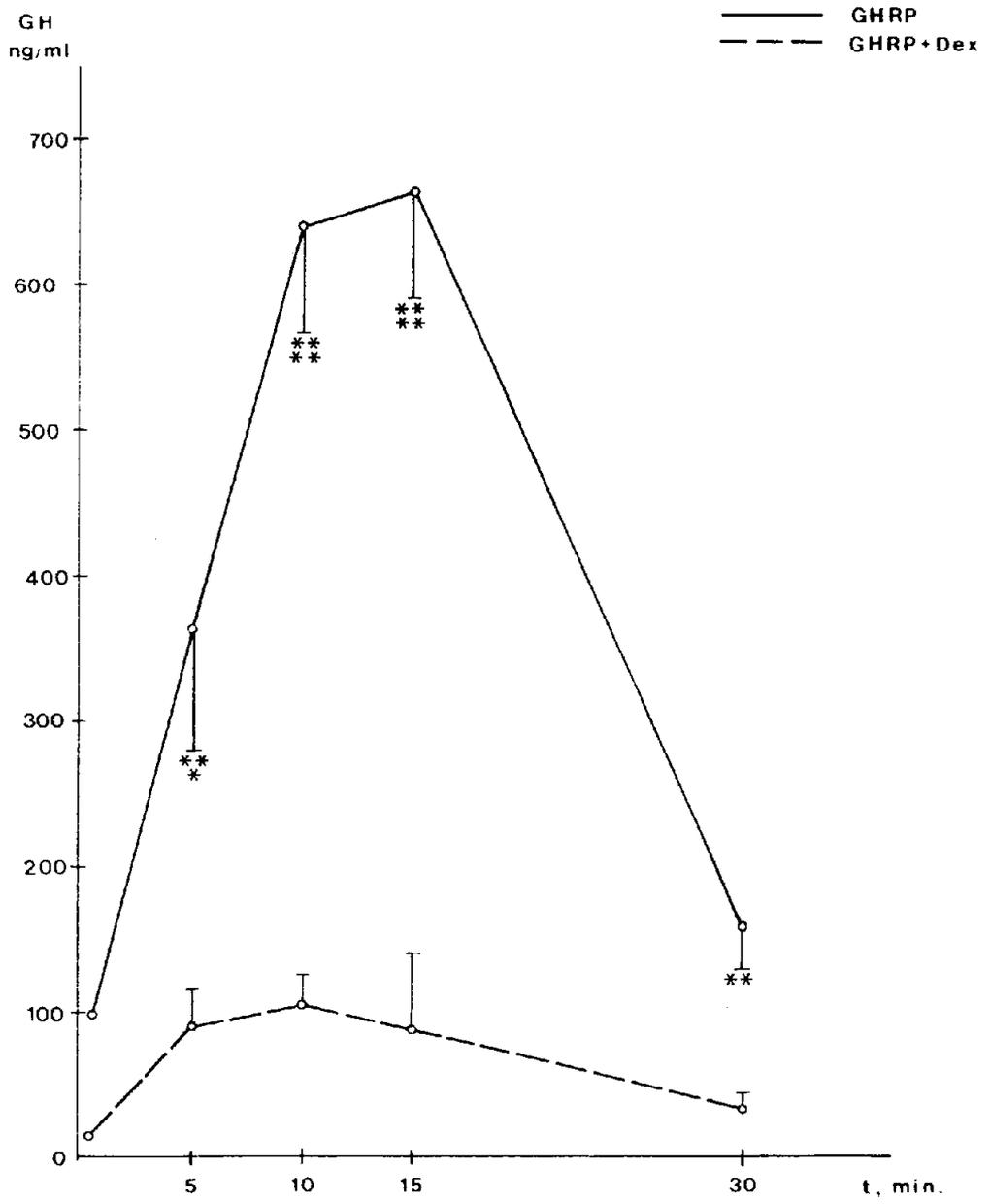
**Efecto del tratamiento agudo con Dex. en la secreción de GH inducida por GHRP.**

Comparamos un grupo de animales inyectado 3 horas antes con 4 mg/kg i.p. de Dex. (n=18) y otro que no tuvo pretratamiento (n=14). Ambos grupos de animales, reciben una inyección i.v. de 10 µg/kg de GHRP, en el momento del experimento.

Observamos que las ratas tratadas con Dex, presentan una inhibición de la secreción de GH a lo largo de toda la curva (112±17 vs 21±5; 162±28 vs 49±14; 226±31 vs 48±18; 89±28 vs 17±8 ng/ml media±sem) respectivamente para los tiempos 5', 10', 15', y 30'.

\*\*\* p<0.01

\*\*\*\* p<0.001



Graf. 15

## GRAFICA 15

**Efecto del tratamiento crónico con Dex. sobre la secreción de GH estimulada por GHRP.**

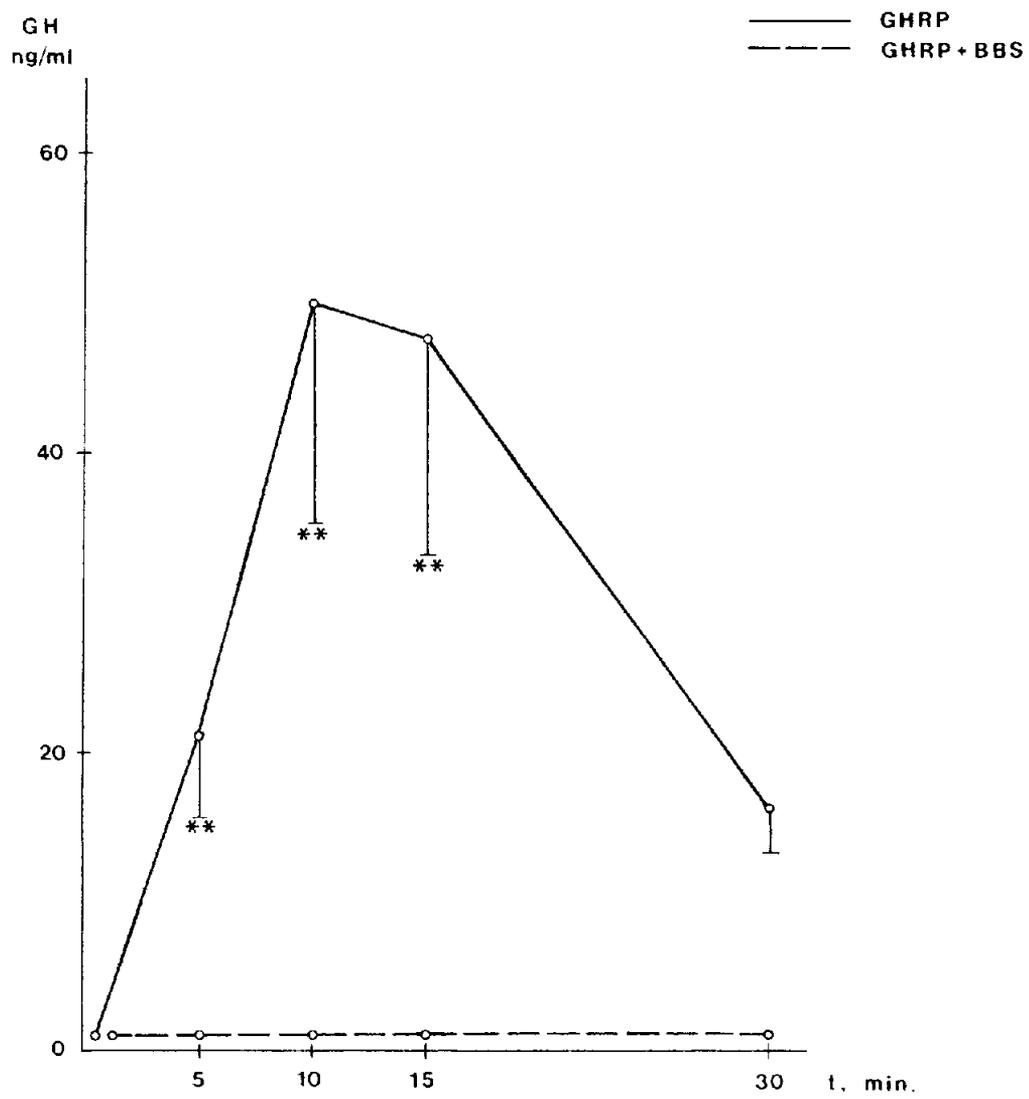
Comparamos un grupo de ratas (n=12), a las que se añadió 1 ampolla de 4 mg de Dex por litro en el agua de bebida durante 15 días, con otro grupo que no tuvo pretratamiento (n=11). Los dos grupos fueron inyectados i.v. con 10  $\mu$ g/rata de GHRP, en el momento del experimento.

Observamos en las ratas tratadas con Dex, una inhibición grande de la secreción de GH en todos los tiempos, respectivamente : 364 $\pm$ 72 vs 94 $\pm$ 15; 640 $\pm$ 62 vs 95 $\pm$ 13; 663 $\pm$ 61 vs 93 $\pm$ 17; y 157 $\pm$ 19 vs 40 $\pm$ 8 ng/ml media $\pm$ sem, en los tiempos 5', 10', 15'y 30'.

\*\* p<0.02

\*\*\* p<0.01

\*\*\*\* p<0.001



Graf. 16

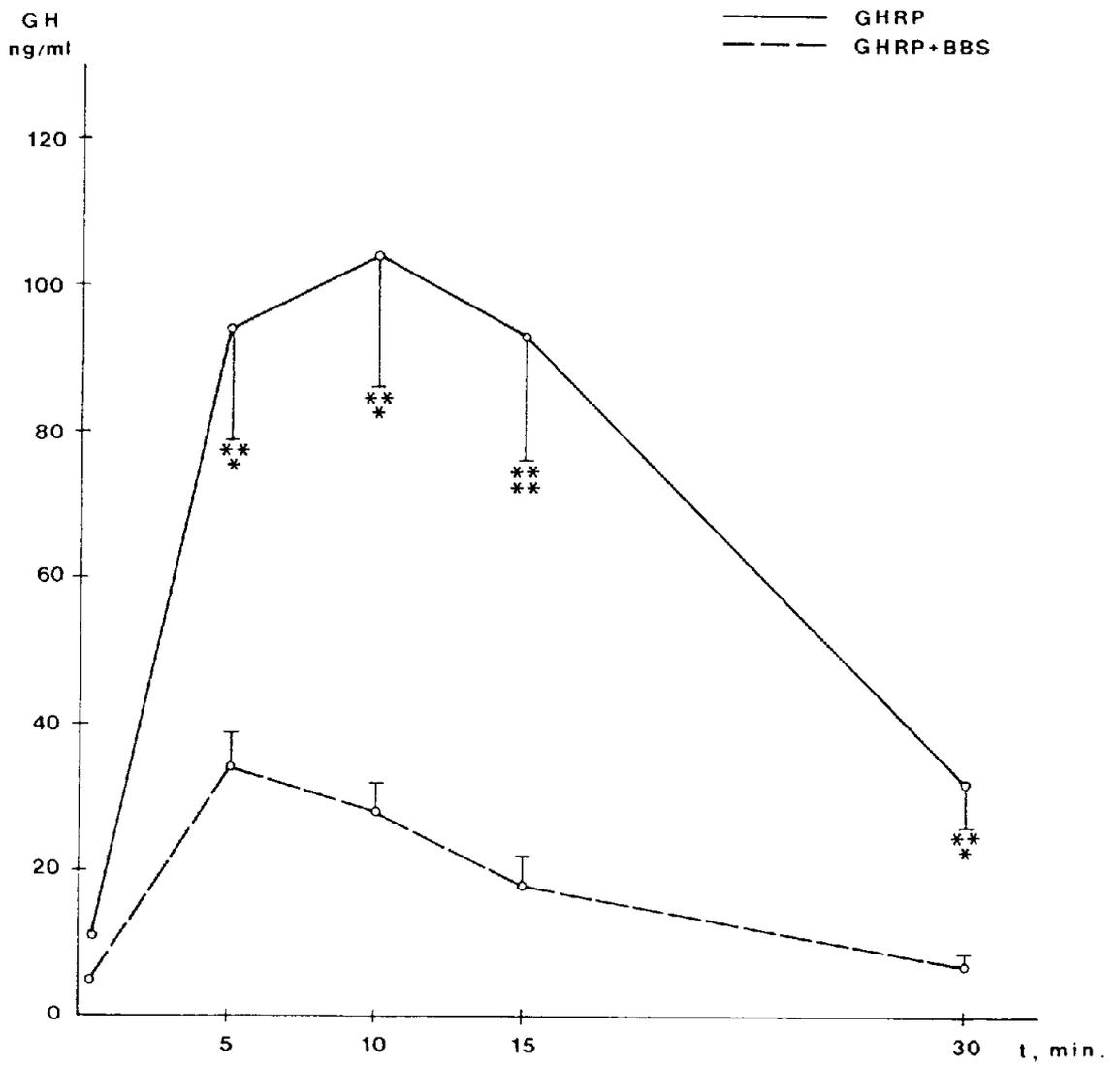
### GRAFICA 16

**Efecto de la administración de BBS sobre la secreción de GH estimulada por GHRP en la rata tratada agudamente con Dex.**

Los dos grupos de este experimento, fueron inyectados i.p. 3 horas antes con 4 mg/kg de Dex. Posteriormente un grupo (n=18) se trató con 10  $\mu$ g/kg i.v. de GHRP, y otro con esa dosis de GHRP más 100  $\mu$ g/rata de BBS (n=8).

Las ratas del segundo grupo presentan en todos los tiempos valores indetectables de GH (se les asigna la sensibilidad mínima del RIA: 1.5 ng/ml), con lo que la secreción de GH estimulada por GHRP es completamente inhibida por la BBS en estas condiciones.

\*\*  $p < 0.02$



Graf. 17

### GRAFICA 17

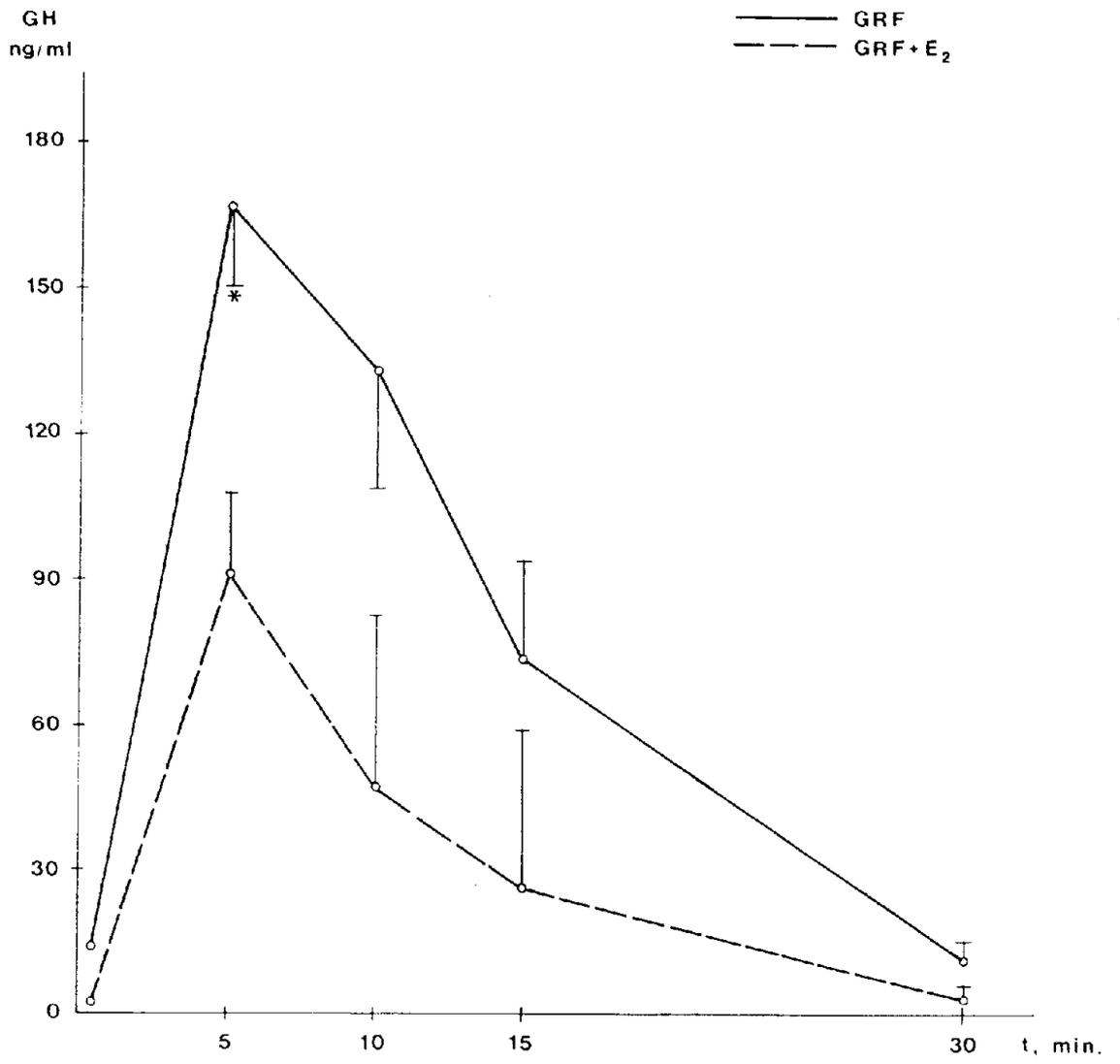
**Efecto de la BBS sobre la secreción de GH inducida por GHRP en la rata tratada crónicamente con Dex.**

Comparamos dos grupos de animales que durante 15 días habían bebido agua en la que se habían disuelto 4 mg Dex./litro. Uno de los grupos es inyectado con 10  $\mu$ g/rata i.v. de GHRP, y el otro con la misma dosis de GHRP más 100 $\mu$ g/rata de BBS. (n=12, n=7).

La secreción de GH estimulada por GHRP está inhibida a lo largo de toda la curva, en las ratas inyectadas con BBS. t 5': 94 $\pm$ 15 vs 34 $\pm$ 4; t 10': 104 $\pm$ 18 vs 28 $\pm$ 3; t 15': 93 $\pm$ 17 vs 18 $\pm$ 2; t 30': 32 $\pm$ 5 vs 8 $\pm$ 1, ng/ml, media $\pm$ sem.

\*\*\* p<0.01

\*\*\*\* p<0.001



Graf. 18

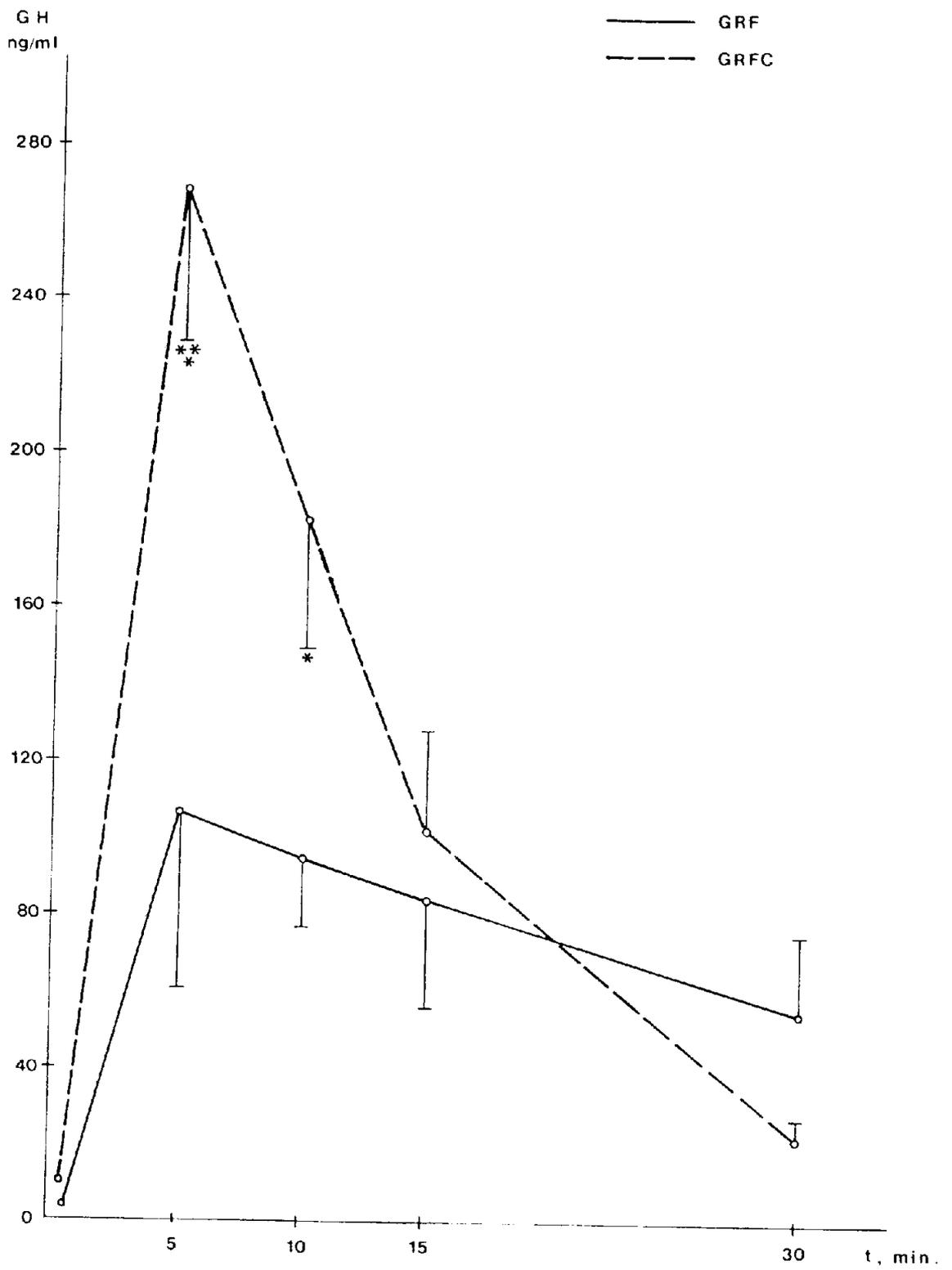
### GRAFICA 18

**Efecto del tratamiento agudo con E2 en la secreción de GH inducida por GRF.**

Comparamos un grupo de animales a los que se inyectó 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GRF (n=9) con otro grupo al que se inyectó la misma dosis de GRF, pero que había sido tratado 3 días antes con 250  $\mu\text{g}$  s.c. de Estradiol (n=8).

El pico secretorio de GH, estimulado por el GRF, está significativamente inhibido, en las ratas estrogenizadas (168 $\pm$ 18 vs 95 $\pm$ 22 ng/ml media $\pm$ sem).

\* p<0.05



Graf. 19

### GRAFICA 19

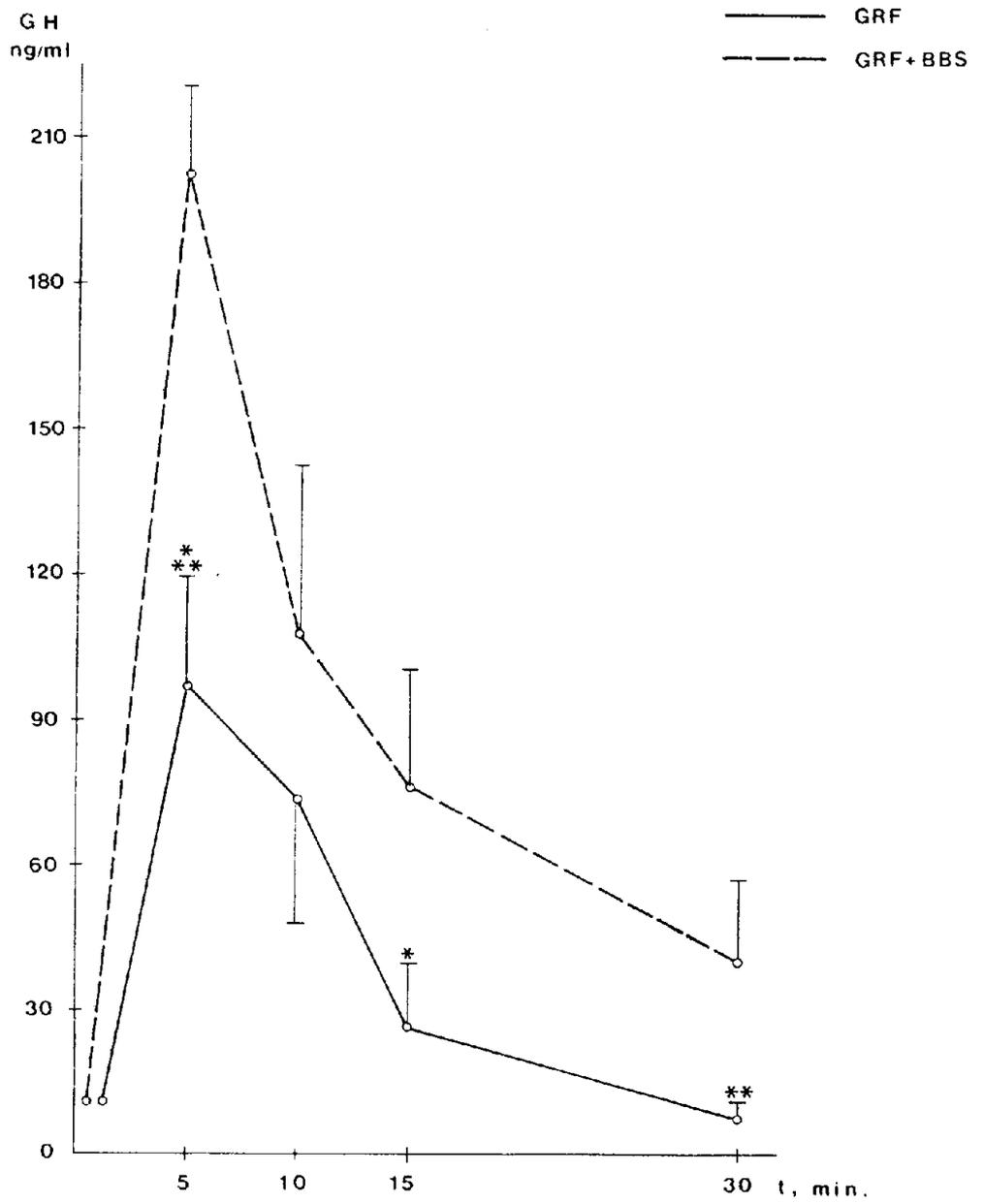
**Efecto de la administración crónica de E2 en la secreción de GH estimulada por el GRF.**

Comparamos un grupo de animales, a los que se inyectó 250  $\mu$ g s.c. de Estradiol cada 3 días durante 15 días (n=9), con otro grupo al que se inyectó 250  $\mu$ l de salino con el mismo protocolo (n=14). A ambos grupos se les administra en el experimento 1  $\mu$ g/kg i.v. de GRF.

Encontramos inhibida la secreción de GH estimulada por el GRF en los animales tratados con E2. Tiempo 5' (268 $\pm$ 151 vs 106 $\pm$ 44 ng/ml media $\pm$ sem) y 10' (183 $\pm$ 126 vs 95 $\pm$ 57 ng/ml media $\pm$ sem).

\* p<0.05

\*\*\* p<0.01



Graf. 20

## GRAFICA 20

**Efecto de la BBS sobre la secreción de GH estimulada por GRF, en ratas tratadas agudamente con estrógenos.**

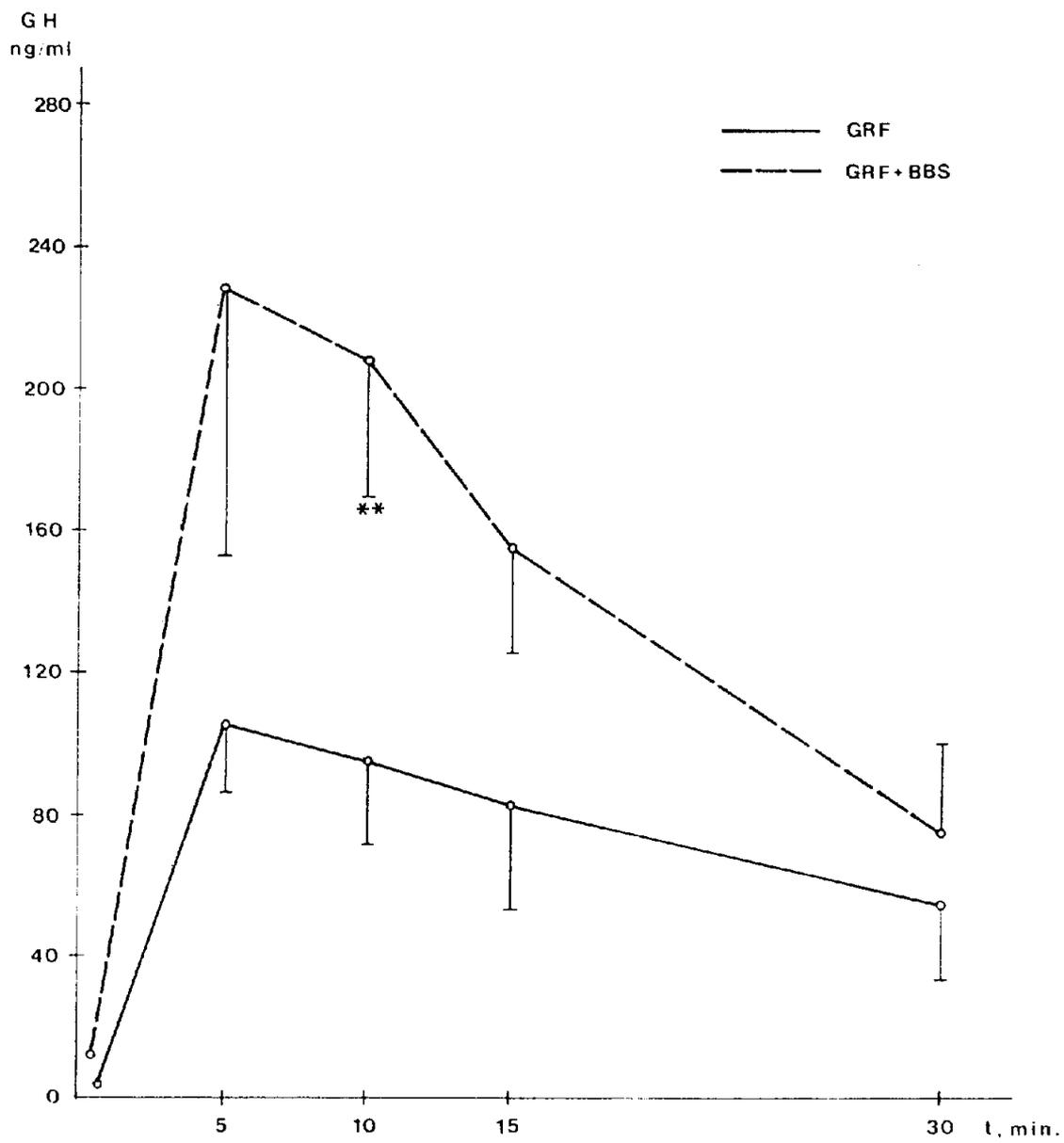
Comparamos dos grupos de ratas que han sido inyectadas 3 días antes con 250  $\mu\text{g}$  s.c. de Estradiol. Un grupo (n=8) es inyectado con 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GRF, y otro con la misma dosis de GRF más 100  $\mu\text{g}/\text{rata}$  de BBS (n=5).

Observamos una potenciación de la respuesta al GRF por la BBS en estas condiciones. En tiempo 5': 201 $\pm$ 17 vs 95 $\pm$ 22 ng/ml media $\pm$ sem, y en tiempo 15': 76 $\pm$ 24 vs 25 $\pm$ 9 ng/ml media $\pm$ sem.

\* p<0.05

\*\* p<0.02

\*\*\* p<0.01



Graf. 21

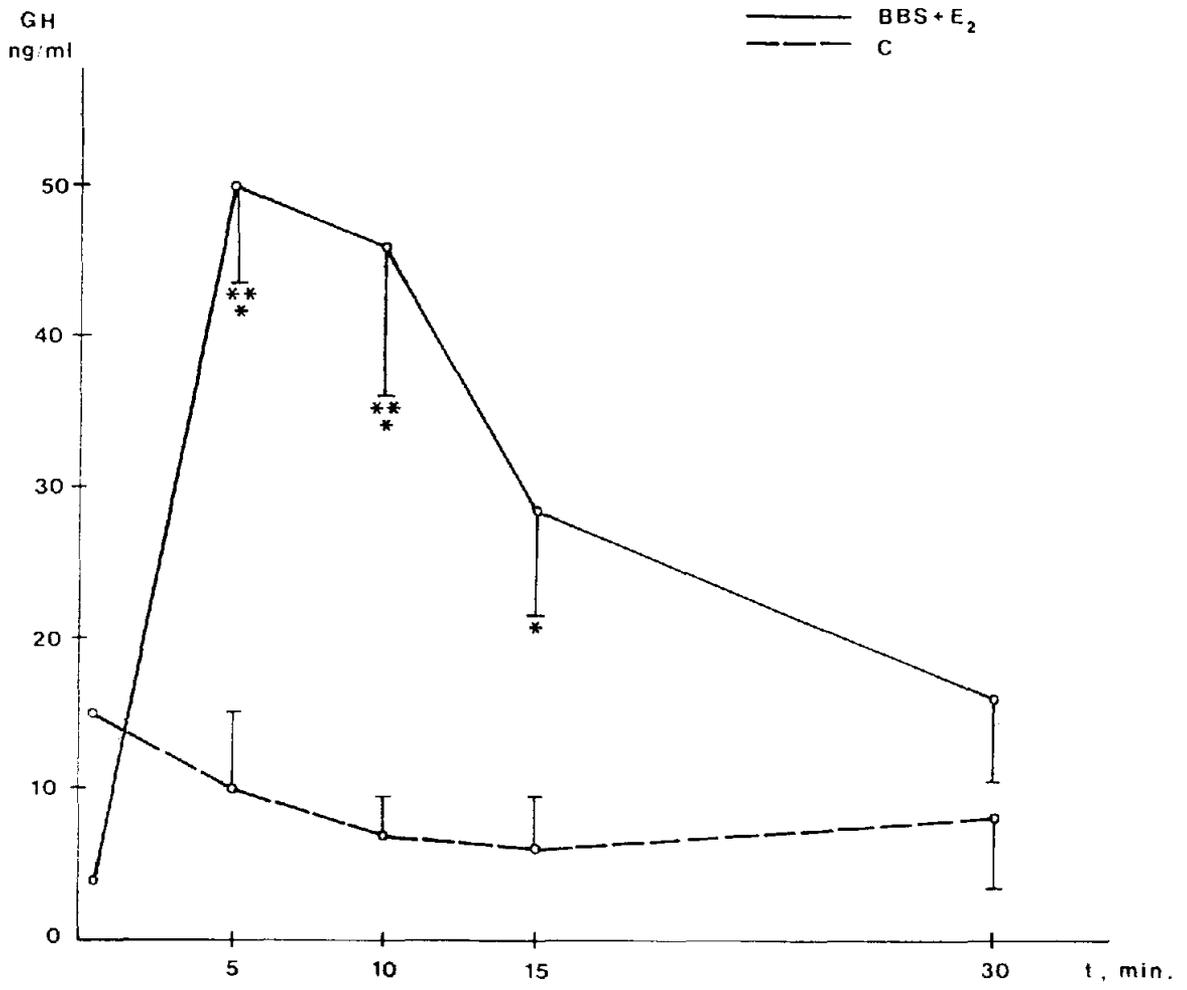
## GRAFICA 21

Efecto de la administración de BBS sobre la secreción de GH inducida por GRF en la rata crónicamente tratada con E2.

Los dos grupos de animales de este experimento fueron tratados con una inyección cada 3 días durante 15 días de 250  $\mu\text{g}$  s.c. de Estradiol. El día del experimento un grupo es inyectado con 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GRF (n=7), y el otro con la misma dosis de GRF, mas un bolo de 100  $\mu\text{g}/\text{rata}$  de BBS (n=10).

Observamos también una potenciación de la respuesta al GRF en los animales sometidos a el tratamiento crónico con E2 por la BBS. En tiempo 10': 208 $\pm$ 117 vs 95 $\pm$ 57 ng/ml mediatsem.

\*\* p<0.02



Graf. 22

GRAFICA 22

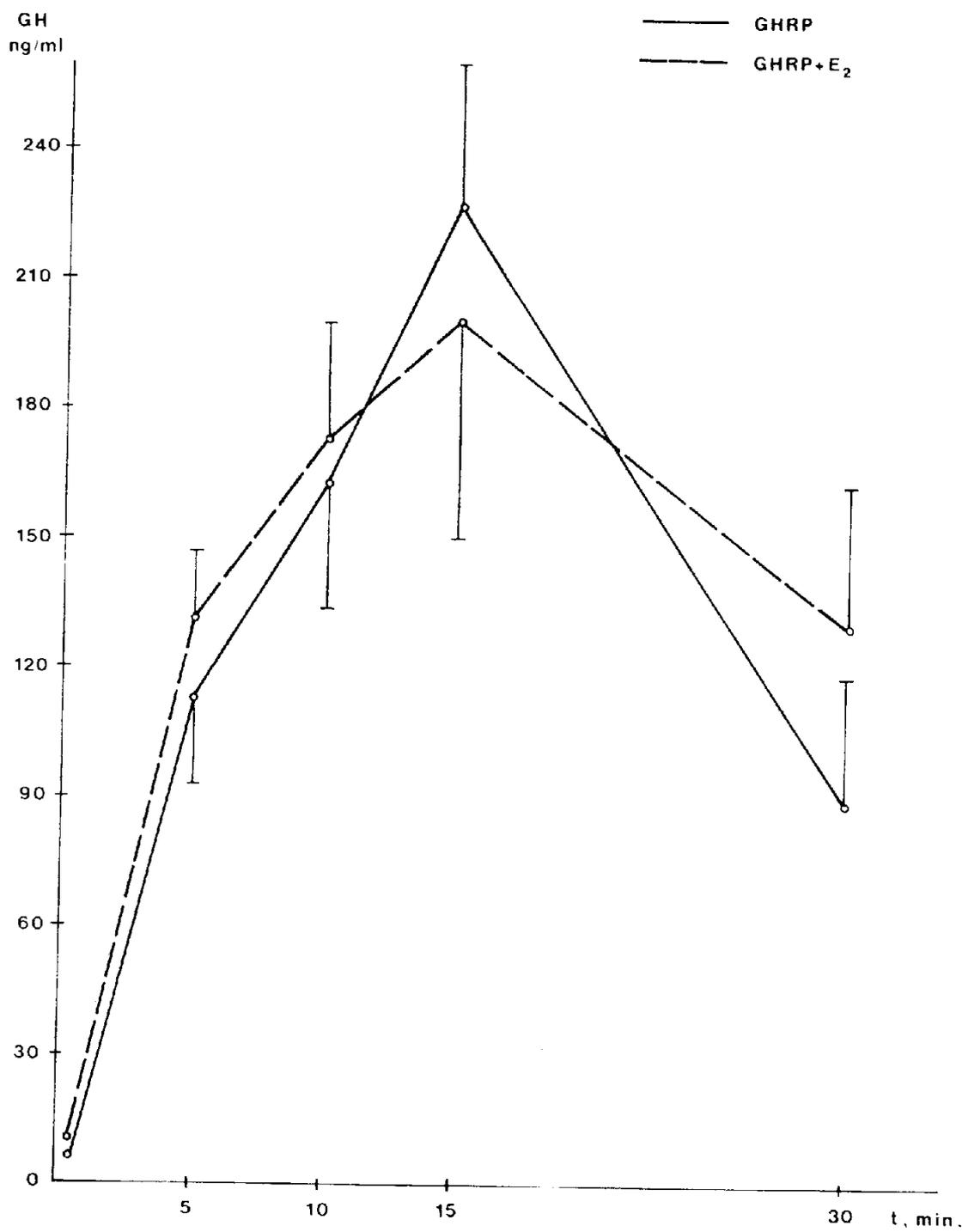
**Efecto de la BBS sobre la secreción basal de GH en la rata pretratada con E2 agudamente.**

Comparamos dos grupos de animales inyectados 3 días antes con 250  $\mu\text{g}$  de Estradiol s.c. A un grupo se le administran 25  $\mu\text{g}$ /rata de BBS (n=6), y al otro suero salino (n=5).

Observamos una estimulación de la secreción de GH por la BBS, que dura más de 15'. En tiempo 5': 51 $\pm$ 6 vs 10 $\pm$ 5; en tiempo 10': 46 $\pm$ 9 vs 8 $\pm$ 2; en tiempo 15': 28 $\pm$ 7 vs 6 $\pm$ 3 ng/ml media $\pm$ sem.

\* p<0.05

\*\*\* p<0.01



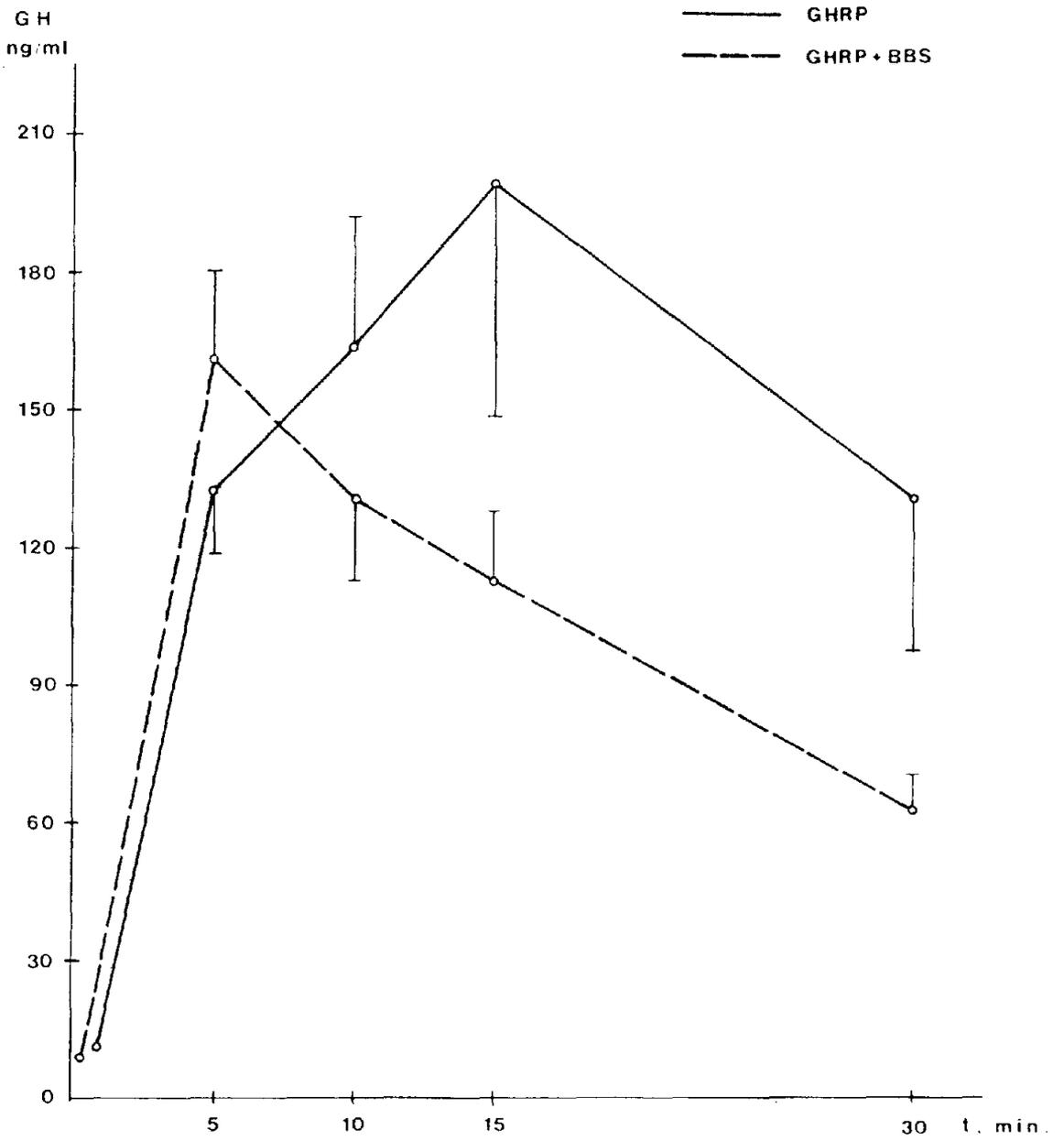
Graf. 23

### GRAFICA 23

**Efecto de la administración aguda de E2 en la secreción de GH estimulada por GHRP.**

Comparamos un grupo de ratas a las que se había inyectado 3 días antes con 250  $\mu\text{g}$  s.c. de Estradiol (n=8), con otro que no había recibido pretratamiento (n=14). El día del experimento, a los dos grupos se les administraron 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GHRP.

No hay diferencias en la secreción de GH entre los dos grupos.



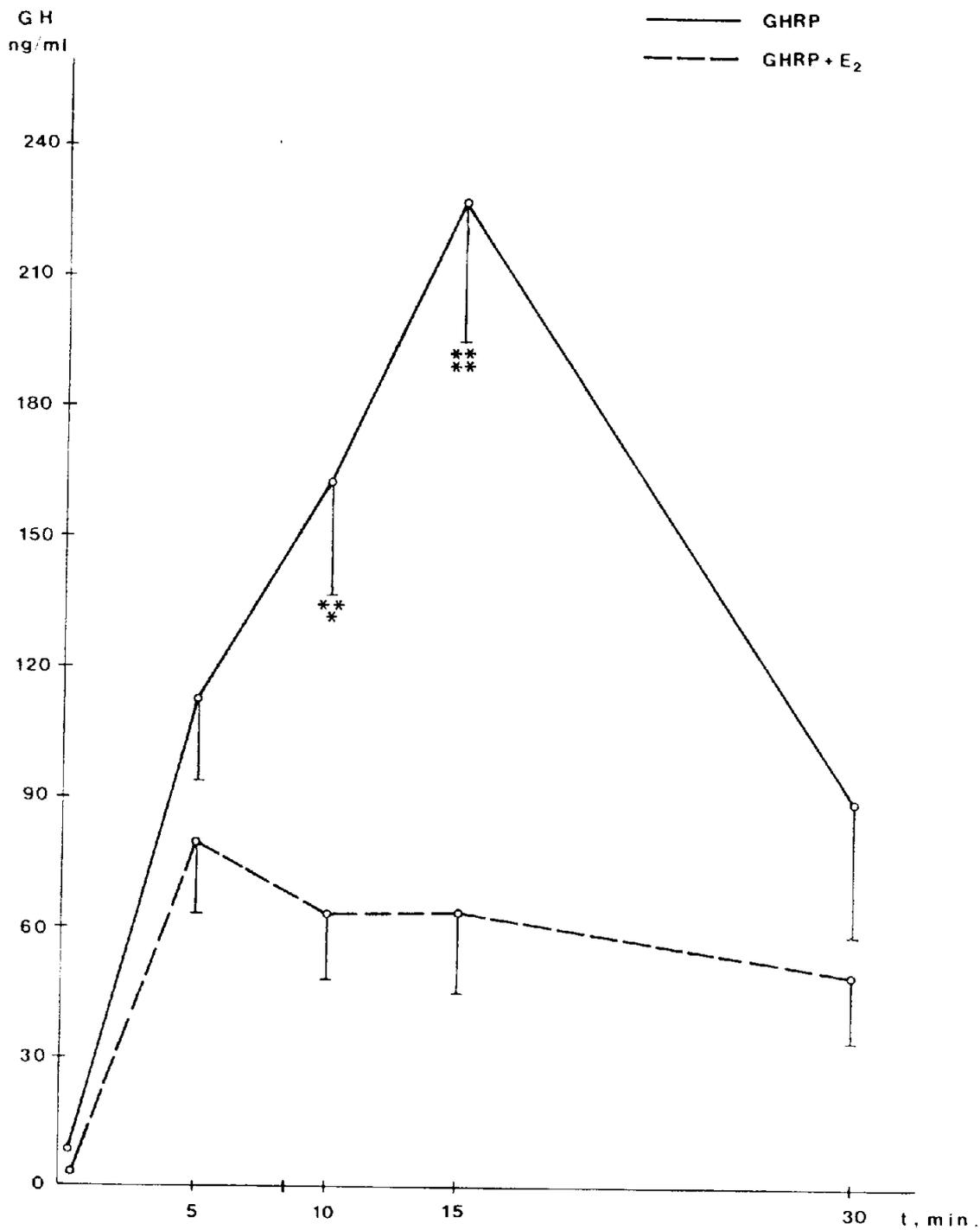
Graf. 24

#### GRAFICA 24

Efecto de la BBS sobre la secreción de GH inducida por GHRP en la rata pretratada agudamente con estrógenos.

Los dos grupos de animales de este ensayo han sido pretratados 3 días antes con 250  $\mu\text{g}$  de Estradiol s.c. Un grupo (n=8) recibe el día del experimento 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GHRP, y el otro (n=7) 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de GHRP más 100  $\mu\text{g}/\text{rata}$  de BBS.

No observamos diferencias entre los dos grupos.



Graf. 25

## GRAFICA 25

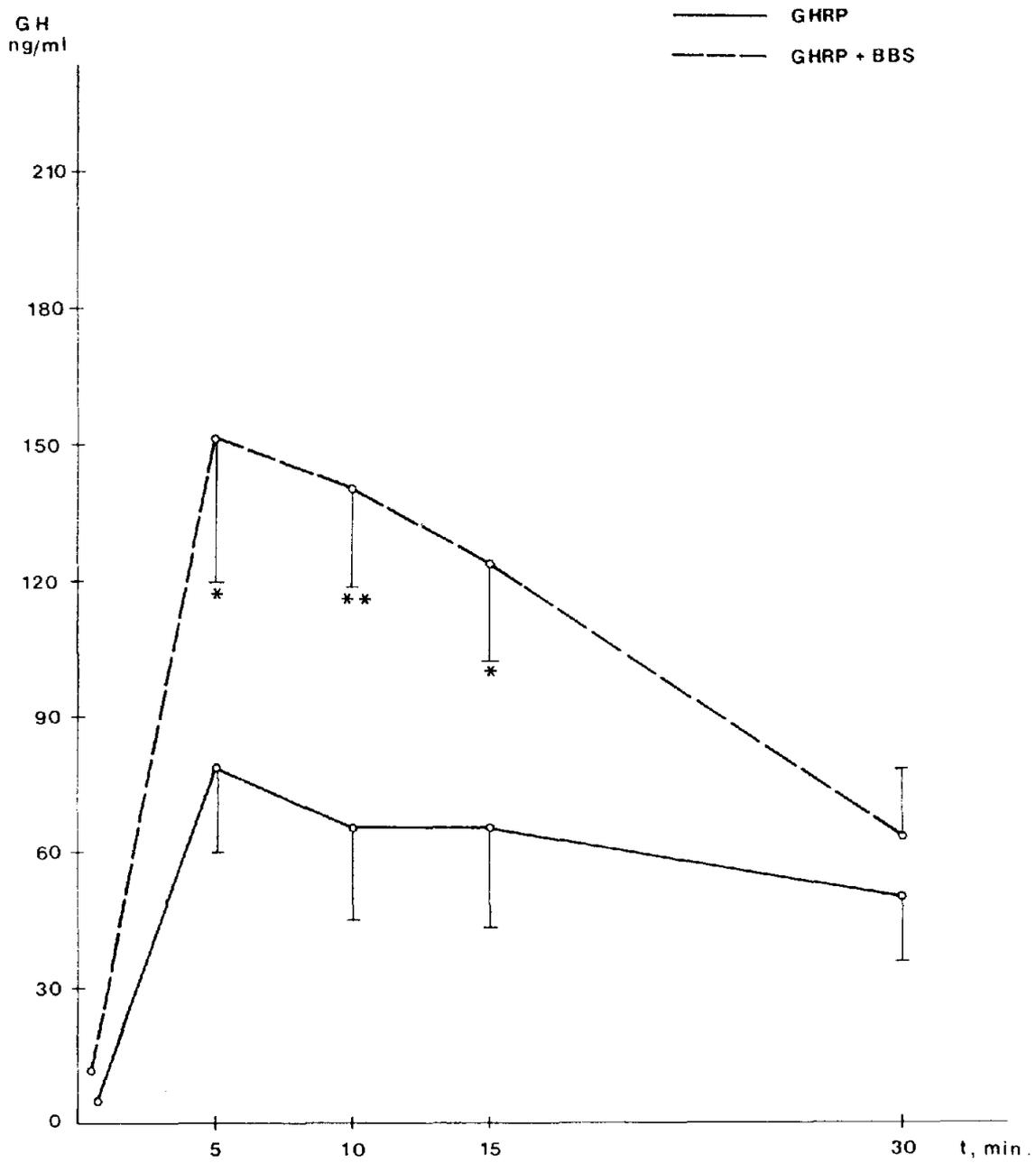
**Efecto de la administración crónica de E2 en la secreción de GH inducida por GHRP.**

Comparamos un grupo de animales que ha sido tratado con 250  $\mu\text{g}$  de Estradiol s.c. cada 3 días durante 15 días, (n=9), con otro grupo de animales sin pretratamiento (n=14). Los dos grupos fueron inyectados con 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GHRP.

Observamos una inhibición de la secreción de GH inducida por el GHRP en las ratas estrogenizadas. Los valores en los tiempos 10'y 15'son respectivamente : 162 $\pm$ 28 vs 64 $\pm$ 16 ; 226 $\pm$ 31 vs 64 $\pm$ 17 ng/ml media $\pm$ sem.

\*\*\* p<0.01

\*\*\*\* p<0.001



Graf. 26

## GRAFICA 26

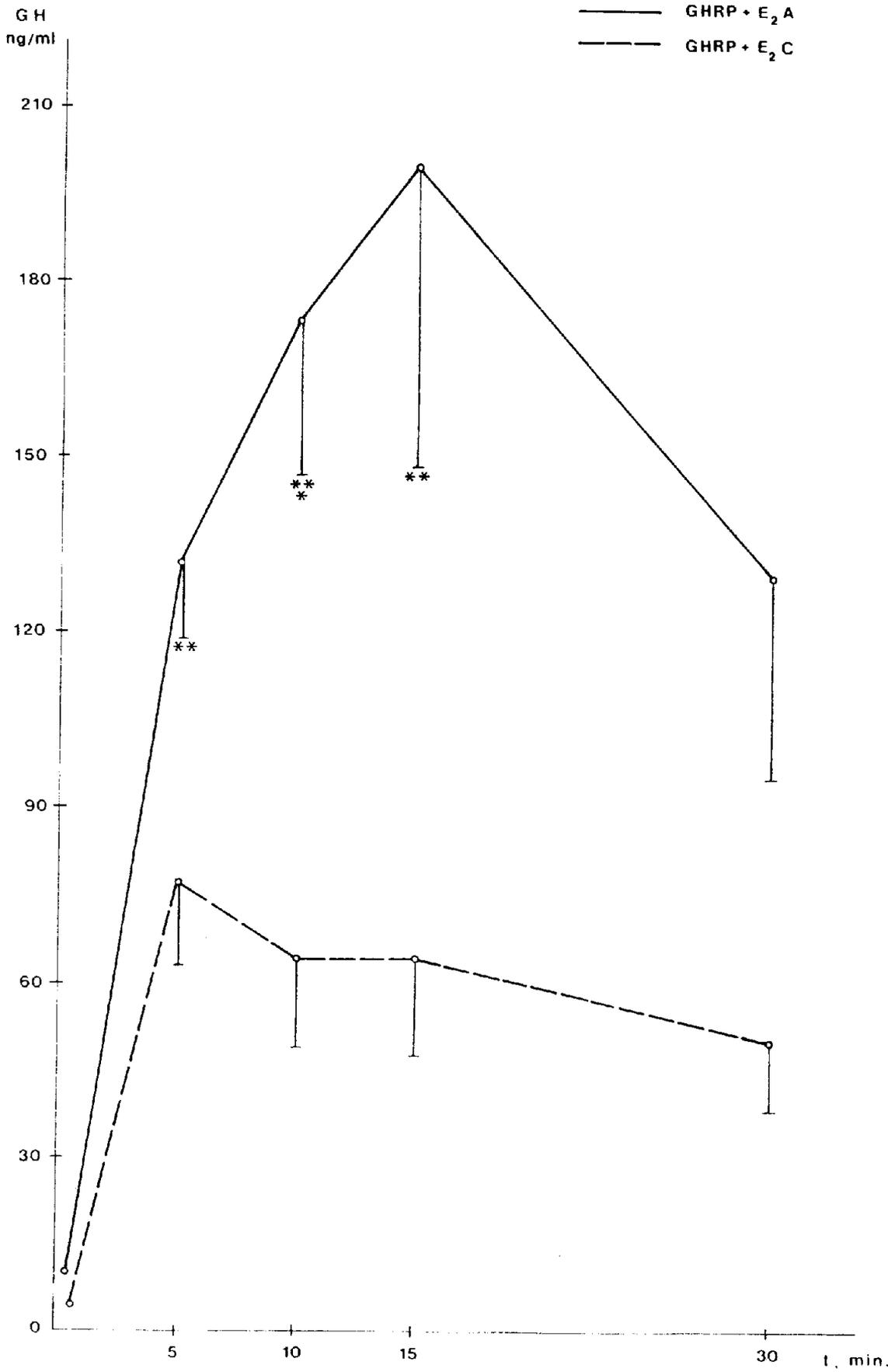
Efecto de la BBS sobre la secreción de GH inducida por GHRP en la rata tratada crónicamente con estrógenos.

Comparamos dos grupos de ratas que han sido tratadas durante 15 días con una inyección s.c. cada 3 días de 250  $\mu\text{g}$  de Estradiol. Un grupo se inyectó con 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GHRP (n=9), y el otro con la misma dosis de GHRP más 100  $\mu\text{g}/\text{rata}$  de BBS.

Observamos como la BBS produce en este caso una potenciación de la secreción de GH por el GHRP. Los valores son respectivamente: 151 $\pm$ 28 vs 77 $\pm$ 15, 138 $\pm$ 24 vs 64 $\pm$ 16, y 122 $\pm$ 21 vs 64 $\pm$ 17 ng/ml mediatsem, para los tiempos 5', 10, y 15'.

\* p<0.05

\*\* p<0.02



Graf. 27

### GRAFICA 27

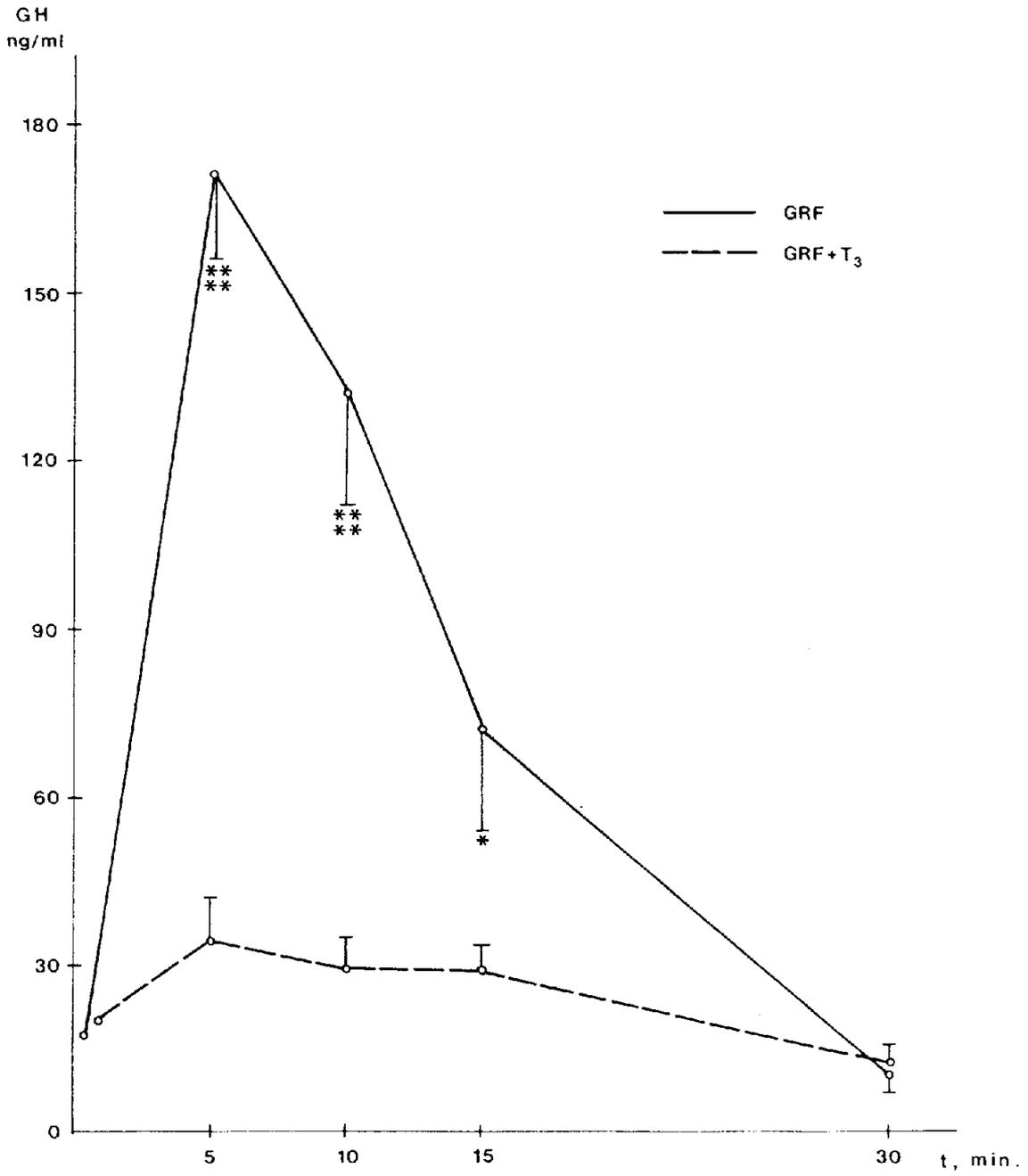
**Evolución de la secreción de GH estimulada por GHRP con la administración aguda o crónica de E2.**

Comparación entre una única dosis de E2 3 días antes, o 5 inyecciones durante 15 días (1 cada 3 días). La dosis es la misma: 250  $\mu$ g s.c. de Estradiol.

Observamos como aunque la administración aguda de E2 no modifica la secreción de GH estimulada por GHRP, la administración crónica produce una significativa disminución de éste estímulo.

\*\*  $p < 0.02$

\*\*\*  $p < 0.01$



Graf. 28

## GRAFICA 28

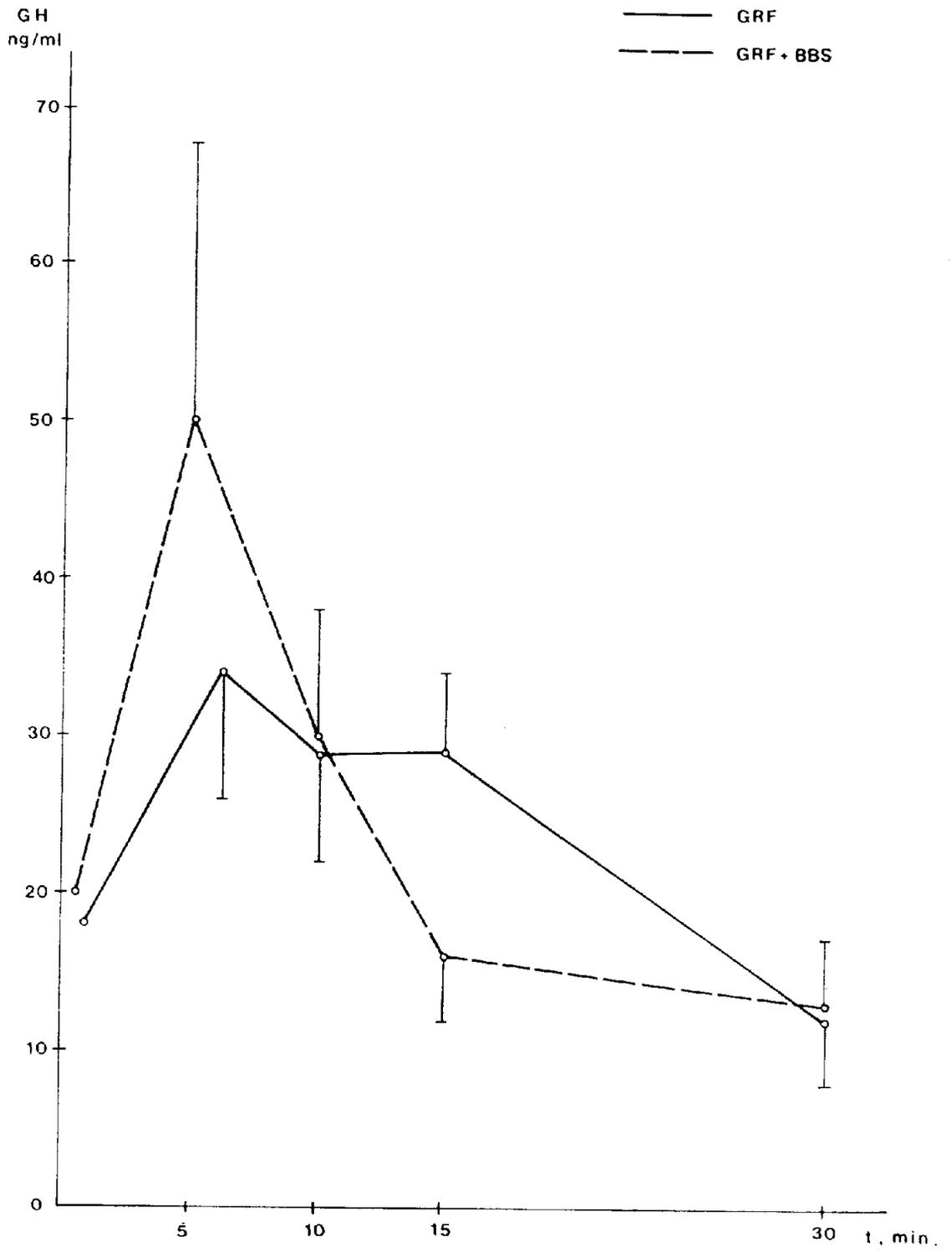
**Efecto de la administración de T3 sobre la secreción de GH estimulada por el GRF.**

Comparamos un grupo de animales que fué inyectado diariamente durante 5 días con 75  $\mu\text{g}$  de T3 s.c. con otro grupo que no tuvo tratamiento (n=7, n=9). Posteriormente a ambos se les inyecta la misma dosis de GRF: 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v.

Observamos una drástica reducción de la estimulación de GH por el GRF, en las ratas tratadas con T3. Los valores son 168 $\pm$ 18 vs 34 $\pm$ 8; 132 $\pm$ 20 vs 29 $\pm$ 7; 73 $\pm$ 19 vs 29 $\pm$ 5 ng/ml mediatsem, respectivamente para los tiempos 5', 10'y 15'.

\* p<0.05

\*\*\*\* p<0.001



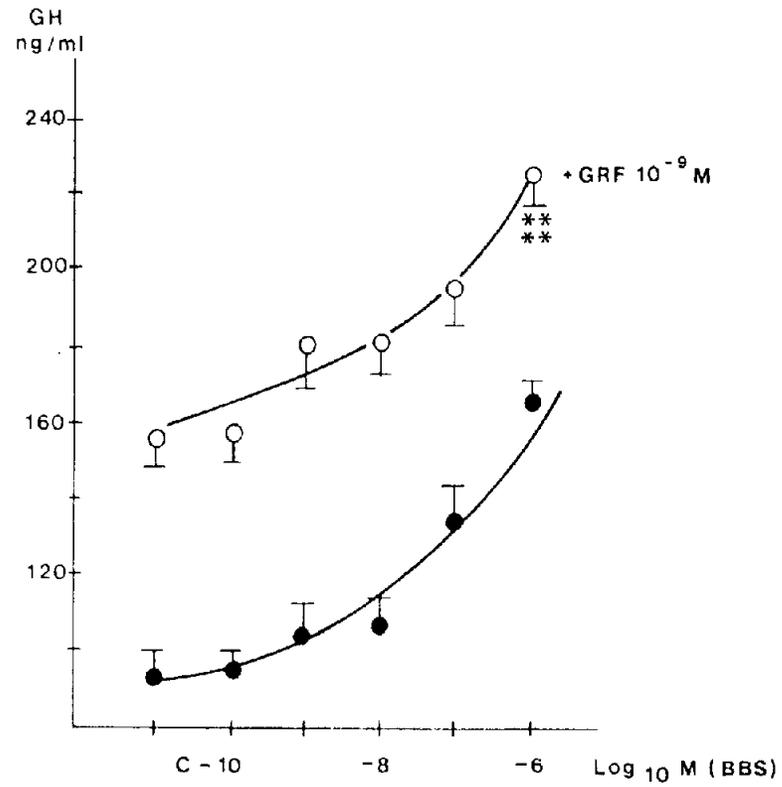
Graf. 29

## GRAFICA 29

Efecto de la BBS sobre la secreción de GH inducida por GRF en la rata tratada con T3.

Comparamos dos grupos de animales tratados durante 5 días con una inyección s.c. diaria de 75  $\mu\text{g}$  de T3. Un grupo (n=9) recibe 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. de GRF, y el otro (n=8) la misma dosis de GRF más 100  $\mu\text{g}/\text{rata}$  de BBS.

La BBS no produce modificación de la secreción de GH estimulada por el GRF en estas condiciones.



Graf. 30

### GRAFICA 30

Efecto de la administración de diversas concentraciones de BBS y GRF, en cultivo monocapa de células adenohipofisarias, sobre la secreción de GH.

Comparamos el efecto de la BBS (10 a la  $-10$ , 10 a la  $-9$ , 10 a la  $-8$ , 10 a la  $-7$ , 10 a la  $-6$  M) y estas mismas concentraciones de BBS más GRF, 10 a la  $-9$  M.

Observamos que la BBS por sí sola estimula la secreción de GH (todos los valores por encima del control) en forma dosis dependiente, y que este efecto es aditivo al del GRF, que potencia claramente esta respuesta cuando se añade a la BBS.

Los valores máximos (BBS 10 a la  $-6$ ) vs ( BBS 10 a la  $-6$  + GRF 10 a la  $-9$ ) son respectivamente:  $166 \pm 5$  vs  $229 \pm 11$  ng/ml mediatsem.

\*\*\*\*  $p < 0.001$ .

## DISCUSSION

## DISCUSION

### I. DATOS DE LA GASTRINA

#### A) EXPERIMENTOS IN VIVO

En el año 1.986, un miembro de nuestro grupo, el Dr. Garcia-Rojas, realizó un estudio sobre la influencia de la gastrina (GAS), en la secreción de la hormona de crecimiento.

Encontró que en la rata, se producía una pequeña, -aunque significativa-, respuesta secretoria de GH tras la inyección i.c.v. de GAS (236), con una dinámica de respuesta diferente a la encontrada por Vijayan (207), en el único trabajo internacional que existe publicado sobre este tema. El Dr. García-Rojas encontraba un pico de respuesta a los 10' que descendía rápidamente a niveles basales, mientras que Vijayan empezaba a apreciar respuesta de GH sobre los 15', manteniéndose los niveles elevados aún después de una hora.

Ya que las experiencias del Dr. García-Rojas estaban hechas en ratas anestesiadas con uretano, un modelo experimental que puede ser problemático a la hora de encontrar respuestas de GH por sus condiciones intrínsecas, nos decidimos a investigar la influencia de la gastrina sobre la hormona de crecimiento en otros modelos alternativos que permitieran amplificar la respuesta, y en su caso investigar sobre los mecanismos implicados en ella.

No ha sido posible, ya que no hemos encontrado respuesta de GH en ninguno de los modelos experimentales empleados.

Iniciamos nuestros experimentos usando animales anestesiados con pentobarbital, un modelo unánimemente admitido como sensible a las respuestas de GH. El primer ensayo usando esta anestesia se hizo administrando GAS i.v. ( $5 \mu\text{g}/\text{rata}$ ). Como se muestra en la gráfica 1, no hemos hallado respuesta. Estos datos son concordantes con los de Vijayan (207) que tampoco encontró modificaciones en estas condiciones.

Es común que péptidos que actúan por vía sistémica sean inactivos en administración central y viceversa (237), por lo que decidimos usar la administración i.c.v. para continuar los experimentos.

En la rata anestesiada con pentobarbital, la administración i.c.v. de  $5 \mu\text{g}/\text{rata}$  de GAS, tampoco modificó la secreción de GH respecto a su control (Gráfica 2).

Es sabido, que la rata tiene un patrón específico de secreción de GH, en el que cada 3 horas se producen picos de amplitud variable, que alternan con periodos en que las concentraciones de la hormona son prácticamente indetectables (47). Tanto la anestesia con uretano como con pentobarbital inhiben estos pulsos, estabilizando los niveles basales (238), si bien existen diferencias entre ambas.

La anestesia con uretano induce la liberación de SS por sus núcleos productores, con lo que los niveles de SS en sangre portal son muy altos y los niveles basales de GH pueden llegar a ser indetectables (239). Con el pentobarbital en cambio, los niveles de SS portal son mucho menores y por tanto los basales más altos (240). Mientras que en la rata

anestesiada con pentobarbital, la estimulación eléctrica del hipotálamo incrementa los valores de GH, este efecto no se produce en la rata uretanizada (239), lo que también se atribuye a la hipersecreción de SS. Es más Stachura y cols. (241), han inhibido la secreción basal de GH con concentraciones de SS mas bajas en sangre portal (409.8 pg/ml), que las que encontraban (502.5 pg/ml) en ratas anestesiadas con la misma dosis de uretano que usó el Dr. Garcia-Rojas ( 150 mg/100 g peso) (239). Ambos anestésicos tienen sin embargo un punto en común: valores indetectables de GRF en sangre portal (150,240).

A la vista de lo referido, los resultados del Dr. Garcia-Rojas podrían explicarse como una elevación pasajera de GH que se debería a una liberación de GRF inducida por los altos niveles de SS en vasos portales, ya que como hemos indicado, la SS y el GRF, pueden modular recíprocamente su liberación, y valores hipotalámicos muy altos de SS inducen la liberación refleja de GRF y viceversa (172,173,174), con la consecuente respuesta de GH.

Otros péptidos, que como la BBS ejercen una inhibición prolongada de la secreción de GH mediada por SS, muestran también una pequeña y transitoria elevación de la hormona bajo anestesia con uretano, para después volver ( a los 15') a valores muy bajos (220), efecto que no se presenta en la rata consciente o anestesiada con pentobarbital, donde la inhibición de la secreción basal de GH se manifiesta desde el primer momento.

El hecho de que bajo anestesia con pentobarbital, no se detecte GRF en vasos portales, hace pensar que lógicamente esté dificultada, cualquier respuesta mediada por esta hormona estimuladora. Consecuentemente buscamos otro anestésico en el que el patrón secretorio fuera similar a la rata sin anestesiar.

La xilazina-ketamina (x-k), ya había sido estudiada por Plotsky y Vale en este sentido (240), que observaron que los pulsos espontáneos de GH se mantenían, y coincidían con subidas de los niveles portales de GRF, que a su vez coincidían o iban precedidos de una disminución de los niveles de SS.

Nosotros realizamos previamente a la administración de gastrina un experimento en que anestesiando las ratas con x-k comprobaríamos la existencia o no de pulsatilidad con el anestésico, extrayendo sangre cada 15 minutos durante 3 horas, tiempo durante el cual necesariamente habría de producirse algún pico secretorio. (Los datos no se muestran). Comprobamos que la pulsatilidad ciertamente existía, y además, dado que las ratas mantenidas en las mismas condiciones presentan los pulsos aproximadamente al mismo tiempo, realizamos el experimento con gastrina desfasando 30' el tiempo de administración del péptido con los picos secretorios, para evitar confusiones de interpretación. Los resultados que se muestran en la gráfica 3 indican claramente, que tampoco en este modelo provoca la gastrina liberación de GH, a pesar de la disponibilidad de GRF hipotalámico.

Sin embargo, y ya que los anestésicos "per se", modifican la acción de los neurotransmisores cerebrales, investigamos los efectos de la gastrina en la rata sin anestesiarse. Para ello, usamos dos modelos experimentales diferentes, a fin de que uno pudiera servir de control del otro, y minimizar en lo posible los efectos que la propia metodología, stress, etc, pudieran ejercer sobre la rata.

El stress es el gran enemigo de este tipo de experimento, ya que una rata estresada bloquea no solo su secreción basal de GH (242), sino la respuesta a varios estímulos, entre ellos el GRF (47), a cuya liberación se deben los pulsos. De hecho noso-

tros realizamos un experimento, en el cual, un grupo de ratas recibió la dosis I.C.V. de gastrina inmovilizándolas en un tubo de metacrilato que deja al descubierto la cánula i.c.v. (Pan-Lab, Barcelona), mientras que otro grupo de animales no se manipuló. Ambos grupos fueron decapitados a los 15', y se hizo coincidir el momento de la decapitación con un pico secretorio. Los animales a los que se había inmovilizado mostraban una supresión total del pulso, de hecho los valores eran indetectables, mientras que aquellos a los que no se había manipulado mostraban los valores elevados normales de un pulso.

Para evitar este efecto, los animales eran manipulados a diario dentro de sus cajas, a fin de que se acostumbraran al manejo por el investigador, y se diseñó el prolongador para inyectarlas i.c.v. molestándolas lo menos posible y sin tener que inmovilizarlas. Es mas, las ratas solo veían al investigador en el momento de colocarles las prolongaciones de cánula i.c.v. en el caso de las decapitadas, o de esta y la prolongación de la cánula yugular en el caso del "freely moving", tras lo cual se las dejaba unos 15'-20' tranquilas, hasta el momento de introducir la substancia, y luego hasta el momento de las extracciones, o de sacarlas de la caja para ser decapitadas. La prueba de que el stress ha influido poco en nuestro experimento es que todas las ratas del modelo de decapitación y practicamente todas las que estaban en libre movimiento, presentaron picos secretorios en el momento esperado.

Dos animales en freely-moving a los que se había inyectado GAS i.c.v., y uno del grupo control, no presentan pulsos espontáneos, sin que durante el experimento los animales manifestaran signos de stress, debilidad, anemia, etc. Los que por los motivos citados u otros cualquiera presentaron durante el ensayo signos que nos hayan hecho dudar de la fiabi-

lidad de los datos obtenidos, se han eliminado del experimento presentaran o no pulsos.

La anemia en concreto ha sido de frecuente aparición. Vijayan y otros grupos disponen de bombas de infusión continua, lo que permite que el volumen de cada extracción sea muy pequeño (100  $\mu$ l.); nosotros no disponemos de ellas y el volumen extraído (200  $\mu$ l. x 10 extracciones), es importante (aproximadamente 1/4 de la volemia de la rata).

Finalmente en las ratas decapitadas se hizo coincidir la administración de GAS con el comienzo de un pico secretorio, buscando un posible efecto potenciador del GRF, ya que los pulsos en la rata se deben al citado péptido (61), mientras que en el experimento en freely-moving, se ha desfasado en 1 hora la introducción de la GAS, con el momento esperado para el pico. La dosis de GAS fué la misma en ambos casos; 5  $\mu$ g/ rata, disueltos en 10  $\mu$ l de salino

Es obvio que en ninguno de los dos modelos la gastrina tiene efecto sobre la secreción de GH (Gráficas 4 y 5). Es más en las ratas decapitadas aparece una diferencia significativa en el minuto 15 'entre los controles y las ratas inyectadas con gastrina, presentando los primeros valores mas altos. Sin embargo nosotros no interpretamos esto como una supresión de la secreción de GH por la gastrina sino como una consecuencia de los diferentes valores aleatorios que se encontraron en las ratas en ese momento concreto, empezando un pico secretorio, ya que luego los valores se igualan entre las ratas que habían recibido gastrina y sus controles.

Los animales en "freely-moving", pulsaron en el momento esperado, y los picos tienen igual amplitud en el grupo con gastrina que en su control. Los animales presentan los picos en un intervalo de 40',

un poco mayor de lo publicado por otros autores (243), lo que nosotros atribuimos a la diferencia en la toma de tiempos. Lo ideal sería, extraer los bolos cada 15', pero nosotros lo hicimos cada 20' para minimizar en lo posible el volumen de sangre extraído. También puede deberse a pequeñas variaciones horarias en el comienzo de la prueba, o a las propias diferencias individuales de cada rata. En cualquier caso estas diferencias son pequeñas y no pensamos que sean significativas (15'-30,'vs 40').

En este punto nuestros valores si son discrepantes de los reportados por Vijayan y sus colaboradores (207), que encuentran que la administración i.c.v. de GAS, en la rata sin anestesia, produce una curva ascendente de liberación de GH que aún se mantiene elevada a los 60'

Sin embargo los modelos empleados no son exactamente iguales. El grupo de Vijayan usa de modo habitual ratas hembras ovariectomizadas para sus experimentos mientras que nosotros hemos usado machos, y ellos canulan en el tercer ventrículo mientras que nosotros lo hemos hecho en un ventrículo lateral.

Tanto nuestros propios datos, como otros de la literatura, muestran que los estrógenos pueden modificar la secreción de GH, encontrándose en concreto que "in vivo", pueden ejercer un efecto supresor sobre la secreción de GH, y disminuir la respuesta de esta al GRF (244). Una hembra ovariectomizada tiene unos valores de estrógenos menores que un macho, y su respuesta al GRF es mayor que la de una hembra intacta (244). Por lo tanto, las hembras ovariectomizadas tendrían una mayor facilidad para secretar GH que un macho, y la gastrina, un estímulo poco potente, podría inducir liberación de GH en una hembra castrada y no en un macho.

Por otro lado, la colocación de las cánulas i.c.v. también puede influir en los resultados. Hace 3 años, Gloria Tannembaun (245), mantuvo una polémica con Vijayan y Mc. Cann por este motivo. La primera encontraba una supresión dosis-dependiente de GH al inyectar en el ventrículo lateral izquierdo diversas cantidades de GRF, mientras que los segundos encontraban que dosis bajas inhibían la secreción de GH (el circuito ultracorto de regulación de GRF y SS), mientras que dosis tan pequeñas como 200 y 2.000 ng, inducen una significativa elevación de los niveles de GH (174).

Es evidente que la colocación de la cánula en el 3V, minimiza los efectos que pueda tener la sustancia introducida sobre otras zonas cerebrales como cortex, hipocampo o amígdala, cuando se coloca la cánula en un ventrículo lateral, desde donde pueda difundir a las mencionadas zonas vía LCR. Estas zonas tienen conexiones con el hipotálamo, con lo que podríamos ocultar en parte la acción hipotalámica directa de la sustancia. Los efectos que la administración asimétrica de una sustancia, pueda producir en el cerebro son también difíciles de evaluar.

En cualquier caso, tanto el hipocampo como la amígdala, y algunos núcleos mesencefálicos tienen un efecto liberador de GH cuando sus neuronas son estimuladas eléctricamente (208), y además, desde un ventrículo lateral, una sustancia puede difundir rápidamente al tercer ventrículo y viceversa, y mas aún en nuestro caso, donde el volumen del vehículo en que se disolvieron los 5  $\mu$ g de GAS (10  $\mu$ l), es mayor que en el caso de Vijayan (3  $\mu$ l), y desde aquí seguir una vía común a través de la glía de la EM hacia los vasos portales para actuar directamente en las células somatotropas, o bien producir un efecto en hipotálamo (los núcleos productores de GRF están en íntimo contacto con las paredes del 3V), para

actuando sobre éste producir un efecto hipofisario indirecto. En nuestro caso no se han producido ninguno de estos dos efectos sobre la liberación de GH.

No somos los primeros en encontrar resultados diferentes a Vijayan y Mc.Cann, y atribuirlos a las diferencias metodológicas. Mientras que los citados autores, (246) encuentran que pequeñas dosis de sustancia P (SP) administrada i.c.v. en el 3V de una hembra ovariectomizada induce una elevación duradera de los valores de GH, Chihara y sus cols. (247), han encontrado una supresión significativa y también duradera de los niveles de GH tras inyectar la SP en un ventrículo lateral de un macho.

En el transcurso de este año la Dra. Carmen Barros, ha realizado experiencias con colecistoquinina (CCK), de cuya semejanza con la molécula de GAS ya hemos hablado, en un modelo experimental idéntico al nuestro. Este péptido también ha sido descrito por Vijayan como estimulador "in vivo" de la secreción de GH en la rata (248). Los resultados de la Dra. Barros (comunicación personal) no encuentran efecto alguno sobre GH tras la administración central o periférica del péptido en ratas macho anestesiadas con pentobarbital.

En definitiva creemos que los resultados obtenidos por Vijayan en su modelo experimental, no son superponibles a los encontrados por nosotros u otros investigadores que usen modelos parecidos al nuestro.

Pensamos, no obstante, que son necesarios estudios mas profundos sobre la biología de estos y otros neuropéptidos, y de sus acciones sobre el S.N.C. para evaluar estas diferencias.

## 2. EXPERIMENTO IN VITRO

Nuestros datos no muestran efecto alguno de la GAS sobre la secreción basal ni estimulada por el GRF de GH en cultivos monocapa de células AP.

Las diferentes concentraciones de GAS añadidas al cultivo muestran valores idénticos al control, y la estimulación que provocan diversas concentraciones de GRF, estadísticamente significativas (10 elevado a -11  $p < 0.001$ ; 10 elevado a -9  $p < 0.01$ ; y 10 elevado a -7  $p < 0.01$ ) respecto al control, no se modifican ni positiva ni negativamente por la adicción al GRF de GAS a la concentración máxima empleada (10 elevado a -5), (Gráfica 6).

En este apartado nuestros datos son concordantes con los de Vijayan, que tampoco encontró modificaciones de la secreción de GH "in vitro" por la GAS.

Por lo tanto la GAS tampoco tendría efectos directos hipofisarios, ni por sí misma ni potenciando el GRF sobre la secreción de GH.

En resumen, en ninguno de los modelos que se han usado "in vivo" o "in vitro", con o sin anestesia la GAS ha producido cambios.

## II. DATOS DE LA BOMBESINA.

### A). EXPERIMENTOS IN VIVO.

#### **1. EFECTO DE LA BBS SOBRE LA SECRECIÓN DE GH BASAL Y ESTIMULADA POR EL GRF.**

William Murphy (220), dejó establecido hace ya tres años, que la BBS, ejerce un prolongado efecto inhibitorio sobre la secreción basal de GH en la rata.

Este efecto se producía tanto tras inyección i.p. como s.c. del péptido, es dosis-dependiente en un rango de 0.008-25  $\mu\text{g}/100\text{g}$ . peso, y su duración sobrepasa los 90' con una dosis de sólo 10  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de peso vía i.p. La inhibición de la secreción de GH, se acompaña a los 60' de liberación de gastrina. A dosis mayores (100  $\mu\text{g}/\text{rata}$ ) la BBS inhibe además de manera consistente la secreción de GH estimulada por el GRF. Estos efectos están mediados por la SS, ya que se revertían tras la administración previa de anticuerpos anti-SS.

Esta inhibición se producía tanto en ratas anestesiadas con pentobarbital como en animales-conscientes sin anestesia, rechazando por tanto el posible papel de los anestésicos. Los efectos de la BBS en ratas anestesiadas con uretano, ya han sido anteriormente discutidos.

De acuerdo con los datos anteriormente citados nuestros resultados muestran claramente que la BBS inhibe de manera significativa la secreción de GH inducida por el GRF (media  $\pm$  SEM: 168 $\pm$ 19 vs 83 $\pm$ 20 ng/ml respectivamente,  $p < 0.02$ ). (Gráfica 7). También encontramos valores inferiores al control en la secreción basal de GH, si bien moviéndonos en valores tan bajos de basales (1-5 ng), y con varias ratas con concentraciones por debajo del nivel de sensibilidad del RIA (0,1 ng) a las que se otorga ese valor, es difícil postular ningún efecto (Gráfica 8). En las condiciones en que nosotros hemos realizado este experimento, las diferencias entre las ratas tratadas con BBS y su control no son significativas.

Ya que la SS inhibe considerablemente la secreción de GH estimulada por el GRF y basal (184), y que la BBS ejerce su efecto a través de dicho péptido, nuestros resultados tienen fácil explicación. De hecho las dosis inhibitorias de BBS usadas por Murphy

(220), son similares a las dosis molares de SS usadas por el mismo autor en un modelo experimental similar para inhibir la secreción basal de GH (249). Sin embargo, la duración del efecto inhibitor es mayor con la BBS, un hecho que debemos resaltar dada la cortísima vida media de los neuropéptidos circulantes (minutos en el mejor de los casos). Es posible que la BBS estimule de forma tónica y continuada la secreción de SS, a lo que debería la mayor duración de su efecto supresor.

El efecto de la BBS sobre la SS, parece ser específico hipotalámico. No se ha encontrado ningún efecto de la BBS sobre la liberación de SS en diversos tejidos gastrointestinales en perfusión continua, (250), y el hecho de que la inhibición de GH se acompañe de liberación de gastrina, también habla en contra del papel de la SS intestinal(220,251).

De forma definitiva, Abe y su grupo (252) demostraron que la inyección i.c.v. de BBS, se acompaña de un incremento de SS en sangre portal hipofisaria. Este incremento es dosis dependiente en un rango entre 0.2 y 2  $\mu\text{g}/\text{rata}$ . Sin embargo, incluso a la dosis máxima, los cambios en la SS portal no tienen un reflejo en sangre periférica. Los valores de SS en sangre portal y vena yugular (media $\pm$ sem) son respectivamente 2.012 $\pm$ 368 pg/ml y 51 $\pm$ 8 pg/ml, lo que indica claramente el origen hipotalámico de la SS.

En este mismo trabajo (252) se demuestra que la BBS i.c.v. abole por completo los incrementos de GH inducidos por la  $\beta$ -endorfina y disminuye considerablemente la estimulación por PGE1. Ambos estímulos parecen estar mediados por el GRF (71,253), por lo que parece lógico el efecto de la BBS, más teniendo en cuenta la alta dosis (2  $\mu\text{g}/\text{rata}$ ), dada la vía central de administración, comparada con las dosis sistémicas empleadas por Murphy(61).

A favor del efecto somatostinérgico de la BBS está también el trabajo de Kabayama (254), donde también tras inyección i.c.v. de GRP, se suprime por completo la respuesta de GH al GRF. Este efecto inhibitorio está muy atenuado si se administra previamente cysteamina, cuya acción sabemos que es la depleción de la SS endógena (255,256) o suero anti-SS.

En ninguno de estos dos trabajos (252,254) se hace mención a la inhibición sobre la secreción basal de GH, si bien el empleo en sus experimentos de ratas uretanizadas, con los valores tan bajos que ello supone en las basales, dificultaría, -como en nuestro caso-, apreciar dicho efecto.

La inyección periférica de BBS provoca una elevación de los niveles plasmáticos de glucosa incluso a dosis muy bajas (219,220). Podría pensarse por tanto que los efectos supresores del péptido sobre la GH se produjeran como respuesta a la hiperglucemia. Sin embargo, la hiperglucemia también aparece en ratas a las que se ha tratado con suero anti-SS, donde el efecto supresor de la GH por la BBS no se produce (61), lo que indica claramente que los cambios en la glucosa plasmática son independientes de los efectos de la BBS sobre GH. Además de forma diferente al humano, la glucemia no parece tener un papel importante sobre la secreción de GH en la rata. En 1.979, Gloria Tannenbaum, demostró que el ciclo circadiano de GH se mantenía sin alteraciones en ratas con niveles de glucosa cuatro veces superiores a los normales (243).

Los cuerpos celulares de las neuronas que contienen BBS se encuentran en íntimo contacto con las neuronas inmunoreactivas a SS (215). Es más, analizando la localización subcelular de la bombesina en

el cerebro de la rata (217), se ha comprobado que la fracción de mayor entidad se encuentra en los sinaptosomas, y que esta BBS puede liberarse de cortes hipotalámicos de una forma  $Ca^{++}$  dependiente.

La disposición de la BBS en el SNC de la rata es pues la típica de un neurotransmisor/neuromodulador, y los datos apuntan a que jugaría un papel fisiológico controlando la liberación hipotalámica de SS.

La evidencia de que la BBS tiene un efecto fisiológico en la inhibición de la secreción de GH en la rata, ha sido recientemente aportada por Kentroti (257). La inyección i.c.v. de un suero anti-GRP altamente específico, resulta en una elevación de los niveles de GH que comienza a las 3 horas, manteniéndose significativamente altos (mas de dos veces sobre el control) 24 horas después. Una segunda inyección del anticuerpo, a la misma dosis, un día después de la primera, repite y aumenta en duración y amplitud estos efectos. Queda pues claro que el GRP (sus similitudes con la BBS ya se han mencionado), es en la rata un importante neuromodulador de la función AP, cuya acción primera sería inhibir la secreción de GH.

En contraposición a su importancia en la rata, en el hombre, la infusión continua de BBS i.v. no produce cambios sobre la secreción de GH (258).

## **2.EFECTO DE LA BBS SOBRE LA SECRECION DE GH ESTIMULADA POR GHRP-6.**

El GHRP-6 (His-D Trp-Ala-Trp-D Phe-Lys-Nh<sub>2</sub>) es un hexapéptido sintético, que se ha mostrado como un potente liberador de GH tanto "in vivo" como "in

vitro". Su acción sobre GH es específica, ya que la liberación de GH no se acompaña de la de otras hormonas hipofisarias como TSH, LH, FSH o PRL, y puede tener una significación fisiológica, ya que la liberación de GH que se produce en la rata como consecuencia de la administración continuada del péptido, se traduce en una significativa ganancia de peso corporal (227).

Sus mecanismos de actuación tanto "in vivo" como "in vitro" son independientes de los del GRF (228,229). En células AP en cultivo los efectos de ambos secretagogos son aditivos incluso a dosis máximas (229).

Sin embargo la secreción de GH inducida por ambos péptidos tiene un punto en común: el ser sensible a la inhibición por la SS, "in vivo" e "in vitro". La secreción de GH por GHRP puede ser inhibida de forma dosis-dependiente hasta llegar a indetectable por la SS-14 y fundamentalmente por la SS-28, a la que resulta más sensible (227).

Por lo tanto, es lógico que conociendo el mecanismo de actuación de la BBS, la secreción de GH estimulada por GHRP se encuentre disminuida en nuestros experimentos ( $226 \pm 31$  vs  $96 \pm 10$  ng/ml,  $\text{mediat} \pm \text{SEM}$ ,  $p < 0.001$ ), por la BBS. (Gráfica 9).

Los razonamientos aplicados sobre la secreción de SS por la BBS, en relación con el GRF, son por tanto igualmente válidos en este caso, si exceptuamos la influencia que sobre la liberación de GH por GHRP pueden tener factores metabólicos, como la hiperglucemia que produce la BBS, cuyo efecto es completamente desconocido por ahora

### 3.EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES (GLC) SOBRE LA SECRECION DE GH INDUCIDA POR EL GRF. MODIFICACION DE LOS EFECTOS DE LA BBS.

Los estudios existentes tanto "in vivo" como "in vitro" sobre el papel que los GLC desempeñan en la neuroregulación de la GH han aportado datos conflictivos.

Los tratamientos de larga duración de células AP "in vitro" con GLC, incrementan la transcripción del gen de la GH (99,259), la síntesis de la hormona (260), el número de receptores para GRF (96) y consecuentemente las respuestas de GH a su hormona estimuladora (95,261). Sin embargo, los tratamientos de corta duración disminuyen la secreción basal de GH, y la respuesta de las células somatotropas al GRF (261).

Similarmente, las ratas tratadas con GLC "in vivo", pueden mostrar secreción basal de GH reducida (260), respuesta reducida a la hipoglucemia indulinica y escasa actividad hipotalámica liberadora de GH (262), respuesta aumentadas (263) o bien disminuidas, de GH al GRF.

Nuestros datos muestran que la administración de una sola dosis de Dex (4 mg/kg), inhibe considerablemente la respuesta de GH al GRF ( $168 \pm 18$  vs  $86 \pm 11$  ng/ml, media  $\pm$  SEM,  $p < 0.001$ ) (Gráfica 10), mientras que no se modifica esta respuesta cuando el corticoide es administrado crónicamente (1mg/kg durante 21 días) (Gráfica 11). En el primer caso, la BBS no es capaz de reducir mas la inhibición que ya han provocado los GLC (Gráfica 12), mientras que en el segundo se comporta como en el control, inhibiendo significativamente la respuesta de GH al GRF ( $269 \pm 30$  vs  $128 \pm 31$  ng/ml, media  $\pm$  SEM,  $p < 0.01$ ) (Gráfica 11).

Independientemente de las diferencias metodológicas (dosis y tipo de GLC, duración de los tratamientos) , parece claro que los corticoides tienen una dualidad de efectos en el control de la secreción de GH, ya que mientras facilitan la secreción y síntesis a nivel hipofisario, tienen un efecto inhibidor central. La dosis y duración del tratamiento puedan ser críticos para determinar cual es el efecto predominante.

Los efectos en humanos normales, también sugieren esta afirmación. Así mientras que los tratamientos de dosis única incrementan la respuesta de GH al GRF, los tratamientos prolongados, abolen por completo la responsividad de la GH (233).

Recientemente Nakagawa y cols. (260) han sugerido que uno de los mecanismos implicados en la disminución que los glucocorticoides producen en la secreción de GH estimulada por GRF sería la liberación de SS por el hipotálamo. Encontraron que 2 grupos de sus ratas tratadas durante 3 días con Dex., tenían un contenido hipofisario de GH mayor que sus respectivos controles, aunque los niveles plasmáticos de GH fueron considerablemente menores en las ratas tratadas. Midiendo el contenido hipotalámico en SS de estas ratas, comprobaron que estaba muy aumentado, y por contra el de GRF muy disminuido, o sea, escasa actividad liberadora de GH. Aunque evidentemente no puede establecerse un paralelismo absoluto entre un contenido aumentado de SS, y la liberación aumentada de la hormona por el hipotálamo, los datos apuntan en este sentido, al menos en estados crónicos y subcrónicos.

En otro reciente estudio (264), se ha demostrado que en las ratas hipotiroideas, en las que la sensibilidad de las células somatotropas al efecto inhibidor de la SS está disminuida, el tratamiento

con GLC, incrementa la respuesta de GH al GRF. Los GLC tienen un efecto estimulador neto en este grupo de animales, que no se produce en ratas eutiroides, cuya sensibilidad a la SS obviamente es normal. Toda esta información apunta a un papel mediado por SS en la inhibición de la secreción de GH por GRF "in vivo", tras la administración aguda de Dex. Nuestros propios datos también. El hecho de que la respuesta al GRF, ya inhibida por la Dex no se modifique tras la administración de la BBS hace pensar que la BBS no tendría efecto por ejercer su acción por el mismo mecanismo que la Dex, y el efecto fundamental de la BBS "in vivo", es la liberación de SS hipotalámica.

Para aclarar definitivamente este punto neutralizamos la SS hipotalámica mediante un Ac altamente específico, y se trataron con él dos grupos de ratas, uno previamente inyectado con 4 mg/kg i.p. de Dex 3 horas antes, y otro al que se inyectó solución salina. Las respuestas posteriores a 1  $\mu$ g/kg de GRF fueron idénticas en ambos grupos, revertiéndose por completo el efecto inhibitorio que sobre este estímulo producía la Dex (Gráfica 13).

Creemos ser los primeros en haber demostrado, por tanto, que el efecto inhibitorio "in vivo" de los GLC en administración aguda, sobre la secreción de GH estimulada por GRF está producido por la liberación de SS en hipotálamo.

Se ha sugerido también hace poco, un efecto inhibitorio hipofisario "in vitro", a la estimulación por GRF, tras la adición de Dex al medio de cultivo, registrado también tras corto espacio de tiempo (<4 h.) (261).

Estos resultados, se han reproducido en nuestro laboratorio, realizando el experimento en las mismas

condiciones (comunicación personal del Dr. B. Burguera). El mecanismo de esta inhibición es desconocido, aunque parece que los GLC actuarían a un nivel posterior a los receptores, ya que la estimulación de la liberación de GH por el dibutiril c-AMP, también se encuentra disminuida en estas condiciones (88).

En cualquier caso este efecto hipofisario directo no se ha manifestado en nuestro experimento, donde la inactivación de la SS, revierte por completo la inhibición que producen los GLC. Es posible sin embargo, que la disminución de los valores de GH que se observan tardíamente ( minuto 30 ) en nuestro experimento se deban a la puesta en funcionamiento de este mecanismo.

Nuestros datos con GLC crónicos, no muestran diferencias con los animales control, ni en la respuesta al GRF, ni en los efectos de la BBS sobre la secreción de GH inducida por GRF. La BBS inhibe el citado estímulo, mientras que los GLC por si solos no lo alteran. Tratamientos de mas corta duración (una semana), que los empleados por nosotros, muestran un aumento del estímulo ejercido por el GRF tanto en ratas normales como en animales adrenalectomizados (263). Estos resultados también han sido reproducidos en nuestro laboratorio por el Dr. Burguera (comunicación personal). Por lo tanto, el efecto hipofisario estimulador de los GLC sería superior al hipotalámico inhibidor tras una semana de administración, y ambos efectos se neutralizarían en tratamientos mas largos, no modificándose en estos ni positiva ni negativamente la secreción de GH por GRF. Asimismo, el tono somatostatinérgico volvería a la normalidad, con lo que la BBS puede actuar nuevamente liberando SS hipotalámica, inhibiendo consecuentemente la liberación de GH inducida por el GRF.

#### 4.EFECTO DE LOS GLC SOBRE LA SECRECION DE GH ESTIMULADA POR GHRP-6. MODIFICACION DE LOS EFECTOS DE LA BBS.

Nuestros datos muestran que la secreción de GH inducida por GHRP está sensiblemente disminuida tras la administración a corto ( $226 \pm 31$  vs  $48 \pm 18$  ng/ml,  $\text{media} \pm \text{SEM}$ ,  $p < 0.001$ ) (Gráfica 14), ó a largo plazo de Dex ( $663 \pm 61$  vs  $104 \pm 18$  ng/ml,  $\text{media} \pm \text{SEM}$ ,  $p < 0.001$ ) (Gráfica 15). De hecho la inhibición que la Dex produjo de manera aguda (con varios animales con todos los tiempos indetectables), fué tan grande, que para el experimento crónico se cambió la forma de administración del corticoide, haciéndola oral y durante menos tiempo, atenuándose así algo sus efectos, y se aumentó la dosis de GHRP de  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  a  $10 \mu\text{g}/\text{rata}$  (aprox.  $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). A pesar de ello la inhibición siguió siendo de altísimo grado como muestran los valores de los picos secretorios.

En ambos casos no obstante, la BBS puede potenciar aún más esta inhibición, hasta hacer que todos los valores sean indetectables en administración aguda ( $48 \pm 18$  vs  $1.5 \pm 0$  ng/ml,  $\text{media} \pm \text{SEM}$ ,  $p < 0.01$ ) (Gráfica 16), o de disminuirla considerablemente en los casos crónicos, aún en contra de una mayor dosis de GHRP ( $104 \pm 18$  vs  $34 \pm 4$  ng/ml,  $\text{media} \pm \text{SEM}$ ,  $p < 0.001$ ) (Gráfica 17). Tanto la acción de los GLC, como la modificación de este efecto por la BBS son pues diferentes, al ejercido por ambos factores sobre la secreción de GH inducida por GRF.

Nuestros resultados son compatibles con un efecto inhibitor directo hipofisario de la Dex sobre la secreción de GH por GHRP, al que se sumaría el efecto hipotalámico liberador de SS de la BBS. Un efecto que además aumentaría con el tiempo, ya que la inhibición de la secreción de GH por GHRP es mayor en

el caso de los tratamientos crónicos que en los agudos.

La hipótesis enunciada es difícil de demostrar. La adicción de Dex a un cultivo de células AP, aumenta la respuesta de GH a GRF, pero no modifica la de GHRP (229), y nosotros hemos mostrado que los GLC liberan SS hipotalámica, mecanismo por el cual ejercen su inhibición de la secreción de GH por GRF. El mismo efecto debe producirse por tanto en el caso del GHRP.

Ahora bien, sabemos que el GRF es capaz de inducir secreción de SS por el hipotálamo (172), es posible que el GHRP también. El mecanismo por el cual esto se produce podría ser en el primer caso competitivo y en el segundo aditivo a los efectos de la BBS. También es posible que los GLC y BBS actuaran sobre el mismo "pool" de SS, pero en el caso del GRF no se llegará a liberar totalmente ya que en cierta forma estaría "protegido" por el efecto estimulador hipofisario sobre el GRF, lo que no se produciría en el segundo caso, produciéndose un efecto liberador mucho mayor al sumarse los efectos de la Dex y la BBS.

Por lo tanto pensamos que el efecto directo hipofisario sería aditivo al de la liberación de SS hipotalámica, y este último aditivo a los efectos de la BBS sobre la hormona inhibidora, que se pondría de manifiesto al no haber efecto facilitador de los GLC en hipofisis sobre el GHRP, lo que daría lugar a una liberación mayor de SS con la consiguiente disminución de los niveles de GH.

Nos hace pensar así además, el hecho de que la inhibición de los GLC sobre la secreción inducida por GHRP es mayor que sobre la estimulada por GRF. Si sólo se produjera el efecto hipotalámico somatostati-

nérgico, el grado de inhibición sería igual, ya que la sensibilidad de ambos estímulos a la SS es muy parecida (227).

#### 5. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE E2 SOBRE LA LIBERACION DE GH POR GRF. MODIFICACION DEL EFECTO DE LA BOMBESINA.

Es un hecho claro, el que los esteroides sexuales modulan la secreción de GH.

En la rata, las diferencias que presentan machos y hembras en el patrón secretorio de GH, se manifiestan a partir de la pubertad (63,265). Las hipófisis de los machos tienen mayor contenido en GH que las de las hembras (266), la síntesis de GH es igualmente mayor (267), y también es mayor el número de células somatotropas, y la responsividad y sensibilidad de estas al GRF (268). Podríamos decir que la "calidad" de las células productoras de GH es mayor en el macho que en la hembra.

Abundando en este sentido, la secreción espontánea de GH, y los picos secretorios, son más grandes en el macho, y lógicamente por tanto, las respuestas "in vivo" al GRF. Aún más la respuesta al péptido de una hembra castrada es mayor que la de una hembra intacta (244).

Todos estos datos sugieren un efecto supresor "in vivo" de los E2 sobre la GH.

Evans (269), en un interesante trabajo que nos parece de una gran limpieza metodológica, encontró que las células AP en perfusión continua, provenientes de ratas que habían sido tratadas previamente en vida con E2 y testosterona, muestran respectivamente una disminución o un aumento de la respuesta de GH al

GRF. Las respuestas de GH a otros estímulos como isoproterenol, epinefrina y norepinefrina, de células AP en perfusión son mayores en machos que en hembras, lo que hace suponer que la respuesta de las células somatotropas de los machos es mayor también para los estímulos  $\beta$ -adrenérgicos (270).

Fukata y Martin (271), no encontraron efecto alguno ni de los E2 ni de la testosterona en la secreción de GH como respuesta al GRF, en cultivos monocapa de células AP. En contraste Simard y Labrie, usando un modelo experimental similar, observaron que la adicción directa de estrógenos, ha resultaba en un incremento de la secreción basal y estimulada por el GRF de GH, con niveles celulares aumentados de la hormona (272).

Los estudios en humanos no han aportado precisamente claridad a estas cuestiones. En mujeres se ha encontrado una respuesta aumentada de GH a la arginina y la hipoglucemia insulínica (273), es más las respuestas a arginina son mayores durante la mitad del ciclo, cuando mayor es la producción de E2.

Estos datos sugieren un papel facilitador de los E2 en la secreción de GH.

En contraste, son numerosos los trabajos donde no se han hallado diferencias en las respuestas a GRF entre hombres y mujeres (86), ni en estas a lo largo del ciclo (274), y Smals (87), encuentra que esta respuesta es mayor en los hombres.

Las concentraciones medias de GH durante el día se han medido mayores en mujeres que en hombres, y dentro de aquellas entre las más jóvenes (18-30 años), por contra la amplitud de los pulsos, y la cantidad de GH que se libera durante estos no revela diferencias sexuales (275). El tratamiento con E2 en

el mono, aumenta tanto los niveles de GH como de Sm-C, lo que podría explicarse como una significación fisiológica de la elevación de la GH, que podría tener una relevancia especial durante la pubertad (276).

En definitiva, los datos apuntan a un efecto facilitador sobre la secreción de GH en los primates, y a un efecto inhibitor en la rata.

Centrándonos ya en la rata, es evidente la influencia que los E2 tienen sobre la secreción de GH estimulada por GRF, aunque los mecanismos de acción por los que los E2 ejercerían sus efectos no han sido esclarecidos.

Pensamos que nuestros resultados pueden aclarar un tanto estas cuestiones.

Tanto en tratamientos cortos como de larga duración, encontramos que las respuestas al GRF están disminuidas en nuestras ratas estrogenizadas ( $168 \pm 18$  vs  $95 \pm 22$  ng/ml, media  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$ ) en tratamientos cortos (Gráfica 18) y en tratamientos largos ( $218 \pm 56$  vs  $122 \pm 22$  ng/ml, media  $\pm$  SEM,  $p < 0.01$ ) (Gráfica 19).

El efecto de la BBS está cambiado en los dos grupos de animales, produciéndose una potenciación de los efectos del GRF ( $122 \pm 22$  vs  $229 \pm 75$  ng/ml, media  $\pm$  SEM, en tratamiento crónico,  $p < 0.02$ , y,  $95 \pm 22$  vs  $201 \pm 17$  ng/ml, media  $\pm$  SEM, en tratamiento agudo,  $p < 0.01$ ) (Gráficas 20 y 21).

Es más, en ratas tratadas con E2 la BBS por sí sola estimula la secreción de GH ( $50 \pm 6$  vs  $10 \pm 5$  ng/ml, media  $\pm$  SEM,  $p < 0.01$ ) (Gráfica 22).

Este efecto estimulador de la BBS en ratas tratadas con estrógenos, ya había sido reportado por

Rivier (223), en ratas anestesiadas con uretano. Murphy (220), lo reprodujo simplemente anestesiando las ratas con uretano, sin el pre-tratamiento con E2, lo que, como ya hemos comentado, le indujo a pensar en un efecto de rebote producido sobre el GRF por los altos niveles de SS en sangre portal, y debido por tanto a la anestesia, y no a la propia BBS. Nosotros demostramos que esto no es así, ya que el efecto liberador de la BBS se produce en nuestras ratas anestesiadas con pentobarbital. De hecho la BBS ejerce en la rata estrogenizada el mismo efecto que en nuestros datos "in vitro": liberación de GH y potenciación de los efectos del GRF. Esta dualidad de efectos de la BBS podría modularse por las señales periféricas, y en el caso concreto de los E2, sería el efecto facilitador el que prevalece.

Aunque los datos sobre la acción inhibidora de los E2 sobre GH apuntaban a un efecto hipofisario directo, mucho se ha escrito también sobre el posible papel que pudieran jugar los péptidos hipotalámicos, concretamente la SS. Se ha postulado (268), que los mayores picos secretorios de GH, se deberían en el macho a una menor responsividad o a una sensibilidad disminuida de las células somatotropas a la SS, o incluso que la SS podría tener un papel en los diferentes patrones sexuales de secreción, y que los pulsos mas amplios de los machos se deberían a una secreción disminuida de SS en ellos (277). Nuestros resultados contradicen esta hipótesis. Pensamos que los efectos de los E2 se producen directamente en hipófisis, por un mecanismo desconocido si bien el hecho de ser diferente para uno u otro estímulo puede hacer pensar que actúen a nivel de receptores distintos.

Al margen de esta inhibición el tono somatostatinérgico estaría alterado en las ratas estrogenizadas, en el sentido de que la SS no podría liberarse (

esta sería la razón por la que la BBS actuaría a nivel hipofisario ), esto es, los E2 modificarían o inhibirían la cadena neuronal hipotalámica que pone en marcha la liberación de SS, impidiendo que esta se produzca, razón por la cual la BBS que encontraría cortados los mecanismos de su acción predominante -la liberación de SS hipotalámica-, actuaría a nivel hipofisario.

Podría pensarse también que la acción inhibidora de los E2 sobre GH está mediada por la liberación de SS por el hipotálamo, y que el mecanismo por el cual esta SS se libera fuera competitivo con la BBS y mas potente en el caso de los E2, con lo que la BBS tampoco podría actuar a nivel hipotalámico y lo haría a nivel hipofisario. Nuestros resultados con el GHRP van en contra de esta hipótesis y a favor de la anteriormente enunciada.

#### **6.EFECTO DE LOS E2 SOBRE LA SECRECION DE GH ESTIMULADA POR GHRP-6. MODIFICACION DE LOS EFECTOS DE LA BBS.**

El efecto de los E2 sobre la secreción de GH inducida por el GHRP es diferente al producido sobre la secreción estimulada por GRF.

En tratamientos cortos, la secreción de GH estimulada por el péptido no se modifica y la BBS no ejerce ningún tipo de acción (Gráficas 23 y 24).

Cuando los E2 se administran de forma prolongada, la liberación de GH por GHRP está considerablemente disminuida ( $227 \pm 31$  vs  $77 \pm 15$  ng/ml,  $\text{media} \pm \text{SEM}$ ,  $p < 0.001$ ) y la BBS potencia claramente el efecto estimulador del GHRP ( $77 \pm 15$  vs  $151 \pm 28$  ng/ml,  $\text{media} \pm \text{SEM}$ ,  $p < 0.02$ ) (Gráficas 25 y 26).

El hecho de que la administración de E2 por corto espacio de tiempo no modifique la secreción de GH por GHRP y que la adición de BBS no tenga ningún efecto, ni inhibidor ni estimulador, pensamos que ratifica las hipótesis que ya hemos expuesto sobre los mecanismos de actuación de los E2. El efecto sería directo hipofisario, pero la actuación de los E2 sobre los receptores de GHRP u otro lugar específico de acción sería mas lenta, no efectuándose al principio, para producirse de forma neta a las 2 semanas, donde la secreción estimulada por GHRP está ya claramente inhibida (Gráfica 27).

La liberación de SS hipotalámica, ya está alterada sin embargo desde el primer momento. La BBS no puede liberar SS, pero los E2 tampoco, pues en otro caso la secreción inducida por GHRP tendría que estar disminuida, ya que como hemos hecho notar ampliamente, el efecto estimulador de GH por GHRP, es inhibido por la SS (227). Es posible que el mecanismo por el cual la BBS estimule en hipófisis la liberación de GH (que ya hemos indicado que es independiente del GRF), interaccione o sea competitivo con el mecanismo por el que produce su liberación el GHRP, y por lo tanto, dado que en cualquier caso la acción estimuladora neta de la BBS por sí sola no es muy potente, no se produzcan efectos aditivos al GHRP, en estos tratamientos cortos.

Sin embargo cuando el efecto estimulador del GHRP ya se encuentra considerablemente disminuido, el efecto potenciador de la BBS se manifiesta con claridad, lo que podría interpretarse como ya hemos dicho por actuar ambas sustancias por el mismo mecanismo de actuación, o sobre el mismo "pool" liberable de GH.

Los estudios de Bicknell (278) en cultivos AP de pituitarias bovinas donde tanto la BBS como el

GHRP estimulan la secreción de GH de manera independiente pero no con efectos aditivos, hablarían a favor de nuestra hipótesis, confirmando que ambas substancias están actuando directamente en la hipófisis.

La secreción de GH inducida por GHRP-6, depende en cierto grado del sexo (228). Las respuestas de GH al secretagogo son mayores en ratas menores de 15 días, que en animales de 21 días y mayores, que con la diferenciación sexual, ya presentarían el patrón secretorio propio de macho o hembra. Las respuestas antes de los 21 días son mayores en machos que en hembras, mientras que estos efectos se invierten al aparecer la pubertad, a partir de la cual las hembras tienen mayores respuestas, lo que sugiere un efecto favorecedor de los esteroides sexuales sobre la estimulación por GHRP de GH.

Estos datos parecen contraponerse a los nuestros, pero en realidad son difícilmente comparables. Las dosis de GHRP empleadas por Sartor y sus colaboradores son de 15 a 25 veces mayores que las empleadas por nosotros, y además los animales púberes fueron tratados con Fla 63 (Bis (4-metil 1-homo-pirazinil-thiocarbonil) disulfide), un inhibidor de la  $\beta$ -hidroxilasa que estabiliza los niveles de GH inhibiendo la secreción pulsátil, y que los mismos autores reconocen tiene complejos efectos sobre la respuesta de GH al GHRP-6.

En definitiva, el efecto de los E2 sobre la estimulación de GH por GHRP no está claro, y se necesitarían posteriores estudios sobre receptores, catecolaminas, y otros factores que puedan modular la secreción de GH para intentar explicarlos.

Resumiendo, los E2 tendrían un efecto inhibitor hipofisario sobre la secreción de GH por GRF que se

manifiesta rápidamente manteniéndose inalterado al menos en el tiempo estudiado por nosotros. Sobre la secreción por GHRP su efecto sería diferente, también directo hipofisario, pero tiempo-dependiente necesitando mas días para manifestarse, aunque la inhibición de la secreción ya es clara a las dos semanas. Desde el primer momento se afecta la liberación de SS por hipotálamo, efecto que se mantiene durante al menos dos semanas, y que sería el causante de que la BBS actuara a nivel hipofisario.

Pensamos de todas formas, que dada la gran dispersión de datos reflejada en la literatura, se hacen necesarios mas experimentos tanto añadiendo SS exógena como con Ac anti-SS para elucidar definitivamente cual es el papel desempeñado por los E2 en la neuroregulación de la GH.

#### **7.EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE T3 SOBRE LA LIBERACION DE GH POR GRF. MODIFICACION DEL EFECTO DE LA BBS.**

La síntesis y secreción de GH están en íntima dependencia de las hormonas tiroideas tanto "in vivo" como "in vitro".

El hipotiroidismo primario se asocia con disminución de la síntesis y contenido hipofisario de GH (279), niveles plasmáticos disminuidos de GH (280), y respuestas reducidas de GH al GRF (264,280,281). Por contra la administración de T3 incrementa la transcripción del gen de GH, los niveles de GH m-RNA, y la síntesis y secreción de GH (99,100,282). El tratamiento con T3, incrementa además marcadamente, la respuesta "in vitro" al GRF (95,283), mientras que "in vivo" este incremento solo se produce en las ratas hipotiroideas, pero no en las eutiroideas (284).

Además de los efectos directos sobre la pituitaria, las hormonas tiroideas pueden influenciar la producción de GHRH y SS por el hipotálamo. Las ratas hipotiroideas han mostrado tanto una disminución del contenido hipotalámico de GRF (102), como de SS (101), además de que como ya hemos indicado tienen una sensibilidad alterada a la hormona inhibidora. Es más, la adición de T3 a tejidos hipotalámicos en perfusión, induce una liberación de SS en ratas eutiroides, e incrementa hasta la normalidad el bajo contenido en SS hipotalámico de las ratas hipotiroideas (101).

Nuestros resultados muestran que las ratas tratadas durante 5 días con 75  $\mu\text{g}$  de T3 s.c. tienen muy disminuida la respuesta al GRF ( $168 \pm 18$  vs  $34 \pm 8$  ng/ml,  $\text{media} \pm \text{SEM}$ ,  $p < 0.001$ ), y la adición de BBS es inefectiva para modificar este estímulo (Gráficas 28 y 29).

La situación es como se ve muy parecida al caso de los GLC. De hecho tanto las hormonas tiroideas como los GLC parecen controlar de manera sinérgica la síntesis y secreción de GH (100). Actuando sobre las células somatotropas la T3 tendría un efecto neto estimulador y sobre el hipotálamo un efecto inhibitor mediado por la liberación de SS.

Tratamientos con T3 durante más tiempo (20 días) y a dosis menores (20  $\mu\text{g}$ ) (264), no modifican la respuesta de GH al GRF. Por lo tanto parece claro que las dosis de hormonas tiroideas empleadas y la duración del tratamiento pueden ser determinantes de cual de los 2 efectos opuestos de dichas hormonas se produce.

"In vivo", la T3 no tendría ningún efecto sobre la secreción de GH a las tres semanas (ambas acciones

de las HT se neutralizarían mutuamente), mientras que a los 5 días, el efecto predominante sería el hipotalámico inhibitor. El hecho de que la BBS no pueda actuar sobre esta secreción ya reducida indicaría que ambas sustancias estarían funcionando por el mismo mecanismo, la liberación hipotalámica de SS.

#### B) EXPERIMENTO IN VITRO.

Nuestros datos muestran que la adición de BBS a células AP de rata en cultivo, estimula de una forma dosis-dependiente la secreción de GH. Este efecto es independiente del GRF, ya que la adición a las diferentes concentraciones de BBS empleadas de GRF ( $10^{-9}$  M), resulta en un incremento de esta liberación, (a la dosis max. de BBS, los picos son  $166 \pm 5$  vs  $229 \pm 11$  ng/ml, media  $\pm$  sem,  $p < 0.001$ ) sugiriendo que ambas sustancias actuarían por mecanismos diferentes, o sobre diferentes "pools" liberables de GH. (Gráfica 30).

Los datos obtenidos por los diferentes autores que han estudiado los efectos de la BBS "in vitro", han sido diferentes. Murphy (220) no observa ningún efecto del péptido trabajando sobre células de ratas normales mientras que Westendorf (285), encuentra liberación de GH en clones celulares tumorales (GH4 C1), en células AP en perfusión continua. Por su parte Bicknell (278) también observa una liberación de GH, en cultivos monocapa de células bovinas, no aditiva además con la de GHRP, que también estimula la liberación de GH en este sistema.

Nosotros pensamos que la dispersión de los datos se debe en buena parte a las diferencias metodológicas. A pesar de haber obtenido un resultado similar, pensamos que los datos de Westendorf no son directamente comparables a los nuestros. Las células

tumorales "per se" tienen alterado su contenido genético, y por lo tanto la expresión de una proteína (como la GH) no tiene por que ser similar a como ésta se produzca en células somatotropas normales.

Los que sí podemos comparar directamente son los de Murphy (220), pero aquí las diferencias metodológicas, fundamentalmente en la separación de las células son grandes. Su grupo emplea un modelo (286), en el que la separación celular se efectúa con tripsina, y esto puede ser crítico para los resultados. Mc. Keel y Sattler, en sus estudios con melatonina, demostraron que la inhibición que ésta hormona ejerce sobre las células somatotropas "in vitro", está en dependencia directa del modelo usado para la separación celular, usando -o no-, tripsina (287). Por otra parte la adicción por Murphy de suero de caballo al medio de cultivo es otra diferencia que podría condicionar sus resultados, pero cuya influencia exacta no conocemos.

Pensamos por lo tanto que la BBS ejercería un efecto dual sobre la neuroregulación de GH, inhibiéndola cuando actúa en hipotálamo, y estimulando la secreción de la hormona actuando sobre hipófisis, si bien este segundo mecanismo sólo se pondría en marcha en determinadas circunstancias (como el tratamiento con E2), quedando normalmente en un segundo plano ante el efecto predominante de la BBS, la inhibición de la secreción de GH mediada por la SS hipotalámica.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

I. La Gastrina, no tiene ningún efecto liberador de GH "in vivo", ni "in vitro" en los modelos experimentales usados por nosotros.

II. La Bombesina inhibe la secreción de GH, tanto estimulada por el GRF como por el GHRP.

III. Las señales periféricas modulan la estimulación del GRF sobre la secreción de GH "in vivo":

a) Los Glucocorticoides inhiben este estímulo en administración aguda. Este efecto se debe a la liberación hipotalámica de Somatostatina. Su administración crónica no modifica la acción estimuladora del GRF.

b) Los Estrógenos inhiben la secreción de GH estimulada por GRF tanto en administración aguda como crónica.

c) La Triiodotironina, inhibe la secreción de GH inducida por el GRF, en administración subcrónica.

IV. Las señales periféricas, influyen en el comportamiento de la Bombesina sobre la secreción de GH estimulada por GRF "in vivo":

a) La Bombesina no modifica la inhibición previa de los Glucocorticoides en administración aguda sobre la secreción de GH inducida por GRF, lo que sugiere un mecanismo mediado por la Somatostatina.

b) La Bombesina estimula la secreción basal de GH y potencia el estímulo del GRF en la rata tratada aguda y crónicamente con Estrógenos.

c) La Bombesina no altera la inhibición previa de la Triiodotironina sobre la secreción de GH estimulada por GRF.

**V. Las señales periféricas modulan el efecto estimulador del GHRP sobre la secreción de GH "in vivo":**

a) Los Glucocorticoides inhiben la secreción de GH inducida por GHRP cuando se administran tanto aguda como crónicamente.

b) La administración aguda de Estrógenos, no modifica la secreción de GH estimulada por GHRP. Su administración crónica, inhibe dicha secreción.

**VI. Las señales periféricas también pueden modular el efecto de la Bombesina sobre la secreción de GH estimulada por GHRP "in vivo":**

a) La Bombesina potencia el efecto inhibitorio de los Glucocorticoides, tanto en administración aguda como crónica, sobre la secreción de GH inducida por GHRP.

b) La Bombesina no influye sobre la secreción de GH causada por GHRP en ratas tratadas agudamente con Estrógenos, y potencia dicho estímulo cuando los Estrógenos se administran crónicamente. Estos datos junto con los obtenidos con el GRF en las mismas condiciones, y nuestros datos "in vitro", nos hacen suponer un efecto hipofisario estimulador de la Bombesina.

**VII. La Bombesina "in vitro" induce liberación de GH por un mecanismo independiente y aditivo al del GRF.**

---->

VIII. La Bombesina ejerce por tanto un efecto dual (hipotalámico inhibitor, e hipofisario estimulador) en la neuroregulación de la secreción de GH en la rata. Las señales periféricas, pueden determinar cual de ambos mecanismos es el predominante.

**BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- VELAYOS J.L.; Sistema hipotálamo hipofisario y órganos circunventriculares. Neuroendocrinología, aspectos básicos y clínicos. pp 47-77. O. Schiaffini, Oriol, Borth, Martini, Mota (eds.). Toray, Barcelona 1.975.
- 2.- EVERITT R.J., HÖKFELT T.; Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. En: Neuroendocrinology. pp.5-31. Lightman S.L., y Everitt B.J.(eds). Blackwell Scientific Publications. Londres 1.986
- 3.-SIDMAN R.L., RAKIC P. ; Development of the human central nervous system. En: Histology and histopatology of the nervous system. pp.3-145. Haymaker W, Adams R.D., Thomas C.H. Eds Haymaker. Springfield, Illinois. 1982.
- 4.-HIS W.; Arch. Anat. Physiol.(suppl.),. 1-180. 1.895
- 5.-FASOLO A., FRANZONI M.F., y MAZZI V.; Evolution of the hypothalamo-hypophysial regulation in tetrapods. Bull. Zool. 47 (suppl.): 127-47. 1980.
- 6.-REINOSO-SUAREZ F.; Morfología del sistema neuroendocrino. En: Neuroendocrinología, aspectos básicos y clínicos. pp. 1-47. O. Schiaffini, Oriol, Borth, Martini, Mota (eds.). Toray, Barcelona 1.975.
- 7.-HEYWARD J.N.; Functional and morphological aspects of hypothalamic neurons. Physiol. Rev., 57: 574-658. 1.982.

- 8.-MILLHOUSE O.E.; A Golgi study of the descending medial forebrain bundle. *Brain Res.*, 15: 341-63. 1.969.
- 9.-CALZA L., GIARDINO L., AGNATI L.F., y BENFENATI F.; Topografía de los principales neurotransmisores y péptidos cerebrales de relevancia neuroendocrinológica. En: *Neuroendocrinología*. pp. 1-28. Müller E.E.. Asturasa internacional. Editorial ciencia 3, Madrid 1.987.
- 10.-POPA G., y FIELDING V.; Citado por Everitt (2)  
*Lancet*, 2: 238-40. 1.930
- 11-TOROK B.; Anatomy of pituitary and hypothalamus. *Acta Anat.*, 59: 84-89. 1.984
- 12.-BERGLAND R.M., y PAGE R.B.; Pituitary-Brain Vascular relations a new paradigm. *Science*, 204: 18-24. 1.979
- 13.-MORGANE P.J. y PANKSEEP J.(eds); Anatomy of the hypothalamus. Marcel Dekker. New York. 1.979
- 14.-MESTRES P.; Estructura histológica del hipotálamo. En: *Neuroendocrinología, aspectos básicos y clínicos*. pp 63-67. O. Schiaffini, Oriol, Borth, Martini, Mota (eds.). Toray, Barcelona 1.975.
- 15.-OUIMET C.C., MILLER P.E., HEMINGS H., WALAAS S.I., y GREENGARD P. ; DARPP-32 a dopamine and adenosine 3-5 monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-inervated brain regions. *Inmunocytochemical localization*. *J. Neurosci.*, 4: 111-24. 1.984
- 16.-RAMON Y CAJAL S.; *Histologie du Systeme Nerveus*, vol II. CSIC, Instituto Ramón y Cajal. Madrid 1.911.
- 17.-HARRIS G.W.; Neural control of the pituitary gland. Edward Arnold Ltd. Londres 1.955

28.-GREENSTEIN B.D.; Steroid Hormone receptors in the Brain. En: Neuroendocrinology. pp. 32-48. Lightman S.L. y Everitt B.J. (eds). Blackwell Scientific Publications. Londres 1.986.

29.-SCHOFIED J.G.; Role of cyclic 3'-5' adenosine monophosphate in the release of growth hormone in vitro. Nature, 215: 1.382-83. 1.970.

30.-GIANNATTASIO G., MACCONI D., y SPADA A.; Dopamine-inhibited adenylate cyclase in female rat adenohypofisis. Life Sci., 28: 1.605-12. 1.981.

31.-HILL M.K., MC LEOD R.M., y ORCUTT P.; Dibutyryl cyclic AMP, adenosine and guanosine blockade of the dopamine, ergocryptine and apomorphine inhibition of prolactin release in vitro. Endocrinology, 99: 1.612-17. 1.976.

32.-TARASKEVICH.P.S., y DOUGLAS W.W.; Action potentials occur in cells of the normal anterior pituitary gland and are stimulated by the hypophysiotropic peptide thyrotropin-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74: 4.064- 1.977.

33.-TASHJIAN A.H.JR., LOMEDICO M.E., y MAINA D.; Role of calcium in the thyrotropin-releasing hormone-stimulated release of prolactin from pituitary cells in culture. Biochem. Biophys. Res Commun., 81: 798-806. 1.978.

34.-GORSKI J., y GANNON F.; Current models of steroid hormone action : a critique . Ann. Rev. Physiol, 38: 425-50. 1.976.

35.-KING W.J., y GREEN G.L.; Monoclonal antibodies localize estrogen receptors in the nuclei of the target cells. Nature, 307: 745-7. 1.984

36.-HINKLE P.M., y TASHJIAN A.H.JR.; Thyrotropin releasing hormone regulates the number of its own recep-

tors in the GH3 strain of pituitary cells in culture. *Biochemistry*, 14: 3.845-51. 1.975.

37.-DE MEYTS., ROTH J., NEVILLE D.M. JR., GAVIN R.J. III, y LESNIALE A.M.; Insuline interactions with its receptors: experimental evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 55: 154-61. 1.973.

38.-PERONE M.H., y HINKLE P.M.; Regulation of pituitary receptors for thyrotropin-releasing hormone by thyroid hormones. *J. Biol. Chem*, 253: 5.168-73. 1.978.

39.-EVANS H.M.; Harvey Lectures vol. 19.pp.212. Academic Press. New York-London. 1.923-24.

40.-ASCHNER B.; Uber die function der hypophyse. *Pluegers Arch*, f146: 1-8. 1.912.

41.-EVANS H.M., LONG J.A.; The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity and oestrus cycles of the rat. *Anat. Rec*, 21: 62-7. 1.921

42.-SMITH P.E.; Hypophysectomy and replacement therapy in the rat. *Am. J. Anat*, 45: 205-8. 1.930

43.-LI C.H., EVANS H.M., SIMPSON M.E.; Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. *J. Biol. Chem*, 159: 353-6. 1.945.

44.-LI C.H.; The chemistry of human pituitary growth hormone. En Pecile A., Müller E.E. (eds); Growth hormone. pp. 1.956-66. Excerpta Medica Foundation International Congress Series, n.º 158. Princeton, N.J. 1.968.

45.-BERSON S.A., YALOW R.; Radioimmunoassays of peptide hormones in plasma. *N. Engl.J.Med.*, 277: 640-8. 1.967

46.-GUISADO S., ESQUEMA C., y MORA O.A.; Control neuroendocrino de la secreción de la hormona de crecimiento. *Endocrinología*, 34: 163-73. 1.987

47.-GIORDANO G., GIUSTI M.; Participación del sistema nervioso central en la patogénesis de los síndromes de hipo o hipersecreción de hormona de crecimiento. En: *Neuroendocrinología aspectos experimentales y clínicos*.pp. 331-87. E.E. Müller. Asturasa internacional y Editorial ciencia 3, S.A. Madrid, 1987.

48.-JOHNSTON D.G., DAVIES R.R., y PRESCOTT R.W.G.; Regulation of growth hormone secretion in man: *J.Royal. Soc.Med.*, 78: 319-27. 1.985.

49.-BERCU B.B., y DIAMOND JR. F.B.; Growth hormone neurosecretory disfunction. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 15: 537-90. 1.986

40.-GOLUBOLL L.G., y EZRIN C.; Effect of pregnancy in the somatotrophs and the prolactin cells of the adenohypophysis. *J. Clin. Encocrinol. Metab.*, 29: 1.533-38. 1.969.

51.-HO K.Y., EVANS W.S., y THORNER M.O.; Disorders of prolactin and Growth hormone secretion. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 14: 1-32. 1.985.

52.-WEITZMAN E.D.; Circadian rhythms and episodic hormone secretion in man. *Annu. Rev. Med.*, 27: 225-43. 1.976 (5.M)

53.-GOLDSMITH S.J., y GLICK S.M.; Rhythmicity of human growth hormone secretion. *Mount Sinai J. Med.*, 37: 501-9. 1.970.

54.-SPITILLOS B.E., AUGUST G.P., y HUNG W.; Growth hormone neurosecretory disfunction. A treatable cause of short estature. *JAMA*, 251: 2.223-30. 1.984.

55.-MILLER J.D., TANNEMBAUM G.S., COLLE E., y GUYDA H.J.; Daytime pulsatile growth hormone secretion during childhood and adolescence. J. Clin. Endocrinol. Metab., 55: 989-94. 1.982

56.-MINAMITANI M., CHIHARA K., IWASABI J., MATSUKURA S., FAJITA T.; Atenuation by hipocalcemia of pulsatile growth hormone secretion in conscious male rats. Neuroendocrinology, 35: 405-10. 1.982

57.-TERRY L.C., EPELBAUM J., MARTIN J.B.; Monosodium glutamate acut and cronic effects on rhythmic growth hormone and prolactin secretion, and somatostatin in the indisturbed male rats. Brain Res, 217: 129-36. 1.981.

58.-BLOCH B., LING N., BENOIT R., WEHREMBERG W.B., y GUILLEMIN R.; Specific depletion of immunoreactive growth hormone releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. Nature, 307: 272-6. 1.984.

59.-MC CORMICK G.F., MILLARD W.J., BADGER T.M., BOWERS C.Y., y MARTIN J.B.; Dose-response characteristics of various peptides with growth hormone releasing activity in the unanesthetized male rat. Endocrinology, 117: 97-105. 1.985.

60.-WEHREMBERG W.B., BLOCK B., CHONG-LI Z., BRAZEAU P., LING N., y GUILLEMIN R.; Pituitary responses to growth hormone-releasing factor in rats with functional or anatomical lesions of the central nervous system that inhibit endogenous growth hormone secretion. Regul. Pept, 8: 1-12. 1.984.

61.-TANNEMBUM G.S., EIKELBOON R., y LING N.; Human pancreatic GH-releasing factor analog restores hig-amplitude GH pulses in CNS lesioned, induced GH deficiency. Endocrinology, 113: 1.173-81. 1.983.

62.-CELLA S.G., LOCATELLI V., DE GENARO V., PUGGIONI R., PINTOR C. , y MULLER E.E.; Human pancreatic growth hormone (GH)-releasing hormone stimulates GH synthesis and release in infant rats. An in vivo study. *Endocrinology*, 116: 574-7. 1.985.

63.-SHULMAN D.I., SWEETLAND M., DUCKITT G., y ROOT A.W.; Age-related differences in the growth hormone secretory response to h GHRH 1-44 in male rats from infancy through puberty. *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 116: 138-44. 1.987.

64.-SONNTAG W.E., HYLKA V.W., y MEITES J.; Impaired ability of old male rats to secrete growth hormone in vivo but not in vitro response to hp. GRH (1-44). *Endocrinology*, 113: 2.305-7. 1.983.

65.-SASSIN J.F., PARKER D.C., MACE J.W., GOTLIN R.W., JOHNSON L.C., y ROSMAN L.G.; Human growth hormone release: relation to slow sleep, and sleep waking cycles. *Science*, 165: 513-15. 1.969.

66.-COLLU R.; Control de la secreción de hormona de crecimiento (GH). En: *Neuroendocrinología, aspectos básicos y clínicos*. pp. 193-207. O. Schiaffini, Oriol, Borth, Martini, Mota (eds.). Toray, Barcelona 1.975.

67.-QUABBE H.J.; Growth hormone. En: *Neuroendocrinology*. pp. 409-49. Lightman S.L., y Everitt B.J. (eds). Blackwell Scientific publications. Londres. 1.986.

68.-PARKER D.C., ROSSMAN L.G., STILER T.H., RIVIER J., YEN S.S.C., GUILLEMIN R.; Inhibition of the sleep-related peak in physiological human growth hormone release by somatostatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38: 496-9. 1.974.

69.-KATO Y., DUPRE J., y BECK J.C.; Plasma growth hormone in the anesthetized rat: Effect of dibutiryl C-AMP, pros-

taglandin E., Adrenergic agents, vasopressin, Chlorpromazine, Amphetamine and L-dopa. *Endocrinology*, 93: 135-45. 1.973.

70.-CARDINALI D.P., y RITTA M.N.; The role of prostaglandins in neuroendocrine functions, studies in the pineal gland and the hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 36: 152-60. 1.983.

71.-KASTING N.W., y MARTIN J.B.; Endogenous prostaglandins affect growth hormone and thyrotropin release at a hypothalamic not a pituitary level. *Neuroendocrinology*, 39: 201-5. 1.948.

72.-FAFEUR V., GOVIN E., DRAY F.; Growth hormone releasing factor (GRF) stimulates PGE2 production in rat anterior pituitary. Evidence for a PGE2 involvement in GRF induced GH release. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 112: 725-33. 1.985.

73.-KOPELMAN P.G, y NOOAN K.; Growth hormone response to low dose intravenous injections of growth hormone releasing factor in obese and normal weight women. *Clin. Endocrinol*, 24: 157-64. 1.986.

74.-KLAPPER D.G., SVOBODA M.E., VAN W. y K.J.J.; Sequence analysis of somatomedin C: Confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 112: 2.215-7. 1.983.

75.-CLEMODS D.R., VAN WYK J.J.; Somatomedin C in blood. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 13: 113-43. 1.984

76.-CANDIL S.D., FRAGOSO J., HERVAS F.; Somatomedinas y su papel regulador en la secreción de la hormona de crecimiento. *Rev. Clin. Esp.*, 177: 307-9. 1.985.

77.-GRANT M.B., INGBORG S., RUSSELL B., HARWOOD H.J., SILVERSTEIN J., y MERIMEE T.J.; Changes in insulin-like

growth factors I and II and their binding protein after a single intramuscular injection of growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63: 981-4. 1.986.

78.-BORGES J.L., BLIZZARD R.M., y EVANS W.S.; Stimulation of growth hormone (GH) and somatomedin -C in idiopathic GH deficient subjects by intermitent pulsatile administration of synthetic human pancreatic tumour GH-releasing factor .*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 59: 1-6. 1.984

79.-HIZNKA N., TAKANO K., SHIZUME K., TANAKA I., HONDA N., y LING N.C.; Plasma growth hormone and somatomedin C response to continous growth hormone releasing factor (GRF) infussion in patients with GH deficiency. *Acta Encocrinol. (Coppenh)*, 110: 17-23. 1.985

80.-HORNER J.M., KEMP S.F., HINTZ R.L.; Growth hormone and somatomedin in insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53: 1.148-53. 1.981.

81.-GROYDER C.G., STEPHAND L.D., LAI W.H., GUYDA H. , y POSNER B.I.; Characterisation of insulin-like growth factor receptors in rat anterior pituitary, hipothalamus and brain. *Endocrinology*, 114: 1.187-95. 1.984

82.-MELMED S., y YAMASHITA S.; Insulin-like growth factor-1 action on hypothyroid rat pituitary cells: supression of triiodothyronine-induced growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*, 118: 1.483-90. 1.986.

83.-MADSEN K., FRIBERG V., ROOS P., EDEN S., y ISAKSSON O.; Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rat rib growth cartilage. *Nature*, 304: 545-7. 1.983

84.- DIEGUEZ C., PAGE M.D., PETERS J.R. Y SCANLON M.F.; Growth hormone and its modulation. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 22: 84-91. 1.988

85.-KAJI H. y HINKLE P.M.; Epidermal growth factor (EGF) decreases thyroid hormone receptors and attenuates thyroid hormone responses in GH4 C1 cells. 68 th Meeting of the Endocrine Society. Anaheim (USA). Abstract, 378. 1.984

86.-GELATO M.C., PESCOVITZ O.H., CASSORLA F., LORIAUX D.L., y MERIAM G.R.; Dose-response relationships for the effect of growth hormone releasing factor in young adult men and women. J. Endocrinol. Metab., 59: 197-201. 1.984

87.-SMALS A.E.M., PIETERS G.F.F.M., SMALS A.G.M., BENRAAD J.J., LAARHOVEN J.V., y KLOPPENBORG P.W.C .; Sex difference in human growth hormone (GH) response to intravenous human pancreatic GH-releasing hormone administration in young adults. J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 336-341. 1.986

88.-WEBB C.B., SZABO M., y FROHAMAN L.A.; Ectopic growth hormone-releasing factor and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate-stimulated growth hormone release in vitro: effects of corticosterone and estradiol. Endocrinology, 113: 1.191-6. 1.983.

89.-JANSSON J.O., EDEN S., ISAKSSON A.; Influence of gonadal steroids on age and sex-related secretory patterns of growth hormone in the rat. Endocrinology, 114: 1.287-94. 1.984

90.-LÖCKE S., CORDA R., LAMPIS A., PUGGIMI R., CELLA S.G., MÜLLER E.E. y PINTOR C.; The effect of oxalandione on the growth hormone response to growth hormone releasing hormone in children with constitutional growth delay. Clin. Endocrinol. 25: 195-200. 1.986

91.-WEHREMBERG W.B., BAIRD A., YING S.Y., y LING N.; The effects of testosterone and estrogens on the pituitary growth hormone response to growth hormone releasing factor. Biol. Rep., 32: 369-75. 1.985

92.-SMALS A.E.M., PIETERS G.F.F.M., SMALS A.G.H., BENRAAD T.J., y KLOPENBURG P.W.C.; Human pancreatic growth hormone releasing hormone fails to stimulate human growth hormone in both Cushing's disease and Cushing's syndrome due to adrenocortical adenoma. Clin. Endocrinol., 24: 401-7. 1.986

93.-OESTEROM., VERLEUNT T., y LAMBERTS S.W.J.; Human growth hormone releasing factor. J. Endocrinol., 100: 353-60. 1.984.

94.-NAKAGAWA K., MATSUBARA M., y KUBO M.; Effect of dexametosome on growth hormone response to growth hormone releasing hormone in acromegaly. J. Clin. Endocrinol. Metab., 60: 306-10. 1.985.

95.-VALE W., VAUGHAN J., YAMAMOTO G., SPIESS J., y RIVIER J.; Effects of synthetic human pancreatic GH releasing factor and somatostatin, triiodothyromine and dexametosome on GH secretion in vitro. Endocrinol, 112: 1.553-55. 1.983

96.-SEIFERTH H., PERRIN M., RIVIER J., y VALE W.; Growth hormone releasing factor binding sites in rat anterior pituitary membrane homogenates: modulation by glucocorticoids. Endocrinology, 117: 424-26. 1.985

97.-WILLIAMS T., MAXON H., THORNER M.D., FROHMAN L.A.; Blunted growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone in hypothyroidism resolves in the euthyroid state. J. Clin. Endocrinol. Metab., 61: 454-56. 1.985.

98.-CHERNANSEK S.D., UNDERWOOD L.E., UTIGER R.D., y VAN WYK J.J.; Growth hormone secretion and plasma somatomedin C in primary hypothyroidism. Clin. Endocrinol., 19: 337-44. 1.983

99.-SPINDLER S.R., MELLON S.H., BAXTER J.D.; Growth hormone gene transcription is regulated by thyroid and glucocorticoid hormones in cultured rat pituitary tumor. Cells. J. Biol., 257: 1.162-32. 1.982

100.-SHAPIRO L.E., SAMUELS H.H., YAFFE B.M.; Thyroid and glucocorticoid hormones synergistically control growth hormone mRNA in cultured GH<sub>4</sub> cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75: 45-49. 1.978.

101.-BERELOWITZ M., MACEDA K., HARRIS S., y FROHMAN L.A.; The effect of alterations in the pituitary-thyroid axis on hypothalamic content and in vitro release of somatostatin like immunoreactivity. Endocrinology, 107: 24-29. 1.980.

102.-KATAKAMI H., DOWNS T.R., y FROHMAN L.A.; Decreased hypothalamic growth hormone-releasing hormone content and pituitary responsiveness in hypothyroidism. J. Clin. Invest., 77: 1.704-11. 1.986

103.-MINAMITANI N., CHIHARA K., KAJI H., y KODOMA H.; Inhibitory effect of (Asu 1,7)-eel calcitonin on growth hormone secretion in conscious freely moving male rats. Endocrinology, 117: 347-53. 1.985

104.-TANNEMBAUM G.S., RORSTAD D., BRAZEAU P.; Effects of prolonged food deprivation on the ultradian growth hormone rhythm and somatostatin tissue cells in the rat. Endocrinology, 104: 1.733-38. 1.979.

105.-PAGE M.D., KOPPESCHAAR H.P., EDWARDS C.A., DIEGUEZ C. y SCALON M.F.; Additive effects of GRF and insulin hypoglycemia on growth hormone release in man. Clin. Endocrinol., 26: 589-95. 1.987.

106.-SHIBASAH I T., HOTTA M., MASUDA A., IMAKI T., OBARA N., DEMURA H., LORY N., y SHIZUME K.; Plasma GH respon-

ses to GH-RH and insulin induced hypoglycaemia in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., 60: 1.265-67. 1.985

107.-EVANS P.J., DIEGUEZ C., FOORD S., PETERS J.R., HALL R., y SCANLON M.F.; The effect of cholinergic blockade on the growth hormone and prolactin response to insulin hypoglycaemia. Clin. Endocrinol., 22: 733-37. 1.985

108.-VANCE M.L., KAISER D.L., RIVIER J., VALE W., THORNER M.D.; Dual effects of growth hormone (GH)-releasing hormone infusion in normal men: somatotroph desensitisation and increase in releasable GH. J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 591-94. 1.986

109.-IMAKI T., SHIBASAKI T., SHIZUME K., MASUDA A., HOTTA M.,KIYOSOWA Y., JIBIKI K., DEMURA H., TSUSHIMA T., y LING N.; The effect of glucose and free fatty acids on growth hormone (GH)-releasing factor mediated GH secretion in rats .Endocrinology, 118: 2.390-94. 1.986

110.- IMAKI T., SHIBASAKI T., SHIZUME K., MASUDA A., HOTTA M., KIYOSOWA Y., JIBIKI K., DEMURA H., TSUSHIMA T., y LING N.; The effects of glucose and free fatty acids on growth hormone (GH)-releasing factor mediated GH secretion in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., 60: 290-93. 1.985.

111.-MUGGEO M., TIENGO A., FEDELE D.; The influence of plasma tryglicerides on human growth hormone response to arginina and insulin. A study in hyperlipaemics and normal subjects. Horm. Metab. Res., 7: 367-74. 1.975.

112.-CASANUEVA F.F., VILLANUEVA L., DIEGUEZ C., DIAZ Y., CABRANES J.A., SZOKE B., SCALON M.F., SCHALLY A.V., FERNANDEZ CRUZ A.; Free fatty acids blockade of GHRH induced GH secretion in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., 65:634-40. 1.987.

113.-STEWART J.K., KOERKER D.J., y GOODNER C.J.; Effect of branched chain aminoacidus on spontaneous growth hormone secretion in the baboon. *Endocrinology*, 115: 1.597-900. 1.984.

114.-CARLSON H.E.; Inhibition of prolactin and growth hormone secretion by nickel. *Life Sci.*, 35: 1.747-54. 1.984

115.-THORLACIUS-USSING D., FLYUBJERG A., y ESMANN J.; Evidence that Selenium induces growth retardation through reduced-growth hormone and somatomedin C production. *Endocrinology*, 120: 659-63. 1.987.

116.-SNYDER S.H., e INNIS R.B.; Peptide Neurotransmitters. *Ann. Rev. Biochem*, 48: 755-82. 1.979.

117.-KRIEGER D.T.; Brain Peptides: What, where and why?. *Science*, 222: 975-85. 1.983.

118.-PEARSE A.G.E., y TAKOR T.; Embriology of the diffuse neuroendocrine system and its relationship to the common peptides. *Fed. Proc.*, 38: 2.288-94. 1.979.

119.-HÖKFELT T., JOHANSSON O., LJUNGDAHL A., LUNDBERG J.M., y SCHULTZ BERG M.; Peptidergic Neurones. *Nature*, 284: 515-21. 1.980.

120.-LE ROITH D., SHEMER J., HART C., LESNIAK M.A., SHILOACH J., ROTH J.; Evolutionary aspects of the endocrine and nervous systems. *Recent Prog. Horm. Res.*, 42: 549-87. 1.986

121.-HÖKFELT T., EVERITT B., MEISTER B., MELANDER T., SCHALLING M., JOHANSSON O., LUNDBERG J.M., HULTING A.L., WERNER S., CUELLO C., HEMMINGS H., QUIMET CH., WALAAS I., GREENGARD P., y GOODSTEIN M.; Neurons with multiple messengers with special reference to Neuroendocrine systems. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 42: 1-67. 1.986

122.-HÖEFFLER J.P., y FRAWLEY S.; Hypothalamic factors differentially affect the proportions of cells that secrete growth hormone or prolactin. *Endocrinology*, 120: 791-95. 1.987

123.-REICHLIN S.; Growth hormone content of pituitaries from rats with hypothalamic lesions. *Endocrinology*, 69: 225-30. 1-1.961.

124.-SONKSEN A.B., BRAIMBRIDGE A.M, CORRIN B., DAVIES D.R., JEREMIAH G.M., OATEN S.W., LOWY C., y WEST T.E.T.; Acromegaly caused by pulmonary carcinoid tumours. *Clin. Endocrinol*, 5: 503-13. 1.976.

125.-SHALET S.M., BEARDWELL C.G., MC FARLANE I.A., ELLISON M.L., NORMAN C.M., REES L.H., HUGHES M.; Acromegaly due to production of a growth hormone releasing factor by a bronchioid carcinoid tumour. *Clin. Endocrinol.*, 10: 61-67. 1.979.

126.-SAEED U.Z., ZAFAR M., MELLINGER R.C., FINE G., SZABO M., FROHMAN L.A.; Acromegaly associated with a bronchial carcinoid tumor: Evidence for ectopic production of growth hormone-releasing activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48: 66-71. 1.979.

127.-FROHMAN L.A., SZABO M., BERELOWITZ M., y STACHURA M.E.; Partial purification and characterization of a peptide with growth hormone releasing activity from extrapituitary tumors in patients with acromegaly. *J. Clin. Invest.*, 65: 43-54. 1980

128.-RIVIER J., SPIESS J., THORNER M., y VALE W.; Characterization of growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumor. *Nature*, 300: 276-78. 1.982.

129.-SPIESS J., RIVIER J., THORNER M., VALE W.; Sequence analysis of a growth hormone releasing factor from a

human pancreatic islet tumor. *Biochemistry*, 21: 6.037-40. 1.982.

130.-GUILLEMIN R., BRAZEAU P., BOHLEN P., ESCH F., LING N., y WEHREMBERG W.B.; Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science*, 218: 585-87. 1.982.

131.-ESCH F.S., BOHLEN P., LING N., WEHREMBERG W.B., BRAZEAU P., y GUILLEMIN R.; Characterization of a 40 residue peptide from a human pancreatic tumor with growth hormone releasing activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109: 152-58. 1.982.

132.-LANCE V., MURPHY W., SUEIRAS-DIAZ J., y COY D.; Superactive analogue of growth hormone-releasing factor (1-29) amide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 119: 265-72. 1.984

133.-MAYO K.E., VALE., RIVIER J., ROSENFELD M.G., y EVANS R.M.; Expression-cloning and sequence of a C-DNA encoding human growth hormone-releasing factor. *Nature*, 306: 86-88. 1.983

134.-FROHMAN L.A., DOWNS T.R., WILLIAMS T.C., HEIMER E.P., PAN Y.C.E., y FELIX A.M.; Rapid enzymatic degradation of growth hormone-releasing hormone by plasma in vitro and in vivo to a biologically inactive product cleaved at the NH2 terminus. *J. Clin. Invest.*, 78: 906-13. 1.986.

135.-VALE W., BILEZIKJIAN L., BILLESTRUP N., PLOTSKY P., SEIFERT H., PERRIN M., VAUGHAN J., SPIESS J. y RIVIER J.; Hypophysiotropic roles of growth hormone releasing factor. *En: Neuroendocrine Perspectives*, vol. 5, pp. 13-22. E.E. Müller y R.M. McLeod (eds). Elsevier Science Publishers B.D. Amsterdam 1.986.

- 136.-BLOCH B., BRAZEAU P., LING N., BOHLEN P., ESCH F., WEHREMBERG W.B., BENOIT R., BLOOM F., y GUILLEMIN R.; Immunohistochemical detection of growth hormone-releasing factor in brain. *Nature*, 301: 607-8. 1.983.
- 137.-LEIDY J.W., y ROBBINS R.J.; Regional distribution of human growth hormone-releasing hormone in the human hypothalamus by Radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62: 372-78. 1.986
- 138.-CHRISTOFIDES N.D., STEPHANOU A., SUZUKI H., YIANGOU Y., y BLOOM S.R.; Distribution of immunoreactive growth hormone-releasing hormone in the human brain and intestine and its productions by tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59: 747-51. 1.984
- 139.-THORNER M.O., VANCE M.L., EVANS W.S., HO K., ROGOR A.D., BLIZZARD R.M., FURLANETTO R., RIVIER J., y VALE W.; Growth hormone-releasing factor and somatomedin C production: Extrahypothalamic localization and possible functional significance. *Acta Endocrinol. (Copenh.) (suppl.)*, 276: 34-40. 1.986.
- 140.-DAYAL Y., LIN H.D., TALLBERG K., REICHLIN S., DELELLIS R.A., y WOLFE H.J.; Immunocytochemical demonstration of growth hormone releasing factor in gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. *Am. J. Clin. Pathol.*, 85: 13-20. 1.986.
- 141.-ANTONIOLI D.A., DAYAL Y., DVORAK A.M., y BANKS P.; Zollinger-Ellison syndrome. Cure by surgical resection of a jejunal gastrinoma containing growth hormone releasing factor. *Gastroenterol*, 92: 814-23. 1.986.
- 142.-SANO T., SAITO H., YAMASAKI R., HOSOI E., KAMEYAMA K., SAITO S., HIROSE T., HIZAWA K.; Production and secretion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by pheochromocytomas. *Cancer*, 57: 1.788-93. 1.986.

143.-FROHMAN L.A., THOIMET J.L., WEBB C.B., VANCE M.L., UDERMAN H., RIVIER J., VALE W., y THORNER M.O.; Metabolic clearance and plasma disappearance rates of human pancreatic tumor growth hormone-releasing factor in man. J. Clin. Invest., 73: 1.304-11. 1.984.

144.-CRONIN M.J., ROGOL A.L., MC LEOD R.M., KEEFER D.A., LOGIN S., BORGES J.L.C., y THORNER M.O.; Biological activity of a growth hormone-releasing factor secreted by a human tumor. Am. J. Physiol., 244( Endocrinol. Metab. 7): E 346-53. 1.983.

145.-ASA S.L., KOVACS K., THORNER M.O., LEONG D.A., RIVIER J., y VALE W.; Immunohistologic localizations of growth hormone-releasing factor in human tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. 60: 423-27. 1.985.

146.- GARCIA LUNA P.P., LEAL CERRO A., MONTERO C., SCHEITHAUER B.W., CAMPANARIO A., DIEGUEZ C., ASTORGA R., Y KOVACS K.; A rare cause of acromegaly, ectopic production of growth hormone-releasing factor by a bronchial carcinoma tumor. Surg. Neurol 27: 563-68. 1.987.

147.-THORNER M.O., CRONIN M.J.; Growth hormone-releasing factor: Clinical and basic studies. En: Neuroendocrine perspectives. vol. 4, pp. 95-144. E.E. Müller, R.M. Mc. Leod y L.A. Frohman (eds). Elsevier science Publishers B.D. Amsterdam 1.985.

148.-BARINAGA M., BILEZIKZIAN L.M., VALE W.W., ROSENFELD M.G., y EVANS R.M.; Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. Nature, 314: 279-81. 1.985.

149.-WEBB CH.B., THOMINET J.L., FROHMAN L.A.; Ectopic growth hormone releasing factor stimulates growth hormone release from human somatotroph adenomas in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab., 56: 417-19. 1.983.

150.-FROHMAN L.A., JANSSON J.O.; Growth hormone releasing hormone. *Endocr. Revs.*, 7: 223-51. 1.986.

151.-GOMEZ-PAN A., RODRIGUEZ-ARNAO M.D.; Somatostatin and growth hormone releasing factor: Synthesis, Location, Metabolism and Function. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 12: 469-507. 1.983.

152.-THORNER M.O., VANCE M.L., EVANS W.S., BLIZZARD R.M., ROGOL A.D., HO K., LEONG D.A., BORGES J.L.C., CRONIN M.J., Mc. LEOD R.M., KOVACS K., ASA S., HORVATH E., FROHMAN L., FURLANETTO R., KLINGEN-SMITH G.J., BROOK CH., SMITH P., RICHLIN S., RIVIER J., y VALE W.; Physiological and clinical studies of GRF and GH. *Recent Prog. Horm. Res.* 42: 589-663. 1.986.

153.-LOOJ B.J., KRUSEMAN C.N., MUDDE A.H., FROLICH M., PIADITIS G.P., HODGKINSON S.C., Mc. LEAN C., CROSSMAN A., COY D.H., REES L.H., LOWRY P.J., y BESSER G.M.; The interaction of growth hormone releasing hormone with other hypothalamic hormones in the release of anterior pituitary hormones. *Clin Endocrinol* 24: 149-56. 1.986.

154.-LOSA M., SCHOPOL M., MULLER A., WERDER K.; Growth hormone releasing factor induces prolactin secretion in acromegalics patients but not in normal subjects. *Acta Endocr. (Copenh.)*, 109: 467-73. 1.985.

155.-KNEPEL W., SCHWANINGER M., WESEMEYER G., DOHLER K.D., y SANDOW J.; Effect of human growth hormone-releasing hormone on the release of Dynorphin-like immunoreactivity, luteinizing hormone and Follicle-stimulating hormone from rat adenohypophysis in vitro. *Endocrinology* 120: 732-738. 1.987.

156.- LARON Z., KERET R., BAUMAN B., PERTZELAN A., BEN-ZEEV Z., OLSEN D.B., COMARU-SCHALLY A.M., y SCHALLY A.V.;

Differential Diagnosis between hypothalamic and pituitary h GH deficiency with the aid of Synthetic GH-RH 1-44. Clin Endocrinol., 21: 9-12. 1.984.

157.-YOKOYA S., FRIESEN H.G.,; Human growth hormone (GH)-releasing factor stimulates and somatotostatin inhibits the release of rat GH variants. Endocrinology, 119: 2.097-15. 1.986.

158.-VANCE M.L., KAISER D.L., EVANS W.S., FURLANETTO R., VALE W., RIVIER J. y THORNER M.O.; Pulsatile growth hormone secretion in normal men during a continuous 24-hour infussion of human growth hormone releasing factor (1-40): evidence for intermitent somatostatin secretion. J. Clin. Invest., 75: 1.584-1.590. 1.985.

159.-CLAYTON R.N., y BAILEY L.C.; Somatostatin partially reverses desensitization of somatotrophs induced by growth hormone-releasing factor. J. Endocrinol, 112: 69-76. 1.987.

160.- HULSE J.A., ROSENTHAL S.M., LUTTLER L., KAPLAN S.L., y GRUMBACH M.M.; The effect of pulsatile administration, continuons infussion and diurnal variation on the growt hormone (GH) response to GH-releasing hormone in normal men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 63: 872-78. 1.986.

161.- WEHREMBERG W.B., BRAZEAU P., LING N. TEXTOR G., y GUILLEMIN R.; Pituitary growth hormone response in rats during a 24-hour infussion of growth hormone-releasing factor. Endocrinology, 114: 1.613-16. 1.984.

162.- CEDA G.P., y HOFMAN A.R.;Growth hormone-releasing factor desensitization in rat anterior pituitary cells in vitro. Endocrinology, 116: 1.334-40. 1.985.

163.- WEHREMBERG W.B.; Continuous infussion of growth hormone-releasing factor: Effect on pulsatile growth

hormone secretion in normal rats. *Neuroendocrinology* 43: 391-396. 1.986.

164.- SPADA A., VALLAR L., y GIANNATTASIO G.; Alterations of the stimulating regulatory protein (Ns) of adenylate cyclase in human GH secreting adenomas. 1st. European congress of Endocrinology, Copenhagen, Abstract 2(86). 1.987.

165.- BILEZIKJIAN L.M., SEIFERT H., y VALE W.; Desensitization to growth hormone-releasing factor (GRF) is associated with down-regulation of GRF-binding sites. *Endocrinology*, 118: 2.045-52.1.986.

166.- EDWARDS C.A., DIEGUEZ C., HAM J., PETERS J.R., y SEANLON M.F.; Evidence that growth hormone depletion and uncoupling of the regulatory protein of adnylate cyclase (Ns) both contribute to the desensitization of growth hormone responses to growth hormone-releasing factor. *J. Endocrinol.* 116:185-90. 1.988.

167.- SASSOLAS G., GARRY J., COHEN R., BASTUJI. H., VERMEULEN E., CABRERA P. ROUSSEL B., y JOUVET M.; Nocturnal continuons infussion of growth hormone (GH)-releasing hormone results in a dose-dependent accentuation of episodic GH secretion in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 1.016-22. 1.986.

168.- SHEPPARD M.C., KRONHEIM S., y PIMSTONE B.L.; Stimulation by growth hormone of somatostatin release from the rat hypothalamus in vitro. *Clin. Endocrinol.*, 9:583-86. 1.978.

169.- ROSS R.J., BORGES F. GROSSMAN A. SMITH R., NGAH-FOONG L., REES L.H., SAVAGE M.O., y BESSER G.M.; Growth hormone pretreatment in man blocks the response to growth hormone-releasing hormone: evidence for a direct effect of growth hormone. *Clin. Endocrinol.*, 26: 117-23. 1.987.

- 170.- LOSA M., BOCK L. SCHOPOL J., STALLA G.K., MULLER A., y VON WERDER K.; Growth hormone releasing factor infusion does not sustain elevated GH-levels in normal subjects. *Acta Endocr. (Copenh.)*, 107: 462-70. 1.984.
- 171.- CONWAY S., Mc. CANN S.M., y KRULICH L.; On the mechanism of growth hormone autofeed-back regulation: possible role of somatostatin and growth hormone-releasing factor. *Endocrinology*, 117: 2.284-92. 1.985.
- 172.- AGUILA M.C., y Mc. CANN S.M.; Stimulation of somatostatin release in vitro by sunthetic growth hormone-releasing factor by a non dopaminergic mechanism. *Endocrinology*, 117: 762-65. 1.985.
- 173.- PETERFREUND R.A., y VALE W.W.; Somatostatin analogues inhibit somatostatin secretion from culture hypothalamus cells. *Neuroendocrinology*, 39: 397-402. 1.984.
- 174.- LUMPKIN M.D., SAMSON W.K., y Mc. CANN S.M.; Effects of intraventricular growth hormone-releasing factor on growth hormone release : further evidence for ultrashort loop feedback. *Endocrinology*, 116: 2.070-74. 1.985.
- 175.- LUMPKIN M.D., NEGRO-VILAR A., y Mc. CANN S.M.; Paradogical elevation of growth hormone by intraventricular somatostatin: possible ultrashort-loop feedback. *Science*, 211: 1.072-74. 1.981.
- 176.-DIEGUEZ C., PAGE M.D., y SCANLON M.F.;Growth hormone neuroregulation and its alterations in disease states. *Clin. Endocrinol.*,28:109-43. 1988.
- 177.- KRULICH L., DHARIWAL A.P.S., y Mc. CANN S.M. ; Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*, 83: 783-790. 1.970

178.- BRAZEAU P., VALE W., BURGUS R. LING N., BUTCHER M., RIVIER J., y GUILLEMIN R.; Hypothalamic polipeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179: 77-79. 1.973.

179.- BURGUS R. LING N., BUTCHER M. y GUILLEMIN R.; Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 684-88. 1.973.

180.- SHEN LO.P., PICKET R.L., y RUTTER W.J.; Human somatostatin I. : Sequence of the c DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 4.575-79. 1.982.

181.- HOKFELT T., EFENDIC S., HELLERSTROM C., JOHANSSON O., LUFT R., y ARIMURA A.; Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A1-cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 80 (Suppl. 200): 5-41. 1.975.

182.- PATEL Y., y REICHLIN S.; Somatostatin in hypothalamus extrahypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat. *Endocrinology*, 102: 523-30. 1.978.

183.- EPELBAUM J., BRAZEAU P., y TSANG D.; Subcellular distribution of immunoassayable somatostatin in rat brain. *Brain Res.*, 126: 309-23. 1.977.

184.- WASS J.A.H.; Growth hormone neuroregulation, and the clinical relevance of somatostatin. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 12: 695-74. 1.983.

185.- MILLAR R.P., KLAFF L.J., BARRON J.L., LEVITT N.S., y LING N.; Somatostatin-28 and somatostatin-14 supression of arginine, insulin and TRH-stimulated GH and PRL secretion in man. *Clin. Endocrinol.*, 18: 277-85. 1.983.

- 186.- SRIKANT C.B., y PATEL Y.C.; Receptor binding of somatostatin-28 is tissue specific. *Nature*, 294: 259-60. 1.981.
- 187.- MOYSE E., LE DAFNIET J., EPELBAUM P., PAGESY F., PEILLON P., KORDON C., y ENJALBERT A.; Somatostatin receptors in human growth hormone and prolactin secreting pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61: 98-103. 1.985.
- 188.- VALE W., BRAZEAU P., y RIVIER C.; Somatostatin. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 31: 365-97. 1.975.
- 189.- ROBBINS R.L., SUTTON R.E., y REICHLIN S.; Sodium and calcium-dependent somatostatin release from dissociated cerebral cortical cells in culture. *Endocrinology* 110: 496-99. 1.982.
- 190.- RICHARDSON S., y TWENTE S.; Mouse hypothalamic somatostatin release: roles of calcium and calmodulin. *Endocrinology*, 117: 369-75. 1.985.
- 191.- MULLER E.E., PANERAI A., COCCHI D., GIL-AD I., ROSSI G., y OLGATI V.; Growth hormone releasing activity of thyrotropin-releasing hormone in rats with hypothalamic lesions. *Endocrinology* 100: 1.663-71. 1.977.
- 192.- KATAKAMI H., ARIMURA I., y FROHMAN L.; Hypothalamic somatostatin mediating the suppression of growth hormone secretion by centrally administration of thyrotropin releasing hormone in conscious rats. *Endocrinology*, 117: 1.139-44. 1.985.
- 193.- RIVIER C., y VALE W.; Corticotropin-releasing factor (CRF), acts centrally to inhibit growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 114: 2.409-11.1.984.
- 194.- REHFELD J.F.; Gastrin in Multiple signals systems: Occurrence and Processing in Corticotrops, Melanotrops,

and Pituitary Neurons. En: Biogenetics of Neurohormonal Peptides. Academic Press. London. 1.985.

195.- VANDERHAEGHEN J.J., SIGNEAU J.C., y GEPTS W.; New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. Nature, 257: 604-5. 1.975.

196.- DOCKRAY G.J.; Immunochemical evidence of cholecystokinin peptides in brain. Nature, 264: 568-70. 1.976.

197.- ROBBERECHT P., DESCHODT-LANKMAN M., y VANDERHAEGHEN J.J.; Demonstration of biological activity of brain gastrin-like peptidic material in the human: Its relationship with the COOH-terminal octapeptide of cholecystokinin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75: 524-28. 1.978.

198.- REHFELD J.F.; Localisations of gastrins to neuro and adenohypophysis. Nature, 271: 771-73. 1.978.

199.- REHFELD J.F., GOLTERMANN N., LARSSON I., EMSON P.M., Y LEL C.M.; Gastrin and cholecystokinin in central and peripheral neurons. Fek. Proc. 38: 2.325-29. 1.979.

200.- LOREN I., ALUMETS J., HAKANSON R. y SUNDLER F.; Distributions of gastrin and CCK-like peptides in rat brain. Histochemistry 59: 249-57. 1.979.

201.- VANDERHAEGHEN J.J. , LOTSTRA F., DE MEY J., y GILLES C.; Immunohistochemical localization of cholecystokinin and gastrin like peptides in the brain and hypophysis of the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 1.190-94. 1.980.

202.- WIBORG O., BERGLUND L., BOEZ E., NORRIS K., REHFELD J.F., MARCKER K.A. y VAUST J.; Isolation and characterization of human gastrin-gene. Proc. Natt. Acad. Sci. USA. 79: 1.049-53. 1.984.

203.- BUENO L., HONDE C., y FIORAMONTI J.; Proglumide: selective antagonism of the rumination but not gastric motor effects induced by pentagastrin in sheep. *Life Sci.* 34: 475-81. 1.984.

204.- TEPPERMAN B.L., y EVERED M.D.; Gastrin injected into the lateral hypothalamus stimulates secretion of gastric acid in rats. *Science* 209: 1142-43. 1980.

205.- MANAKER S., ACKERMANN H., y WEINER H; Intracerebroventricular pentagastrin fails to affect feeding and acid secretion in the rat. *Physiol. Behavior* 23: 395-96. 1.979.

206.- ITOH S., HIROTA R., KATSUURA G., y ODAGUCHI K.; Supressive effect of pentagastrin on pituitary adrenocortical secretion. *Endocrinol. Japan* 26: 741-44. 1.979.

207.- VIJAYAN E., SAMSON W.K., y Mc CANN S.; Effects of intraventricular injection of gastrin on release of LH, PRL, TSH and GH in conscious ovariectomized rats. *Life Sci.* 23: 2.225-32. 1.978.

208.- ANASTASIA A., ERSPARMER V., Y BUCCI H.; Isolation and structure of bombesin and altesyn, two analogous active peptides from the skin of European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia* 27: 166-67. 1.971.

209.- ERSPARMER E., y MELCHIOPRI P.; Amphibian Skin peptides and mamalian neuropeptides. En: *Growth Hormone and other biologically active peptides.* A. Pecille y E. Müller (eds) pp. 185-200. *Excerpta Medica.* Amsterdam, 1.980.

210.- Mc. DONALD T.J. JORNAVALL H., NILSSON G., VAGNET M., GHATEIM., BLOOM S.R., y MUTT V.; Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 227-33. 1.979.

211.- Mc. DONALD T.J., GHATEI M., BLOOM S.R., TRACK N., RADZIUK J., DUPRE J. y MUTT V.; A cualitative comparison of canine plasma gastroenteropancreatic hormone responses to bombesin and the porcine gastrin releasing peptide (GRP). *Regulat Peptides* 2: 294-304. 1.981.

212.- ROTH K., EVAS C.J., LORENZ R., WEBER E., BARCHAS J., y CHANG J.K.; Identification of GRP-related sustances in guinea pig and rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 528-36. 1.983.

213.- ROTH K., WEBER E., y BARCHAS J.; Distribution of gastrin releasing peptide-Bombesin-like Immunostaining in rat Brain. *Brain Res* 251: 277-282. 1.982.

214.- VILLAREAL J. y BROWN M.R.; Bombesin-like peptides in hypothalamus: chemical and immunological characterization. *Life Sci.*, 23: 2.279-34. 1.978.

215.- MOODY T.W., O'DONOHUE T.L., y JACOBOWITZ DM.; Biochemical localization and caracterizarion of bombesin-like peptides in discrete regions of rat brain. *Peptides* 2: 75-81. 1.981.

216.- KRIEGUER D.T., y MARTIN J.B.; Brain Peptides. *N. Engl. J. Med.* 304: 876-944. 1.981.

217.- MOODY T.W., THOA N.B., O'DONOHUE T.C., y PERT B.C.; Bombesin-like peptides in rat brain: localization in sinaptosomes and release from hypothalamic slices. *Life Sci.* 26: 1.707-12. 1980.

218.- MOODY T.W., PERT B.C., RIVIER J., y BROWN M.R.; Bombesin: Specific binding to rat brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 5.372-76. 1.978.

219.- BROWN M., RIVIER J., y VALE W.; Action of bombesin, thyrotropin releasing factor, postaglandin E2 and nalo-

xone on thermoregulation in the rat. Life Sci. 20: 1.681-85. 1977.

220.- MURPHY W., LANCE V., HEIMAN M., HOCART S., y COY D.; Prolongued inhibition of growt hormone secretion by peripheral inyection of bombesin is mediated by somatos-tatin in the rat. Endocrinology 117: 1.179-83. 1.985.

221.- BROWN M.R., RIVIER J., y VALE W.; Bombesin affects the central nervons system to produce hyperglycemia in rats. Life Sci. 21: 1.729-33. 1.977.

222.- MARTIN M., y GIBBS W.; Bombesin-like peptides effects in hypothalamus depend on food deprivation. Pep-tides 1: 131-34. 1.980.

223.- RIVIER C., RIVIER J., y VALE W.; The effect of bombesin and related peptidesd on Prolactin and Growt hormone secretion in the rat. Endocrinology 102: 519-22. 1.978.

224.- MATSUSHITA N., KATO Y., KATAKAMI H., SHIMATSU A., YANAIHARA N., y IMURA H.; Inhibition of prolactin secre-tion by gastrin releasing peptide (GRP) in the rat. Proc. Sci. Exp. Biol. Med. 172: 118-121. 1.983.

225.- TACHE Y., BROWN M., y COLLU R.; Effects of neuro-peptides on adenoypophyseal hormone response to Acute stress in male rats. Endocrinology 105:220-24. 1.979.

226.- MOMANY F., BOWERS C.Y. REYNOLDS G., HONG A., y NEWLANDER K.; Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone releasing peptides. Endocrinology 114: 1.531-38. 1.984.

227.- BOWERS C.Y., MOMANY F.A., REYNOLDS G.A., y HONG A.; On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically

release growth hormone. *Endocrinology* 114: 1.537-45. 1.984.

228.- SARTOR O., BOWERS C. Y., REYNOLDS G.A., y MOMANY F.A.; Variables determining the growth hormone response of His-D-Trp-D-Phe-lys-NH<sub>2</sub> in the rat. *Endocrinology* 117: 1.144-47. 1.985.

229.- SARTOR O. BOWERS C.Y., y CHANG D.; Parallel studies of His-D-Trp-Ala-Trp-Dphe-Lys-NH<sub>2</sub> and human pancreatic growth hormone-releasing factor-44-NH<sub>2</sub> in rat primary pituitary cell monolayer culture. *Endocrinology* 116: 952-57. 1.985.

230.- KÖNING J.F., y KLIPPEL R.A.; The rat brain. A stereotaxic atlas of forebrain and lower parts of the brain system. Williams and Wilkins comp., Baltimore 1.963.

231.- AGUILAR E., FERNANDEZ-GALAZ C., VATICON M.D., TEJERO A., y ORIOL A.; Oestrogen-bromocriptine interaction in the control of luteinizing hormone and prolactin secretion in the neonatally oestrogenized female rat. *J. Endocrinol.*, 97: 319-25. 1.983.

232.- PICARDI P., BERNARDI F., ROSSETI Z., y CORSINI G.; Effects of estrogens on dopamine autoreceptors in male rats. *Europ. J. Pharmacol.*, 91: 1-9. 1.983.

233.- CASANUEVA F.F., BURGUERA B., TOME M.A., LIMA L., TRESGUERRES J.A.F., DEVESA J., y DIEGUEZ C.; Depending on the time of administration, Dexametasone potentiates or blocks growth hormone-releasing hormone induced growth hormone release in man. *Neuroendocrinology* 47: 46-49. 1.988.

234.- WILLIAMS L.T., LEFKOWITZ R.J., WATANABE A.M., MATHAWAY D.R., y BESCH J.R.Jr.; Thyroid hormone regulation of  $\beta$ -adrenergic receptor number. *J. Biol. Chem.*, 252: 2787-89. 1986

235.- HERVAS F., MORREALE G., y 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. 1.975.

236.- GARCIA-ROJAS J.F. Efecto neuromodulador y/o neurotransmisor de la Gastrina y el octapéptido de colecistokina, sobre la liberación de Hormonas Hipofisarias. Universidad de Cádiz. Facultad de Medicina. Tesis Doctoral. 1.987.

237.- Mc CANN S.M.; The role of brain péptides in the control of anterior pituitary hormone secretion. En: *Neuroendocrine Perspectives* vol. 1. pp. 1-21. E.E. Müller y R.M. Mc. Leod (eds). Elsevier Biomedical Press. Amsterdam, 1982.

238.- COCCHI D.; Modelos experimentales para la investigación neuroendocrinológica. En: *Neuroendocrinología aspectos experimentales y clínicos*. p.p. 125-53. E.E. Müller. Asturasa internacional. Editorial ciencia 3. Madrid 1.987.

239.- CHIHARA K., ARIMURA A., y SCHALLY A.V.; Immunoreactive somatostatin in rat hypophyseal portal blood: Effect of anesthetics. *Endocrinology* 104: 1.434-41. 1.979.

240.- PLOTSKY P.M., y VALE W.; Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science* 230: 461-63. 1.985.

241.- STACHURA M.E.; Influence of synthetic somatostatin upon growth hormone release from perfused rat pituitaries. *Endocrinology* 99: 678-83. 1.976.

242.- TERRY L.C., WILLOUGBY J.O., BRAZEAU P., MARTIN J.B., y PATEL Y.; Antiserum to somatostatin prevents stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat. *Science* 192:565-72. 1.976.

243.- TANNENBAUM G.S., MARTIN J.B. y COLLE E.; Ultradian growth hormone Rhythm in the rat: Effects of feeding, hyperglycemia, and insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinology* 99: 720-27. 1.976.

244.- Mc. CORMICK G.F., MILLARD W.J., BADJER T.M., y MARTIN J.B.; Gonadal steroid modulation of growth hormone-releasing factor stimulated growth hormone secretion. (Abstract). *Soc. Neurosci., Annu. Meet. Soc. Neurosci., 14th, Anaheim, CA., p. 1.214. 1.984.*

245.- TANENBAUM G.S.; Growth hormone-releasing factor: Direct effects on growth hormone, glucose, and behavior via the brain. *Science* 226: 464-7. 1.984.

246.- VIJAYAN E., y Mc. CANN S.; Effects of substance P and neurotensin on growth hormone and TSH release in vivo and in vitro. *Life Sci.* 26: 321-27. 1.980.

247.- CHIARA K., ARIMURA A., COY D., y SCHALLY A.V.; Studies on the interaction of endorphins, substance P, and endogenous somatostatin in growth hormone and prolactin release in rats. *Endocrinology* 102: 281-90. 1.978.

248.- VIJAYAN E., SAMSON W.K., y Mc. CANN S.M.; In vivo and in vitro effects of cholecystokinin on gonadotropin, prolactin, GH, and TSH release in the rat. *Brain Res.*, 172: 295-302. 1.979.

249.- MURPHY W.A., MEYERS CH.A., y COY D.; Potent, highly selective inhibition of growth hormone secretion by position 4 somatostatin Analogos. *Endocrinology* 109: 491-95. 1.981.

250.- IPP E., y UNGER R.H.; Bombesin stimulates the release of insulin and glucagon but not pancreatic somatostatin from the isolated perfused dog pancreas. *Endoc. Res. Common*, 6: 37-43. 1.979.

251.- UVNAS-MOBERG K.; Decrease of plasma somatostatin-like immunoreactivity and increase of gastrin and insulin levels in peripheral venous blood of conscious dogs following infusions of pentagastrin. The possible role of vagal gastrinergic fibres as inhibitors of gastrointestinal somatostatin release. *Acta Physiol. Scand.* 115: 109-14. 1.982.

252.- ABE.H., CHIHARA K., MINAMITANI N., IWASAKI J., CHIBA T., MATSUKURA S., y FUJITA T.; Stimulation by bombesin of immunoreactive somatostatin release into rat hypophysial portal blood. *Endocrinology* 109: 229-31. 1.981.

253.- WEMRENBURG W.B., BLOCH B., y LING N.; Pituitary secretion of growth hormone in response to opioid peptides and opiates is mediated through growth hormone-releasing factor. *Neuroendocrinology* 41: 13-16. 1.985.

254.- KABAYAMA Y., KATO Y., SHIMATSU A., OHTA M., YAWAIHARA N., y IMURA H.; Inhibition by gastrin releasing peptide of growth hormone secretion induced by human pancreatic GH-releasing factor in rats. *Endocrinology* 115: 649-53. 1.984.

255.- PALKOVITS M., BROWNSTEIN M.J., EIDEN L.E., BEINFELD M.C., RUSSELL JH., ARIMURA A., y SZABO S.; Selective depletion of somatostatin in rat brain by cysteamine. *Brain Res.* 240: 178-80. 1.982.

256.- MILLARD W.J., SAGAR S., BADGER T.M., y MARTIN J.B.; Cysteamine effects on growth hormone secretion in the male rat. *Endocrinology* 112: 509-17. 1.983.

- 257.- KENTROTI S., DEES W.L., y Mc. CANN S.M.; Evidence for a physiological role of hypothalamic gastrin-releasing peptide to suppress growth hormone and prolactin release in the rat. Proc. Natt. Acad. Sci. USA., 85: 953-57. 1.988.
- 258.- PONTIROLI A., ALBERETTO M., RESTELLI L., y FACHINETTI A.; Effect of bombesin and ceruletide on prolactin, growth hormone, luteinizing hormone, and parathyroid hormone release in normal human males. J. Clin. Endocrinol. Metab., 51: 1.303-5. 1.980.
- 259.- EVANS R.M., BIRNBERG N.C., y ROSENFELD M.G.; Glucocorticoid and thyroid hormones transcriptionally regulate growth hormone gene expression. Proc. Natt. Acad. Sci. USA. 79: 7.659-63. 1982.
- 260.- NAKAGAWA K., ISHIZUKA T., OBARA T., MATSUBARA M., y AKIKAWA K.; Dichotomic action of glucocorticoids on growth hormone secretion. Acta Endocrinol (Copenh., 116: 165-71. 1.987.
- 261.- CEDA G.P., DAVIS R.G. y HOFFMAN R.; Glucocorticoids modulation of growth hormone secretion in vitro. Evidence for a biphasic effect on GH-releasing hormone mediated release. Acta Endocrinol (Copenh.), 114: 465-69. 1.987.
- 262.- PECILE A., y MULLER E.; Suppressive action on corticosteroids on the secretion of growth hormone. J. Endocrinol 36: 401-08. 1.966.
- 263.- WEHREMBERG W.B., BAIRD A., y LING N.; Potent interaction between glucocorticoids and growth hormone-releasing factor in vivo. Science 221: 556-58. 1.983.
- 264.- EDWARDS C.A., DIEGUEZ C., y SCANLON M.F.; Effect of hypothyroidism and glucocorticoids on the GH responses to GHRM y GHRP-6. J. Endocrinol. Imprimiéndose.

265.- EDEN S.; Age and sex related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 105: 555-60.

266.- BIRGE C.A., PEAKE G.T., MARITZ I.K., Y DAUGHADAY W.H.; Radioimmunoassays of growth hormone in the rat pituitary gland: effects of age sex and hormonal state. *Endocrinology* 81: 195-204. 1.967.

267.- BURECK C.L., Y FROHMAN L.A.; Growth hormone synthesis by rat pituitaries in vitro: effect of age and sex. *Endocrinology* 86: 1.361-67. 1.970.

268.- HO K.Y., LEONG Y.N., SINHA M.L., JOHNSON M.L., EVANS W.S., Y THORNER M.O.; Sex related differences in GH secretion in rat using reverse hemolytic plaque assay. *Am. J. Physiol.* 250 (Endocrinol. Metab. 13(.): E 650-54. 1.986.

269.- EVANS W.S., KRIEG R.J., LIMBER E., R., KAISER D.L., Y THORNER M.O.; Effects of in vivo gonadal environment on in vitro h GRF-40-stimulated GH release. *Am. J. Physiol.* 249 (Endocrinol. Metab. 12): E 276-80. 1.985.

270.- KRIEG R.J., THORNER M.O., Y EVANS W.S.; Sex differences in  $\beta$ -adrenergic stimulation of growth hormone secretion in vitro. *Endocrinology* 119: 1.339-42. 1.986.

271.- FUKATA J., Y MARTIN J.; Influence of sex steroid hormones on rat growth hormone-releasing factor and somatostatin in dispersed pituitary cells. *Endocrinology* 119: 2.256-61. 1.984.

272.- SIMARD J., HUBERT J.F., HOSSEINZADEH T., Y LABRIE F.; Stimulation of growth hormone release and synthesis by estrogens on rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 119: 2.004-11. 1.986.

273.- MERIMEE T.J., BURGESS J.A., RABINOWITZ D.; Sex-determined variation in serum insulin and growth hormone response to aminoacid stimulation. New. Engl. J. Med. 280: 1.434-38. 1.969.

274.- EVANS W.S., BORGES J.L.C., VANCE M.L., KAISER D.L., ROGOL A.D., FURLANETTO R., RIVIER J., VALE W., Y THORNER M.O.; Effects of human pancreatic growth hormone releasing factor-40 on serum growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and somatomedin concentrations in normal women throughout the menstrual cycle. J. Clin. Endocrinol. Metab. 59: 1.006-10. 1.984.

275.- HO K.Y., EVANS W.S., BLIZZARD R.M., VELDUHIS J.D., MERRIAM G.R., SAMOJLIK E., FURLANETTO R., ROGOL A.D., KAISER D.L., Y THORNER M.O.; Effects of sex and age on 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. J. Clin. Endocrinol. Metab. 64: 51-58. 1.987.

276.- COPELAND K.C., JOHNSON D.M., KVEHL T.J., Y CASTRACANE D.V.; Estrogens stimulates growth hormone and somatomedin-C in castrate and intact female baboons. J. Clin. Endocrinol. Metab. 58: 698-703. 1.984.

277.- GROSS D.S.; Role of somatostatin in the modulation of hypophysial growth hormone production by gonadal steroids. Am. J. Anat., 158:507-19. 1.980.

278.- BICKNELL J., y CHAPMAN C.; Bombesin stimulates GH secretion in culture of bovine pituitary cells. Neuroendocrinology 36: 33-38. 1.983.

279.- FRANKLYN J.A., LYNAM T., DOCHERTY K. RAMSDEN D.B., y SHEPPARD H.C.; Effect of hypothyroidism on pituitary cytoplasmic concentration of messenger RNA encoding thyrotropin  $\beta$  and  $\alpha$  subunits, prolactin and growth hormone. J. Endocrinol., 108: 43-47. 1.986.

280.- ROOT J.L., DUCKETT G.F., SWEETLAND M., STRZELEKI J.A., y ROOT A.W.; Hypothyroidism blunts the growth hormone (GH) releasing effect of human pancreatic GH releasing factor in the adult male rat in vivo and in vitro. *Endocrinology* 116: 1.703-06. 1.985.

281.- DIEGUEZ C., JORDAN V., HARRIS P., FOORD S., RODRIGUEZ-ARNAO M.D., GOMEZ PAN A., HALL R., y SCANLON M.F.; Growth hormone responses to growth hormone-releasing factor (1-29) in euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid rats. *J. Endocrinol.*, 109: 53-56. 1.986.

282.- SAMUELS H., STANLEY F., y CASANOVA J.; Relationship of receptor affinity to the modulation of thyroid hormone nuclear receptor levels and growth hormone synthesis by L-triiodothyronine and iodothyronine analogues in cultured GH<sub>4</sub> cells. *J. Clin. Invest.*, 63: 1229-40. 1985

283.- WONG C.C., DOHLER D., y MULHEN A.; Effects of triiodothyronine and isotropyl-di-iodothyronine on thyroid-stimulating hormone in serum and pituitary gland and on pituitary concentrations of prolactin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on hypothyroid rats. *J. Endocrinol*, 87: 255-63. 1.980.

284.- DIEGUEZ C., FOORD S., PETERS J.R., HALL R., y SCANLON M.F.; The effects of thyroid hormone deprivation in vivo and in vitro on growth hormone (GH) responses to human pancreatic (tumor) GH-releasing factor (1-40) by dispersed rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 116: 1.066-70. 1.985.

285.- WESTENDORF J.M., y SCHONBRUNN A.; Bombesin stimulates prolactin and growth hormone release by pituitary cells in culture. *Endocrinology* 110: 352-58. 1.982.

286.- HEIMAN M.L., NEKOLA M.V., MURPHY W.A., LANCE V.A., y COY D.H.; An extremely sensitive in vitro model for

elucidating structure-activity relationships of growth hormone-releasing factor analogs. *Endocrinology*, 116: 410-15. 1.985.

287.- Mc. KEEL D.W., SATTLER C., y MARTIN J.F.; Melatonin directly inhibit rat somatotrophs cells. *Endocrinology* 110: 1.079-84.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes.  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. LUIS BENITEZ DE CASTRO

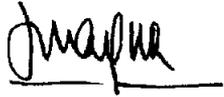
titulada EFFECTOS DE LA GASTRINA Y LA BOMBESINA  
SOBRE LA SECRECIÓN DE HORMONA DE  
CRECIMIENTO (GH) EN LA RATA

acordó otorgarle la calificación de APTO  
CUM LAUDE

*vale la  
corrección*

Sevilla, 11 de Noviembre 1988

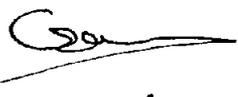
El Vocál,



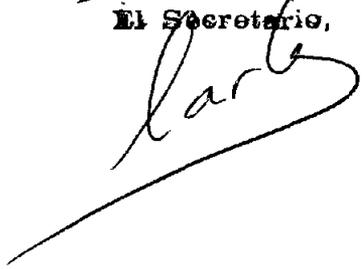
El Presidente



El Vocál,



El Secretario,



El Vocál,

El Doctorado,

