

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Control de la neurotraducción hipotalámica por los neurotransmisores cerebrales : regulación de la somastostatina hipotalámica por las catecolaminas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ignacio Torres Alemán

DIRECTOR:

Aniceto Charro Salgado

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310049719

TOR
con

"CONTROL DE LA NEUROTRADUCCION HIPOTALAMICA POR LOS
NEUROTRANSMISORES CEREBRALES: REGULACION DE LA
SOMATOSTATINA HIPOTALAMICA POR LAS CATECOLAMINAS".

Autor: IGNACIO TORRES ALEMAN

Director: DR. ANICETO L. CHARRO SALGADO

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA ANIMAL
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
AÑO 1982.



R 25.945

Autor: IGNACIO TORRES ALEMAN

Título: "CONTROL DE LA NEUROTRADUCCION HIPOTALAMICA POR
LOS NEUROTRANSMISORES CEREBRALES: REGULACION DE
LA SOMATOSTATINA HIPOTALAMICA POR LAS CATECOLAMINAS".

Director: Dr. D. Aniceto L. Charro Salgado

Profesor Adjunto de Patología General.

Facultad de Medicina. Universidad

Complutense de Madrid.

Jefe del Servicio de Metabolismo y

Nutrición. Hospital Clínico de San Carlos.

Facultad de Medicina. Universidad

Complutense de Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

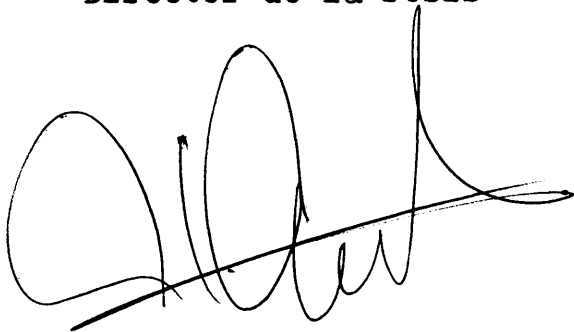
Facultad de Ciencias Biológicas.

Departamento de Fisiología Animal.

Año 1982.

Vº Bº

Director de la Tesis



Fdo.: ANICETO L. CHARRO
SALGADO

Vº Bº

El Ponente de la Tesis



Fdo.: ARSENIO FRAILE
OVEJERO

Trabajo que para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid
presenta:

IGNACIO TORRES ALEMAN



MADRID - 1982.

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo constante, no sólo científico, sino humano, del director del mismo, Dr. A.L. Charro Salgado.

Agradezco también al Prof. A. Fraile Ovejero su amabilidad, interés y apoyo al acceder ser mi Ponente en la defensa de esta tesis doctoral.

Así mismo, hago patente mi reconocimiento a las personas con cuya indispensable ayuda he podido llevar a cabo este trabajo; Dras. R. Fernandez Durango y C. Guaza, y Dr. J. Borrell, y ex-compañera F. Montiel. Además, agradezco la ayuda, comentarios y amistad de todos mis compañeros del laboratorio del Servicio de Metabolismo y Nutrición: E. Bordiú, A. Calle, L. Cabrerizo, G. López del Campo, A. López Maciá, V. Pérez Infante, M. Puente, S. Romeo y M.C. Romero, de cuyo apoyo y amistad me he beneficiado todos estos años.

Agradezco al Patronato de Investigaciones Endocrino-Metabólicas de la Fundación General Mediterránea y a la Caja de Ahorros de Madrid el apoyo económico recibido.

Además, doy las gracias al departamento de gráficas del Veterans Administration Hospital (Nueva Orleans, USA) por su estupenda labor iconográfica, y mi mujer, Concha, por su ayuda en la redacción mecanográfica de este trabajo.

Por último, agradezco a mi amigo Dr. J. Orellana todas las gestiones realizadas para que esta tesis pudiera ser leída.

I N D I C E.

INDICE.

<u>Capítulo</u>	<u>Página</u>
INTRODUCCION	
1. El eje Sistema Nervioso Central Extrahipotalámico - - Hipotálamo - Hipófisis.	1
2. Somatostatina.	6
2.1. Localización de la Somatostatina.....	7
2.2. Fisiología de la Somatostatina.....	10
2.2.1. Fisiología de la Somatostatina en el Sistema Nervioso Central.....	10
2.2.2. La Somatostatina como hormona hipofisiotropa.	14
2.2.3. Papel fisiológico de la Somatostatina en los órganos periféricos.....	17
2.3. Regulación de la secreción de Somatostatina.....	22
2.3.1. Regulación de la Somatostatina por el Sistema Nervioso Central.....	23
2.3.2. Regulación de la Somatostatina periférica.....	27
3. Catecolaminas y Hormona de Crecimiento.....	30
OBJETO DEL TRABAJO.	38

<u>Capítulo</u>	<u>Página</u>
MATERIAL Y METODOS.	
1. Animales.	42
2. Pauta experimental.	42
2.1. Administración de diferentes drogas modificadoras del metabolismo y/o la función catecolaminérgica.	43
2.2. Estudio del contenido de Somatostatina y Catecolaminas hipotalámicas y de Hormona de Crecimiento plasmática a lo largo de un ciclo ultradiano.....	45
3. Procesado de las muestras de tejido hipotalámico para determinar el contenido de Somatostatina.....	47
4. Determinación de Somatostatina por Radioinmunoensayo....	48
4.1. Iodación de Somatostatina.	48
4.1.1. Purificación de la hormona marcada.....	49
4.1.2. Criterio de pureza de la hormona marcada.	49
4.1.3. Actividad específica de la hormona marcada.	51
4.2. Titulación de los Anticuerpos.....	52
4.3. Curva Patrón.	53
4.4. Método de RIA.	53
4.5. Cálculo de los resultados.	55
4.6. Control de calidad del RIA.	56

<u>Capítulo</u>	<u>Página</u>
MATERIAL Y METODOS.	
5. Procesado de las muestras para determinación de Catecolaminas.	57
6. Análisis fluorimétrico de Catecolaminas.	57
6.1. Control de calidad del método fluorimétrico.	59
7. Radioinmunoensayo de Hormona de Crecimiento.	61
7.1. Iodación de la hormona.	62
7.2. Método de RIA.	63
8. Estudio estadístico de los resultados.	64
RESULTADOS.	
1. Puesta a punto del RIA de Somatostatina.	68
1.1. Iodación de Somatostatina.	68
1.1.1. Eficacia de la reacción de iodación.	70
1.2. Titulación de los anticuerpos.	71
1.3. Curva patrón.	74
1.4. Sensibilidad, precisión y especificidad del RIA de Somatostatina.	76
2. Catecolaminas cerebrales, Somatostatina hipotalámica y Hormona de Crecimiento plasmática.	79
2.1. Evidencias de una relación entre Catecolaminas, Somatostatina y Hormona de Crecimiento.	79

<u>Capítulo</u>	<u>Página</u>
RESULTADOS.	
2.2. Control de la Somatostatina hipotalámica y la Hormona de Crecimiento plasmática por la Dopamina.	82
2.3. Control de la Somatostatina hipotalámica y de la Hormona de Crecimiento plasmática por la Noradrenalina.	85
2.3.1. Actividad de las vias alfa-adrenérgicas y Somatostatina hipotalámica.....	89
2.3.2. Actividad de las vias beta-adrenérgicas y Somatostatina hipotalámica.....	92
2.4. Evidencias de la existencia de una interacción entre Dopamina y Noradrenalina sobre el control de la Somatostatina.	95
3. Contenido a lo largo de un ciclo ultradiano de Somatostatina y Catecolaminas en el hipotálamo y de Hormona de Crecimiento en plasma.	100
DISCUSION.	
1. Puesta a punto del radioinmunoensayo de Somatostatina...	107
2. Modulación de las Catecolaminas cerebrales: Efectos sobre la Somatostatina hipotalámica y la Hormona de Crecimiento plasmática.	110
3. Variaciones ultradianas de Somatostatina, Catecolaminas y Hormona de Crecimiento.	124

<u>Capítulo</u>	<u>Página</u>
CONCLUSIONES 129
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 133

Abreviaturas más frecuentes.-

- BSA - Albúmina Bovina (Fracción V de Cohen)
- CA - Catecolaminas
- DA - Dopamina
- EDTA - Acido etilen-diamino-tetra-acético
- GH - Hormona de Crecimiento
- GRF - Factor hipotalámico liberador de la Hormona de Crecimiento
- NA - Noradrenalina
- p/p - peso/peso
- RIA - Radioinmunoensayo
- SNC - Sistema Nervioso Central
- SNP - Sistema Nervioso Periférico
- SRIH, SRIF - Hormona hipotalámica inhibidora de la secreción de
Hormona de Crecimiento o Somatostatina
- vs - "versus"
- v/v - volumen/volumen

I N T R O D U C C I O N .

INTRODUCCION.

1. El eje Sistema Nervioso Central Extrahipotalámico - Hipotálamo - Hipófisis.

La conceptualización de este eje funcional constituido por el Sistema Nervioso Central Extrahipotalámico (SNC), el Hipotálamo y la Hipófisis, supone una jerarquización de estructuras quizás excesivamente simplista. De hecho, una linearización funcional donde se contemple al SNC como órgano rector de la actividad hipotalámica que a su vez originará una respuesta hipofisaria concreta, es una esquematización metodológica.

La cantidad de interrelaciones entre las tres estructuras funcionales es tan grande, y éstas tan complejas, que hoy en día, cuestiones tan fundamentales como qué es una hormona y qué un neurotransmisor son motivo de discusión. Sin embargo, y por motivos prácticos, esta estructura jerarquizada se mantiene como válida.

Conocida desde hacía tiempo la influencia ambiental sobre la actividad de la glándula hipofisaria, era evidente la existencia de un control nervioso sobre ésta, aun no encontrándose una inervación suficiente que la justificara. Además, distintas evidencias experimentales demostraban que el hipotálamo, zona ventral del Diencéfalo, ejercía un control positivo sobre la secreción de Corticotropina (ACTH), Gonadotropinas (LH y FSH), Tirotropina (TSH) y Hormona de Crecimiento (GH), y negativo sobre la Prolactina (PRL) y Melanotropina (MSH).

Actualmente se considera al hipotálamo como el nexo de unión entre el SNC y la hipófisis. En él se localizan y sintetizan una serie de neurohormonas de tipo peptídico que originan dos componentes funcionales principales: el sistema hipotálamo - neurohipofisario, con destino final en la "Pars Nervosa" de la glándula, y el sistema hipotálamo - anterohipofisario, que conecta con la hipófisis anterior a través de un mecanismo neuro-hemal.

Considerado entonces al SNC como primer receptor-efector de este eje, una vez que ha recogido los estímulos procedentes del ambiente externo e interno, los integra en una respuesta que es conducida a través de las distintas vías de neurotransmisión hasta las neuronas hipotalámicas de naturaleza peptidérgica.

Se han descrito vías aferentes y eferentes intra-hipotalámicas para casi todos los neurotransmisores centrales, y algunos de ellos son más abundantes en esta zona diencefálica que en cualquier otra parte del cerebro (1). Esto parece indicar que el mecanismo de regulación de la actividad hipotalámica por el SNC es muy abigarrado, y que el hipotálamo se comporta por tanto como un centro integrador de la actividad extrahipotalámica. Sus neuronas peptidérgicas constituirán una vía final común del SNC.

Una vez integrada la información procedente del SNC, el hipotálamo origina una respuesta "neurotraductora" por medio de sus factores hipotalámicos. A esta área de actuación hipotalámica se la conoce como hipotálamo endocrino (2).

A su vez, estos factores u hormonas hipotalámicas, liberándose en la Eminencia Media (EM), llegan a la hipófisis, ejerciendo un control de las células anterohipofisarias, por lo que se las denomina hormonas hipofisiotropas (ver Figura 1).

La mayoría de estas hormonas tienen una existencia hipotética porque aún no se han podido aislar y caracterizar químicamente. Sólo cuatro, la hormona liberadora de TSH o TRH, la hormona liberadora de LH y FSH o LHRH, la hormona liberadora de ACTH o CRH y la hormona inhibidora de la liberación de GH o Somatostatina (SRIH), han podido ser identificadas y secuenciadas, ya que la hormona Antidiurética (ADH) y la Oxitocina (OX), a pesar de ser de origen hipotalámico, se acumulan fundamentalmente en la hipófisis posterior y no tienen un papel hipofisiotropo demostrado (a pesar de que la ADH tiene actividad liberadora de ACTH y se ha localizado también en el sistema porta hipofisario) (3).

Un punto clave de este eje funcional lo constituye la Eminencia Media, estructura situada entre la zona ventral del hipotálamo y encima del tallo hipofisario. A ella no sólo llegan todas las eferencias peptidérgicas hipotalámicas, sino multitud de terminaciones nerviosas no peptidérgicas de origen intra y extra-hipotalámico, e incluso moléculas de origen incierto como la angiotensina II, colecistoquinina, gastrina y otras muchas recientemente descritas, resultando el conjunto un centro integrador neuroendocrino de extraordinaria complejidad (ver Figura 2).

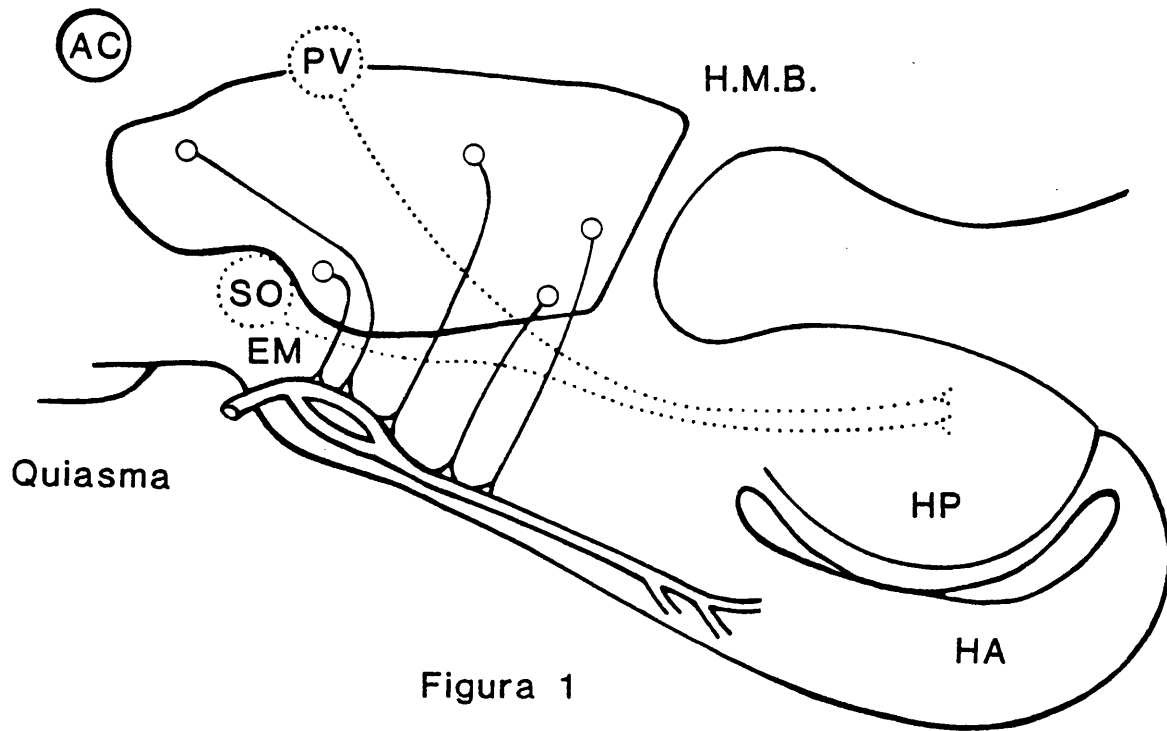


Figura 1

Figura 1. Sección sagital simplificada del hipotálamo. Se describen las dos rutas clásicas de control de la actividad hipofisaria. Línea de puntos: haz Neurohipofisario; línea continua: haz Tuberoinfundibular. H.M.B.: hipotálamo medio basal, AC: comisura anterior, PV: núcleo paraventricular, SO: n. supraóptico, HA: hipófisis anterior, HP: hipófisis posterior, EM: eminencia media. (Tomado de 4)

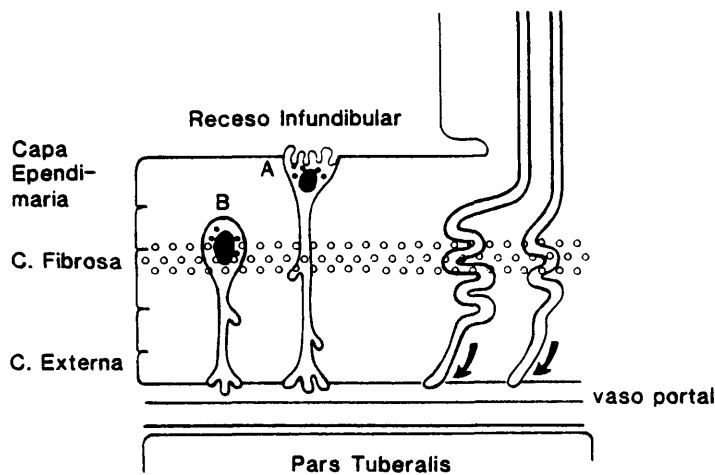


Figura 2

Figura 2. Representación esquemática de la organización de la Eminencia Media. A: célula ependimal (tanocito). B: célula glial. A la derecha de la figura se representan dos terminaciones nerviosas, una peptidérgica y otra no peptidérgica. (Modificado de 5)

Los axones que terminan en la capa externa pueden establecer sinapsis entre ellos (axo-axónicamente) e incluso con las células A y B.

La capa Fibrosa es rica en terminaciones y conexiones cuyo punto de destino es la hipófisis posterior.

2. Somatostatina.

Las primeras evidencias de un control de la Hormona de Crecimiento por el hipotálamo suponían la existencia de un factor liberador de GH o GRF, hasta que el grupo de McCann en 1968 (6) observó una actividad inhibidora de la GH al intentar caracterizar al GRF. En 1973, el grupo de Guillemin lograba aislar y secuenciar un tetradecapéptido, rebautizado como Somatostatina, a partir de hipotálamos ovinos, con actividad inhibidora de la secreción de GH en cultivos de células hipofisarias (7,8). Mas tarde, Schally y col. hacía lo mismo en hipotálamos porcinos (9), demostrándose una misma secuencia de aminoácidos para todas las especies estudiadas (10).

Diversos autores han demostrado recientemente (10,11), que junto a esta forma molecular original coexisten diversas prohormonas o precursores (pre-prohormonas) de mayor tamaño molecular (Somatostatina 25, 28..), como ocurre con la mayoría de las hormonas proteicas conocidas, y cuya significación funcional en este caso está aún por esclarecer.

Existe un sistema de catabolización rápida de la molécula de SRIH: aminopeptidasa, catepsina D y M, como ocurre también con algunos neuropéptidos. Este sistema aparece tanto en tejidos cerebrales y periféricos como en el plasma. De ahí, que el tetradecapéptido tenga una vida media en plasma muy corta, de uno a dos minutos (12).

2.1. Localización de la Somatostatina.

Al igual que ocurre con otros péptidos hipotalámicos, la SRIH no sólo se sintetiza y localiza en esta zona cerebral, sino en otras muchas. Su distribución en el organismo es particularmente profusa, desde áreas precisas del SNC hasta el conducto gastrointestinal, pasando por órganos como el páncreas y estructuras como la retina y el tiroides. Se habla entonces de una distribución "central" y otra "periférica" para esta hormona.

Esta ubicuidad de la SRIH permite encuadrarla en el sistema APUD propuesto por Pearse (13), definido a partir de unas características bioquímicas particulares de un determinado grupo celular de posible origen embriológico común, en un intento de sistematizar el fenómeno recientemente observado de la existencia de péptidos cerebrales en diversas zonas periféricas, fundamentalmente conducto gastrointestinal, y de péptidos gastrointestinales en principio, dentro del SNC.

La SRIH hipotalámica supone un 30% aproximadamente del contenido cerebral total de esta hormona (14). Todos los autores coinciden en situar las neuronas "somatostatinérgicas" intra-hipotalámicas en la zona anteroperiventricular del hipotálamo (15,16), como se puede ver en la Figura 3.

Este area proyecta terminaciones nerviosas fundamentalmente a la EM (capa interna y externa) y neurohipófisis (1,17,18), existiendo otras eferencias hacia los cuerpos mamilares (zona situada caudalmente tras el hipotálamo). Existen también terminaciones

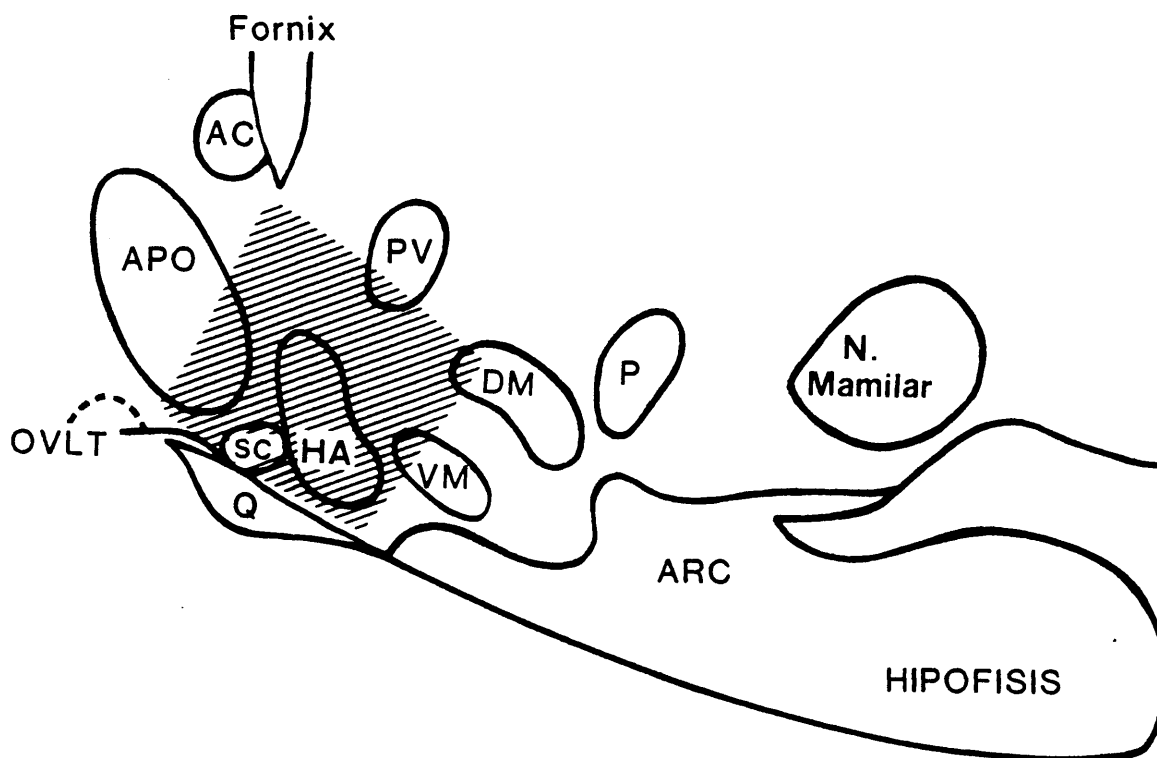


Figura 3

Figura 3. Representación esquemática de la localización intra hipotalámica de las neuronas somatostatinérgicas (area sombreada). Q: quiasma, ARC: núcleo arcuato, VM: n. ventromedial, HA: area hipotalámica anterior, SC: n. supraquiasmático, APO: area preóptica, AC: comisura anterior, PV: n. paraventricular, DM: n. dorsomedial, P: n. posterior. (Modificado de ref. 15).

en los núcleos hipotalámicos Arcuato y Supraquiasmático, e incluso en el Organo Vasculoso de la Línea Terminal, siendo particularmente profusas en el núcleo Ventromedial (19).

Se ha observado la presencia de neuronas productoras de SRIH en zonas extrahipotalámicas que incluyen la Amígdala, Hipocampo, Córtex telencefálico, Striatum, Núcleos basales telencefálicos e Interpeduncular mesencefálico (5,19,20-22), y la presencia de terminaciones somatostatinérgicas en la Corteza cerebral, Pineal, Núcleos basales, Amígdala y mesencéfalo, pertenecientes a vías de topografía desconocida, pero cuyo origen es extrahipotalámico. Esto se deduce de diversas experiencias donde las lesiones producidas en el área anteroperiventricular hipotalámica no produjeron alteraciones en el contenido de estas terminaciones (16,19,23), al igual que ocurre con diversas terminaciones somatostatinérgicas en el núcleo Ventromedial al deaferentarse el hipotálamo del resto del cerebro (19).

Existen neuronas y terminaciones ricas en SRIH también en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), tanto a nivel de la médula espinal (astas dorsales y ventrales), como en ganglios simpáticos, neuronas sensoriales primarias y terminaciones vegetativas como el vago y el ciático (24-29). En las neuronas de los ganglios paravertebrales parece coexistir con otros neurotransmisores, lo cual parece invalidar la teoría de Dale de una neurona - un solo neurotransmisor (30).

Por último, se ha detectado la presencia de células productoras de SRIH a lo largo del conducto gastrointestinal: estómago

(células D), intestino (duodeno, yeyuno, íleo y colon) y en las glándulas salivares; en el páncreas (células D), en el tiroides (células foliculares y parafoliculares), en la placenta y en la retina (células amacrinias) y pulmón (células endocrinas) (14,21, 31-36)

2.2. Fisiología de la Somatostatina.

Se ha descrito a la SRIH como un péptido de carácter inhibitorio en general, de ahí el nombre propuesto por McCann de Paninhibina. En todas las estructuras donde se ha localizado se la atribuye una influencia negativa sobre los productos de secreción (exo y endocrinos) propios de cada area.

Dada su amplia distribución, distinguimos tres niveles de actuación; como neuropéptido central, como hormona hipofisiotropa y como hormona periférica probablemente de tipo paracrino en alguno de estos últimos casos.

La tabla I (ver siguiente página) resume el amplio espectro de acción de la SRIH.

2.2.1. Fisiología de la Somatostatina en el Sistema Nervioso Central.

El hecho de que se hayan localizado neuronas centrales con inmunofluorescencia positiva para la SRIH a nivel de soma, dendritas y axón (1), y de que ésta se libere de preparaciones de sinaptosomas obtenidos de tejido cerebral (37), parece sugerir que la

Tabla I. Efectos inhibitorios de la Somatostatina en sus distintas areas de localización.

SNC	<ul style="list-style-type: none">- Actividad eléctrica espontánea e inducida de neuronas centrales.- Actividad motora y cambios en general en el comportamiento.
SNP	<ul style="list-style-type: none">- Movilidad gástrica y biliar.- Flujo sanguíneo esplácnico.- Actividad de las neuronas mioentéricas.- Inhibición de la liberación de Acetilcolina de las neuronas del plexo mioentérico.
Hipotálamo-Hipófisis	<ul style="list-style-type: none">- Secreción de GH y TSH "in vivo" e "in vitro", basal o estimulada.- Secreción de ACTH en condiciones patológicas, al igual que la de PRL.- Secreción de LH y FSH en animales ovariectomizados.- Liberación de TRH de preparaciones de hipotálamos.
Periferia	<ul style="list-style-type: none">- Secreción de Insulina, Glucagón y Polipéptido pancreático en condiciones basales o estimuladas.- Todas las hormonas gastrointestinales conocidas (Gastrina, Secretina....).- Secreción de Calcitonina.- Secreción de Renina.

Tabla I. Continuación: efectos inhibitorios de la Somatostatina en sus distintas areas de localización.

Periferia	<ul style="list-style-type: none">- Estímulo de la secreción de T_3 y T_4 tras TSH.- Secreción de ácido gástrico, pepsina, amilasa salivar y jugo exocrino pancreático.- Absorción de diversos nutrientes (glucosa, aminoácidos, triglicéridos e iones) a nivel de la pared intestinal.- Como único efecto positivo comunicado hasta ahora: aceleración de la velocidad de agregación plaquetaria.
-----------	---

SRIH ha de tener un papel fisiológico activo a nivel central. Numerosos datos parecen apoyar esta posibilidad.

La estimulación producida por el aumento de la concentración de iones K^+ en el medio de incubación origina una liberación de SRIH en preparaciones de sinaptosomas y cultivos neuronales de diversas areas cerebrales (Amígdala, Hipotálamo, Córtex, EM) de manera dependiente de la concentración previa de Ca^{++} (38-41).

El mismo efecto se observa tras la estimulación eléctrica de determinadas zonas centrales: un aumento de SRIH en sangre porta-hipofisaria (42) o una disminución de GH que se bloquea por la administración previa de anti-SRIH (43).

Esta capacidad de liberación por estímulos despolarizantes es propia de cualquier sustancia neuroactiva clásica, y junto con el hecho de que existen enzimas que desactivan rápidamente a la molécula de SRIH (4,12,44), se puede considerar que esta neurohormona cumple los cuatro requisitos propuestos por los neurofisiólogos para considerarla un neurotransmisor (2). Estos son: localización cualitativa (por inmunofluorescencia e inmunocitoquímica) y cuantitativa (por radioinmunoensayo) intraneuronal, liberación tras estimulación de tejidos neuronales, sistema enzimático propio (prosomatostatina intraneuronal como precursor y peptidasas específicas) y por último, actividad a nivel de receptor postsináptico.

Este último requisito lo cumple ampliamente, como las siguientes evidencias experimentales demuestran. La administración de SRIH intracerebroventricularmente produce cambios en la conducta de los animales de experimentación (45,46). Deprime la actividad de determinadas neuronas centrales (47-49) y periféricas (50) al ser administrada iontoforéticamente. Interacciona con sistemas de neurotransmisión clásicos como la Acetilcolina (51) y Noradrenalina (52,53), y con otros péptidos neuroactivos como los opiáceos (55) y el TRH (56) en estudios "in vivo" e "in vitro".

Además, modula los efectos de diversas drogas y neuropéptidos con actividad central (56,57). Todas estas acciones centrales de la SRIH probablemente estén mediadas por receptores propios que se han localizado a lo largo de todo el SNC, siendo especialmente abundantes en la corteza cerebral (24,58,59). El mero hecho de poseer

receptores indica que alguna función central ha de cumplir.

Su presencia en inervaciones del plexo nervioso mesentérico (34) y otras áreas del SNP, junto con su actividad moduladora del músculo liso, flujo sanguíneo y movilidad gástrica (60,61), hace pensar en vías somatostatinérgicas periféricas.

2.2.2. La Somatostatina como hormona hipofisiotropa.

Sin embargo, tanta información demostrativa de una función neuroactiva de la SRIH no ha logrado aún concluir su papel fisiológico concreto en sus distintos niveles de actuación, si exceptuamos el de inhibidor fisiológico de la secreción de GH hipofisaria, y quizás, según las últimas propuestas, de la TSH también.

Desde su primitiva caracterización como hormona inhibidora de la secreción basal o estimulada de la GH en sistemas "in vitro" o estudios "in vivo" (8,62-64), se han ido acumulando mayor número de evidencias a favor de una función activa en la fisiología de la GH.

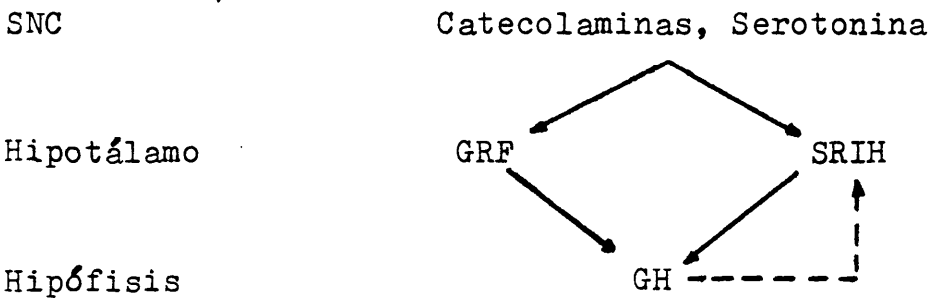
Ya en 1978 Martin y col. (65) proponían un papel concreto de la SRIH: ejercería una acción inhibidora tónica sobre las células somatotropas hipofisarias, siendo responsable junto con el GRF de la pulsatilidad circadiana típica de la GH.

Esta proposición venía apoyada por numerosos datos anteriores (66-68) y se confirmó en estudios posteriores (43,69-71), utilizando animales pretratados con suero anti-SRIH, en los que se obtenían elevaciones basales de la GH, o en respuesta a diversos estímulos, no perdiéndose sin embargo la pulsatilidad; es decir, a

pesar de que la secreción de GH se encontraba aumentada, seguían dándose picos de secreción (¿mediados por el GRF?).

Se ha descrito además, la existencia de un sistema de retroalimentación corto de la GH hipofisaria sobre la SRIH, como indica el incremento en los niveles de SRIH hipotalámica tras la administración de GH intracerebroventricularmente (72,73) o el descenso observado de SRIH en hipotálamo tras hipofisectomía (73,74).

Martin propone el siguiente esquema de control de la secreción de la GH hipofisaria (75):



La secreción del GRF y la SRIH está controlada por influencias provenientes de centros cerebrales superiores y mediadas fundamentalmente por vías monoaminérgicas. Estas dos hormonas a su vez, regulan la secreción de GH en la hipófisis, la cual es capaz a su vez de ejercer una retroalimentación negativa sobre sí misma vía SRIH.

La SRIH no sólo tiene un papel en el control de los niveles basales de GH, sino que parece estar involucrada en la respuesta de esta hormona a multitud de estímulos fisiológicos, como el estrés (63,76,77) o el ayuno (78), y farmacológicos como la hipoglucemia insulínica, la arginina, L-dopa, morfina, pentobarbital y clorpromacina (62,65,70,71), o la estimulación eléctrica (43).

En cuanto a su nivel de actuación en la célula somatotropa hipofisaria para inhibir la secreción de GH, parece ser que tras interaccionar con su receptor específico se da una alteración en el flujo de iones Ca^{++} y una disminución en los niveles de cAMP intracelular, sin saberse aún con exactitud qué mecanismo molecular es el que primero actúa (64).

Poco se ha esclarecido hasta el momento el significado fisiológico del efecto de la SRIH sobre la secreción de otras hormonas anterohipofisarias. Algunos autores han propuesto que tendría un papel activo en la regulación de la TSH hipofisaria junto con el otro factor hipotalámico responsable del control de esta hormona, el TRH (79), en base al efecto que se observa de TSH basal o estimulada por el TRH o el frío, incrementada tras la administración de suero anti-SRIH (70,80); o de TSH disminuída tras la administración de SRIH (63,66,67,81-83), o del efecto inhibitorio que ejerce la SRIH sobre la liberación de TRH en cultivos de hipotálamos (55), o del aumento observado en el contenido de SRIH en ratas hipotiroideas que explican los mismos autores como debido a una deficiencia en T₃ y T₄, ya que observan un aumento en la liberación de SRIH en ratas tratadas con T₃ (79).

Su capacidad de inhibir la LH y FSH en ratas ovariectomizadas (84), o PRL en sujetos acromegálicos (85), o ACTH en el síndrome de Nelson (85), o de esta misma hormona previamente estimulada con iones K^+ en cultivos de células hipofisarias (86), contribuye a ampliar un poco mas el ya grande espectro de actuación de esta hormona, pero no aclara su papel hipofisiotropo, si exceptuamos a la GH.

Quizás estos efectos de la SRIH puedan atribuirse a situaciones patológicas o anormales, en donde la hipófisis puede escapar al control que normalmente ejerce el hipotálamo, como de hecho ocurre en algunos tumores hipofisarios que dan lugar a respuestas paradójicas a la estimulación hipotalámica (acromegalia, hiperprolactinemias...).

2.2.3. Papel fisiológico de la Somatostatina en los órganos periféricos.

De lo poco que se sabe sobre el significado funcional que pueda tener la SRIH en los órganos de la periferia, prácticamente la totalidad de la información que se posee se centra en su fisiología pancreática y digestiva, principalmente por su posible importancia en la aplicación de terapias etiológicas en patologías tales como la diabetes, tumores pancreáticos y gástricos o úlceras gástricas.

Páncreas: Las células D pancreáticas, que constituyen el 20% del contenido celular del islote de Langerhans (24), se disponen en la periferia del mismo en amalgama con las A (productoras de Glucagón) y PP (productoras de Polipéptido pancreático, ver 24) y algunas escasas B (productoras de Insulina), siendo estas últimas el componente celular principal del núcleo del islote (87).

Esta disposición anatómica ha permitido sugerir a algunos autores la posibilidad de que la SRIH tenga un papel regulador del Glucagón fundamentalmente, a pesar de que no se haya demostrado por el momento diferentes sensibilidades de las células A y B al efecto de la SRIH (87).

La SRIH inhibe la secreción basal de Insulina y Glucagón y la respuesta de estas hormonas a diferentes secretagogos (88-92). Inhibe además al Polipéptido pancreático (PP), hormona aún poco conocida.

Esta inhibición general parece tener un significado fisiológico, ya que la administración de anti-SRIH a cultivos de islotes de Langerhans produce un aumento en la liberación de Insulina y Glucagón (93), no habiéndose determinado el efecto sobre el PP aún. Además, el páncreas tiene la capacidad de secretar SRIH de una forma basal y continua (94), tanto en sistemas "in vitro", como "in vivo", y de biosintetizarla por formación previa de un precursor de mayor peso molecular e idéntico en secuencia a la prosomatostatina de origen neural (95).

Parece ser que este efecto de la SRIH sobre las células A y B pancreáticas sería de tipo paracrino, es decir, actuaría de manera local a través de desmosomas o uniones especializadas que poseen las células del islote, sobre la secreción de Insulina y Glucagón (87). Esta acción reguladora local viene apoyada por el hecho de que las células D pancreáticas (y estomacales) parecen emitir prolongaciones citoplásmicas, en este caso a las células A, B y PP y a los vasos sanguíneos del islote, pudiendo, a través de estos contactos, y quizás mediante receptores de membrana, incidir en la actividad de estas células directa y localmente (96).

Otras observaciones que apoyan esta actividad paracrina son el que la SRIH plasmática, que existe en forma de des-Ala¹-SRIH, posee una vida media muy corta (97), lo que la incapacitaría para actuar a distancia, y que además, se ha aislado una proteína trans-

portadora de SRIH en el citoplasma de las células pancreáticas (87).

De cualquier modo, parece cierta una acción reguladora de la SRIH sobre la actividad endocrina pancreática, como indican multitud de datos. Las perfusiones en preparaciones "in vitro" e "in vivo" de SRIH producen una inhibición de la Insulina y el Glucagón, junto con una hipoglucemia (98). Se observa también una relación inversa, es decir, el Glucagón, la Insulina y la glucosa son capaces de estimular la liberación de SRIH (87,94,99). Además, diversos estímulos de la actividad endocrina del páncreas producen también un estímulo en la liberación de SRIH, como la arginina, diversos neurotransmisores y neuropéptidos (100-102), al igual que se produce una inhibición de la SRIH por estimulación de la inervación pancreática colinérgica y alfa-adrenérgica (103).

La administración intravenosa de SRIH produce una hipoglucemia inicial debida quizás, a la inhibición de las hormonas hiperglucemiantes GH y Glucagón, y a la disminución de absorción intestinal de carbohidratos a nivel intestinal (34,98), originando más tarde una hiperglucemia mediada probablemente por la marcada hipoinsulinemia que produce en paralelo (104). Este efecto de la SRIH sobre la homeostasis de la glucosa es discutido por muchos autores en una u otra forma, pero es muy probable que la SRIH incida sobre ésta a través del control de las hormonas pancreáticas.

Parece por tanto, que una parte importante de la fisiología del islote de Langerhans esté controlada por la SRIH: el hecho de que el Glucagón aumente la secreción de SRIH, sugiere que esta hor-

mona pueda controlar su propia secreción a través de la SRIH; e incluso que la SRIH esté mediando el efecto supresor de la glucosa sobre el Glucagón, ya que la glucosa estimula la secreción de SRIH.

El efecto estimulador de la glucosa sobre la Insulina o del propio Glucagón sobre esta misma hormona, no se puede explicar sin embargo, como mediado por la SRIH, ya que ambos estimulan a la propia SRIH, y ésta a su vez inhibe a la Insulina. Se ha demostrado por otra parte, que la glucosa y la SRIH actúan de manera competitiva sobre la célula B, de forma que a determinadas dosis de glucosa el efecto inhibitor de la SRIH sobre la Insulina desaparece, produciéndose un incremento en la secreción de esta hormona (105).

Conducto gastrointestinal: Las células D de la zona antral del estómago producen SRIH, estando entremezcladas con aquellas productoras de Pepsina, Gastrina y ácido gástrico en la mucosa estomacal. Tres tipos de secreción gástrica influidos de manera negativa por la SRIH (14,34,88,89).

De igual forma, las zonas productoras de SRIH intestinal (duodeno, yeyuno, íleo y colon) suelen ser ricas en sus tramos altos (duodeno y yeyuno) en Motilina, Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP), Péptido Gástrico Inhibitorio (GIP), Colecistoquinina-pancreozimina, Secretina y Glucagón entérico, sustancias todas ellas inhibidas también por la SRIH (34,106).

La SRIH no sólo inhibe la producción endocrina gastrointestinal, sino también la producción de jugo pancreático con sus

correspondientes enzimas, la amilasa de las glándulas salivares, las ya mencionadas pepsina y HCl estomacales y desciende la movilidad gastrointestinal y biliar, y el flujo sanguíneo esplácnico (34,88,89).

Estos efectos pueden ser directos sobre la célula diana, o bien a través de una inhibición previa de la Gastrina, o de la Motilina o sobre el músculo liso de los vasos sanguíneos...etc.

Todas estas acciones de la SRIH a nivel pancreático y gastrointestinal, junto con el hecho de que se ha observado que retarda la absorción de los nutrientes, bien sea por un efecto directo sobre la mucosa intestinal o por reducir el flujo sanguíneo intestinal, la hacen candidata a tener un papel importante en la homeostasis de la ingesta de nutrientes (104,107-109), supuesto que viene avalado por el hecho de que parece influir en el apetito, disminuyéndolo al ser administrada a ratas o monos (14,108). También parece facilitar la movilización de los ácidos grasos del adipocito (110).

A pesar de la multiplicidad de acciones que se describen para la SRIH a lo largo del conducto gastrointestinal, su papel fisiológico en este area aún es poco claro: parece comportarse como un modulador local de tipo paracrino en los procesos endocrinos y exocrinos del aparato digestivo, debiendo por tanto afectar de alguna manera los procesos de digestión y asimilación de los nutrientes. A este respecto, se ha descrito un papel estimulador de la SRIH a nivel de la célula oxíntica, productora de ácido gástrico, sobre la secreción de HCl (111), que apoyaría un efecto paracrino de la SRIH a este nivel, ya que en estudios

"in vivo" su efecto es el contrario, inhibe la secreción de HCl, probablemente a través de una inhibición de la Gastrina, de una forma que en este caso sería típicamente hormonal.

En cuanto a su acción en lugares como el tiroides, se ha descrito un bloqueo de la estimulación de T_3 y T_4 tras TSH por la SRIH, y que existen tumores productores de SRIH y Calcitonina en esta glándula (34,112).

En el riñón inhibe la secreción de Renina estimulada por la furosemida (34) y aumenta la diuresis (113). Todas estas acciones no son capaces por si mismas de explicar qué función puede cumplir la SRIH en estas areas.

2.3. Regulación de la secreción de Somatostatina.

No sólo es necesario saber qué acciones ejerce la SRIH en sus diferentes areas de localización, sino también cómo está influida por los diferentes sistemas de regulación (neuronales y humorales) en cada una de dichas zonas, para poder aclarar su fisiología.

El hecho de que sea una neurohormona de relativa reciente caracterización, y que su cuantificación haya planteado problemas técnicos (114), ha conducido a un desconocimiento de su regulación en términos generales. Aún así, en los últimos años la literatura al respecto es abundante, sobre todo a nivel periférico. Esto es debido, como ya apuntamos con anterioridad, al enorme interés que ha despertado en los diabetólogos el estudio de esta hormona.

Como regla general, se puede decir que la SRIH se ve regulada por distintos agentes según el lugar donde se produzca; así, un estimulador a nivel hipotalámico, puede resultar ser inhibidor a nivel pancreático. Por ello, distinguimos también distintos niveles de regulación de la secreción de SRIH. Este fenómeno apoya también el que la SRIH tenga un papel fisiológico que denominaríamos de "amplio espectro" (115).

2.3.1. Regulación de la Somatostatina por el Sistema Nervioso Central.

Debido a que las Catecolaminas son los neurotransmisores mejor conocidos en cuanto a su influencia sobre la secreción de GH hipofisaria, y que su distribución intrahipotalámica apoya una posible interacción anatómica con las neuronas somatostatinérgicas, sus efectos sobre la SRIH son los que más se han estudiado, a pesar de que los datos suelen ser contradictorios. Esto último se ha justificado en parte a las distintas metodologías usadas en cada caso.

La Dopamina (DA) es capaz de provocar la liberación de SRIH en cultivos de EM, hipotálamos, y en sangre porta hipofisaria en ratas anestesiadas (116-118), pero no en cultivos de fragmentos hipotalámicos (119). Recientemente se ha observado un efecto inhibidor de la DA en cultivos de tejido cerebral extrahipotalámico sobre la liberación de SRIH, lo cual sugeriría un efecto diferencial de la DA sobre las neuronas SRIH según la localización de éstas dentro del SNC (120).

El efecto de la Noradrenalina (NA) parece aún mas controvertido. Por una parte se ha encontrado un efecto estimulador sobre la liberación de SRIH en cultivos de EM o en sangre porta hipofisaria de ratas anestesiadas (116-118,121), pero no parece tener efecto alguno sobre la liberación de esta hormona en cultivos de hipotálamos (117,119). Estudios preliminares en ratas anestesiadas sugieren una influencia positiva de las vias beta-adrenérgicas sobre la SRIH y negativa de las alfa en su liberación a la sangre portal (121), aunque otros autores no han podido confirmarlo (119).

Otros neurotransmisores, tales como el ácido Gamma-aminobutírico (GABA) o la Acetilcolina, parecen modular de alguna manera a la SRIH de localización central. El primero de ellos, parece incrementar el contenido hipotalámico de SRIH a la vez que produce una disminución de la liberación de esta hormona a la vasculatura porta hipofisaria (122,123). Algunos autores han explicado así el efecto inhibitor del GABA sobre la GH (122), a pesar de que otros autores no han podido corroborarlo (119-124).

La Acetilcolina parece ejercer una influencia positiva sobre la liberación de SRIH en sangre porta hipofisaria de ratas anestesiadas, pero no modula de forma clara la liberación de esta hormona en cultivos mantenidos en un solo bloque o en fragmentos (117-119), e incluso se ha comunicado un efecto inhibitorio sobre la SRIH de este neurotransmisor (125).

La Serotonina (5HT), cuyos efectos sobre la GH no están aclarados, no parece afectar la secreción de SRIH ni en animales vivos, ni en cultivos de hipotálamos (117-119,124).

Sin embargo, se ha encontrado un efecto inhibitor de la 5HT sobre la liberación de SRIH en cultivos de fragmentos hipotalámicos (142,143). Además, la disminución de la secreción de GH que se observa tras la administración de metergolina (antagonista serotoninérgico a nivel del receptor) se ve paliada por la inyección simultánea de anti-SRIH, con lo que se supone que esta monoamina tendrá un efecto inhibitor tónico sobre la SRIH, a la vista de estos resultados (127). Por el contrario, la Melatonina parece tener un efecto positivo sobre su liberación (125).

Se ha estudiado también la posible influencia de diversos neuropéptidos de localización central sobre la SRIH. El VIP, parece tener un efecto negativo sobre la SRIH (124), mientras que la Neurotensina el contrario, ésta última en cultivos hipotalámicos (117,128). Estos últimos autores comunican igualmente un efecto positivo de la Bombesina sobre la liberación de SRIH a la sangre porta hipofisaria.

La llamada Sustancia P parece estimular su liberación en hipotálamos mantenidos en cultivo, pero no parece afectar a su liberación a la sangre del sistema porta o en fragmentos hipotalámicos (124,128,129). Los opiáceos endógenos (endorfinas y encefalinas) parecen no afectar la liberación de SRIH en cultivos de tejido hipotalámico o a la sangre porta en ratas anestesiadas (128,129), pero si bloquean el incremento en su liberación producido por estímulos despolarizantes en cultivos "in vitro" (130). Su liberación basal en cultivos de tejido cerebral extrahipotalámico está inhibida por la Morfina (120), y la admi-

nistración de SRIH a su vez, bloquea la respuesta de GH aumentada producida por la Morfina (132). Estos últimos datos sugieren la posibilidad de la existencia de receptores opiáceos en las neuronas somatostatinérgicas, es decir, una acción directa de los opiáceos probablemente a través de receptores "mu" (naloxona dependientes), ya que la Naloxona antagoniza el bloqueo producido en la estimulación de SRIH en cultivos "in vitro" de células hipotalámicas (expuestas en el animal vivo al estímulo por frío) por los opiáceos (131).

Para las acciones de otros neuropéptidos como la Neurotensina o la Bombesina, se ha postulado una mediación histaminérgica en vista de que su estímulo sobre la SRIH se bloquea por los antagonistas de la Histamina (129).

Se ha estudiado la interacción de la SRIH con diversas hormonas, como el TRH, que a pesar de estar modulado por esta neurohormona (55), no parece a su vez afectarla (129). La GH sin embargo, modifica claramente los niveles de SRIH en hipotálamo, incrementándolos, o bien su defecto por previa hipofisectomía provoca un descenso de la SRIH en hipotálamo (72-74, 133). Igualmente, el descenso en la liberación de GH que se observa tras la administración de GH intraventricularmente se puede explicar como mediado por un aumento previo de la SRIH (134).

2.3.2. Regulación de la Somatostatina periférica.

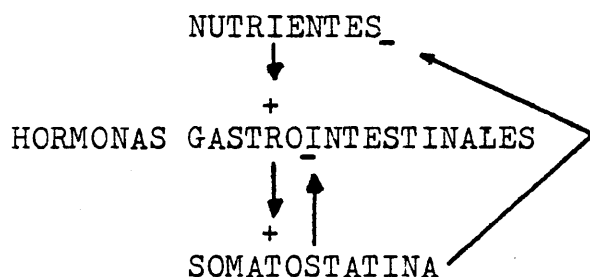
Si la SRIH se localiza a lo largo del conducto gastrointestinal y tejido pancreático, e influye en las secreciones humorales de estas áreas, es porque puede tener algún papel fisiológico en el control de la homeostasis de los nutrientes. Por la misma razón, su secreción se ha de ver afectada entonces por los diversos factores que regulan la actividad digestiva.

Se ha comprobado que efectivamente los diferentes componentes de la dieta, carbohidratos, proteínas y grasas, afectan positivamente la secreción de SRIH (135), al igual que la glucosa, arginina, leucina o una mezcla de aminoácidos y metabolitos como el lactato o los cuerpos cetónicos (136,137). Al mismo tiempo, se ha observado que es afectada también por aquellas hormonas gastrointestinales que influyen sobre las células A y B pancreáticas, como son la Secretina, VIP, GIP y Colecistoquinina-pancreozimina, e incluso la Gastrina (14,136,138), ejerciendo todas ellas un efecto estimulador sobre su liberación (139).

Esto sugiere un doble papel de la SRIH a nivel periférico, por una parte actuará como sustancia paracrina a nivel de las células pancreáticas, y por otra como hormona propiamente dicha en aquellos órganos situados alrededor de los lugares de producción de SRIH, esto es, páncreas y conducto gastrointestinal (115).

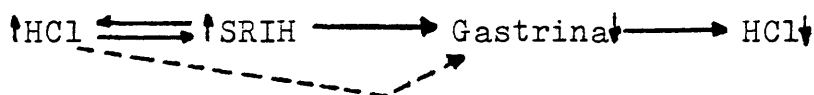
Respecto a esto último se ha propuesto una función de las células D: la SRIH controlará la absorción y utilización de los nutrientes al controlar los procesos que intervienen en este fenómeno, directa o indirectamente, y a su vez, existirá un meca-

nismo de control por retroalimentación de estos mismos nutrientes y de las hormonas digestivas sobre la SRIH, favoreciendo su acción de manera que el proceso general se podría describir como se detalla a continuación. Se consideraría por tanto a la SRIH como un sensor del "status" nutricional (88).



- Sistema de retroalimentación propuesto en la homeostasis de los nutrientes -

Se piensa también que la SRIH localizada y producida en el estómago es capaz de regular la secreción ácida estomacal mediante un mecanismo de retroalimentación de la siguiente manera:



que se basa en el hecho de que la célula D productora de SRIH se haya en íntimo contacto con las productoras de Gastrina y con las células parietales secretoras de HCl (96,139). Además, todas aquellas hormonas gástricas capaces de inhibir la secreción de HCl (VIP,GIP...) son también capaces de estimular a la SRIH.

De la misma forma, la célula D pancreática parece estar sometida a una regulación retroalimentadora por parte del Glu-

cagón y la Insulina, ya que ambas estimulan su liberación (14,87,97), e incluso la propia SRIH parece capaz de autorregularse como ocurre en parte con la Insulina (115). Parece estar regulada también por la inervación autónoma del páncreas, al igual que las células A y B.

En términos generales, se ha observado que el Simpático y el Parasimpático ejercen una acción inhibitoria sobre la liberación basal de SRIH del páncreas en estudios "in vitro" (103,140). Es decir, el control de la secreción de SRIH está llevado a cabo por factores neurales y endocrinos.

Según algunos autores, la estimulación colinérgica del páncreas produce un descenso en la liberación de SRIH por la célula D, al igual que la estimulación alfa-adrenérgica (87,101,103,140). Otros, comunican un efecto estimulador de la Acetilcolina, junto con las vías beta-adrenérgicas (14,97,100). Como se ha observado que la SRIH a su vez es capaz de inhibir la liberación de Acetilcolina, se ha postulado la posibilidad de que exista un sistema de retroalimentación entre neuronas colinérgicas intestinales y la célula D pancreática (97).

Igualmente, el GABA, cuya presencia se ha detectado en inervaciones periféricas, parece inhibir la liberación de esta hormona del páncreas (141). La Neurotensina, péptido de origen central y periférico, ejerce una acción dual, a concentraciones bajas la estimula, a concentraciones altas la inhibe (102).

La localización de opiáceos en la célula D pancreática junto con la SRIH, y el efecto de éstos sobre la secreción endocrina pancreática, hacen pensar en la posibilidad de una influencia de estos

péptidos, quizás paracrinamente, sobre la SRIH pancreática (142). De hecho, la beta-endorfina es capaz de inhibir "in vitro" a la SRIH del páncreas, y la metionina-encefalina a la gástrica (139).

Los cambios que se producen en el tejido pancreático por la manipulación del hipotálamo, han hecho pensar en una influencia central mediada por el SNP o algún mecanismo neurohumoral, sobre el islote de Langerhans, incluyendo la célula D (143,144): la glucoprivación central inducida por la administración de 2-des-oxiglucosa produce un aumento de la SRIH en plasma, o la obesidad de origen hipotalámico produce un incremento en la SRIH del páncreas, junto con alteraciones en las células D (143,145).

3. Catecolaminas y Hormona de Crecimiento.

Hay una abundante literatura documentando el efecto de las Catecolaminas cerebrales sobre la GH hipofisaria. Lo primero que se observa es la existencia de diferencias específicas. Lo que hasta ahora, y quizás por trabajar fundamentalmente con roedores, no se ha observado con la SRIH.

En su mayoría, los estudios que se han hecho sobre las posibles relaciones entre Catecolaminas (CA) y GH suelen ser de tipo farmacológico. Por ejemplo, se dedujo que las CA estaban involucradas en el control de la secreción de GH porque la administración de drogas como la Reserpina o la alfa-metil-p-tirosina (AMT), a la vez que producían una drástica disminución en el contenido cerebral de estas aminas, provocaban una caída en los niveles basales plasmáticos de GH, o tras la estimulación de esta hormona

por determinadas zonas cerebrales en la rata (146-149). O bien, la administración de L-dopa, precursor biosintético, producía una elevación de las CA centrales y de la GH plasmática en el hombre, mono y perro (150-152). Es decir, parecía aparente una influencia de las CA sobre la GH en todas las especies estudiadas.

Esta influencia positiva catecolaminérgica parece estar mediada en todas las especies fundamentalmente por vías alfa-adrenérgicas (65,153-155), ya que se ha observado que el efecto de la AMT se contrarresta por la administración del alfa-agonista Clonidina (146). Este mismo fármaco por sí solo potencia la liberación de GH, efecto que se bloquea por la administración posterior de un alfa-antagonista como la Fentolamina o la Fenoxibenzamina (151,156-159).

Por otra parte, el subsistema beta-adrenérgico parece tener un efecto negativo sobre la secreción de GH, también en la mayoría de las especies estudiadas, a pesar de que los datos al respecto son algo más confusos (65,153,155). Así, se ha observado un efecto inhibitorio sobre la GH del beta-agonista Isoproterenol en el hombre (65); sin embargo en la rata no parece tener un efecto claro sobre la secreción de esta hormona (160), al igual que el Propanolol, beta-agonista al que se le ha descrito como inhibidor de la secreción pulsátil de GH, como favorecedor de la respuesta de la GH a diversos estímulos farmacológicos en la rata y en el hombre, e incluso también como carente de efecto alguno sobre esta hormona hipofisaria (65,160-162).

El efecto global de la NA sobre la GH es complejo. Los di-

ferentes subsistemas noradrenérgicos influyen sobre la hipófisis de forma variada, hablándose incluso de actuaciones distintas a nivel intrahipotalámico que a nivel de la EM (157). En el hombre, la administración de ácido Fusárico, inhibidor de la DA-beta-hidroxi-lasa, enzima responsable de la síntesis de NA a partir de la DA, produce un aumento de la GH, lo que hablaría en favor de un efecto negativo de la NA (163), mientras que en la rata la administración de Disulfiram, bloqueante de la actividad de la misma enzima, produce lo contrario, un decremento de la GH (164). En el mono, se ha comunicado un efecto estimulador de la secreción de GH tras el incremento de la NA cerebral por la administración de un precursor, el DOPS (151), mientras que la infusión intravenosa de este mismo neurotransmisor no tenía efectos sobre la GH (165), quizás debido a la incapacidad de pasar la barrera hemato-encefálica y por lo tanto actuar a nivel central.

Si el papel de las vías beta-adrenérgicas no parece estar perfectamente establecido, el de la DA, catecolamina mas abundante en el hipotálamo, es aún mas confuso. En cuanto a la acción de este neurotransmisor en especies como el hombre, el perro y la oveja, parece haber unidad de criterios en la literatura, encontrándose un efecto positivo sobre la secreción de GH tras la administración de agonistas dopaminérgicos como la Apomorfina o el CB-154 o el Metilfenidato (156,166-170).

Sin embargo, para especies como el mono o la rata, se han comunicado todo tipo de influencias, positivas, negativas o inexistentes, tras la administración de agonistas y antagonistas dopaminérgicos (65,146-148,151,153-155,158,165,171,172).

Otros muchos neurotransmisores y neuropéptidos afectan a la secreción de GH de manera diversa, y en la mayoría de los casos, si exceptuamos a los opiáceos y al VIP, contradictoria (159,173). Probablemente, esto se deba a las diferentes acciones de estas sustancias según se estudien central o periféricamente, De cualquier forma, su influencia no está bien estudiada como en el caso de las CA.

La mayoría de los autores están de acuerdo en que el efecto de los diversos neurotransmisores y neuropéptidos afectan la función hipofisaria a través de los factores hipotalámicos y no directamente. Esta última posibilidad no se puede descartar ya que se ha comprobado la existencia de terminales nerviosos a nivel de la capa externa de la EM no sólo de origen peptidérgico (LHRH, SRIH y TRH), sino también dopaminérgicos, algunos noradrenérgicos, opiáceos, gabaérgicos, colinérgicos y vasopresinérgicos (1,19), y junto con el hecho de que se han localizado receptores DA en la hipófisis anterior (174), y que esta amina se segrega a la vascularización porta hipofisaria en cantidades suficientes como para llevar a cabo una función fisiológica (175), y que de hecho se haya localizado en el interior de la célula lactotropa (176), hace posible que tenga efectos también a nivel hipofisario. También se han localizado receptores beta-adrenérgicos y dopaminérgicos en el lóbulo intermedio hipofisario en la rata (177).

En contra de todo esto, y a pesar de que aún se mantiene la posibilidad de que efectivamente la DA sea el factor inhibidor de la PRL (PIF), sobre la célula somatotropa no se han localizado

receptores para la DA. Asimismo, se postula que todas las sustancias liberadas a nivel de la EM actúen de neurotransmisores y/o neuromoduladores a nivel de los terminales axónicos de las neuronas productoras de hormonas hipotalámicas, mediante contactos de tipo axo-axónicos.

De hecho, se ha comprobado una distribución anatómica diferencial para las terminaciones dopaminérgicas y de LHRH que apoyan la posibilidad de contactos entre ambas, e incluso de topografías semejentes para las terminaciones somatostatinérgicas y dopaminérgicas (19), a pesar de que en este último caso no se han evidenciado botones sinápticos. Además, y aunque sólo en la tortuga de momento (157), se han encontrado receptores para la DA en la EM (publicaciones anteriores no confirman este hecho, al menos en otras especies).

Otro dato que apoya un papel mediador de los factores hipotalámicos es el hecho de que la administración intravenosa de una serie de neurofármacos, entre ellos miméticos catecolaminérgicos, afectan la liberación de GH (152,157,178), probablemente actuando a nivel de la EM a través de una interacción axo-axónica con las neuronas peptidérgicas, ya que estas sustancias no son capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica que justamente empieza a establecerse a nivel de la EM, ni tienen efecto alguno directo sobre la hipófisis como se ha podido comprobar en cultivos de células hipofisarias.

La última evidencia a favor de que las hormonas hipotalámicas hipofisiotropas actúan como mediadoras, es el hecho de que se produzcan claras interacciones entre los sistemas peptidérgicos hipofisarios.

fisiotropos y las distintas sustancias neuroactivas presentes en el hipotálamo; es decir, la observada capacidad de estas moléculas de influir en la secreción de SRIH, LHRH, o TRH. "

De cualquier forma, no se puede descartar una actividad hipofisiotropa de algunas sustancias consideradas hasta hace poco como neurotransmisores, ya que de hecho, los factores hipotalámicos hipofisiotropes parecen comportarse también como neurotransmisores, y es por lo que en la actualidad los autores tienden a unificar los conceptos de neurotransmisión, neuromodulación y neurotraducción, considerándolos como distintos aspectos de un mismo y único fenómeno.

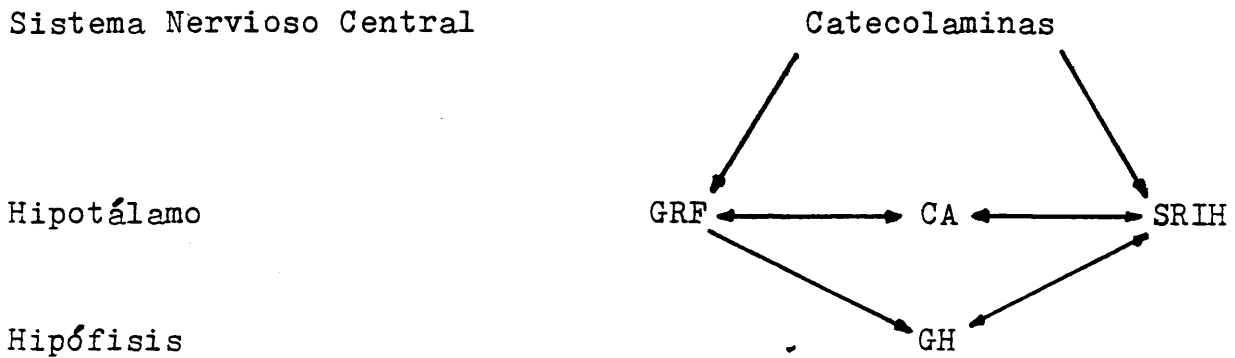
Se ha descrito un ritmo de secreción ultradiano para la GH en la rata, con pulsos de secreción máxima de aproximadamente tres horas de duración (179). Este ritmo aparece ya en las ratas prepúberes, y tiene ligeras diferencias sexuales (180), disminuyendo cuantitativamente en las ratas viejas (181).

Este ciclo es independiente del de luz-oscuridad (179), pero su sincronización horaria si que depende de la luminosidad ambiental a través, al parecer, del núcleo Arcuato hipotalámico (182). Parece por tanto, controlado por un "reloj biológico" situado en el hipotálamo anterior (183), cuya actividad estaría mediada por la SRIH y fundamentalmente por el GRF, a nivel hipotalámico (75, 184).

Así mismo, diversos neurotransmisores, fundamentalmente las CA, y en particular las vías alfa-adrenérgicas (146), son capaces de modular este patrón de secreción. Otros autores han intentado

relacionar a la DA con este ciclo, dada la ciclicidad ultradiana que presentan los niveles de esta amina en el hipotálamo, fenómeno que no observan en la NA (186).

- Relaciones posibles entre Catecolaminas, Factores hipotalámicos reguladores de la Hormona de Crecimiento y Hormona de Crecimiento.



OBJETO DEL TRABAJO.

OBJETO DEL TRABAJO

Como para el resto de las hormonas hipofisarias, se habla de un área (funcional y anatómica) hipofisiotropa hipotalámica reguladora de la Hormona de Crecimiento; área que contendría dos factores hipotalámicos, el ya descubierto inhibidor de la secreción basal y estimulada de la Hormona de Crecimiento, y el recién y parcialmente caracterizado y secuenciado (187,188) estimulador de la liberación de esta hormona hipofisaria, SRIF y GRF respectivamente.

A pesar de ello, la mayor parte de la información que se posee sobre la regulación por el Sistema Nervioso Central de la secreción de Hormona de Crecimiento hace referencia al papel de los diversos neurotransmisores (generalmente de amplia distribución en el Sistema Nervioso) en el control de esta hormona hipofisaria, omitiéndose la probable función mediadora de ambos factores hipotalámicos entre las estructuras superiores del cerebro y la glándula hipofisaria. Sin embargo, tal "omisión" era inevitable, habida cuenta que la Somatostatina ha sido caracterizada muy recientemente, y que el GRF aún permanece sin caracterizar por completo.

Gracias al desarrollo en los últimos años de técnicas cuantitativas (RIA) y cualitativas (inmunohistoquímicas fundamentalmente) para la determinación de la Somatostatina, se ha podido saber algo más sobre el papel mediador de esta neurohormona entre el Sistema Nervioso Central y la hipófisis.

El objeto y planteamiento de este estudio ha sido precisamente el intento de profundizar más en la relación entre las estructuras extra-hipotalámicas, el hipotálamo y la hipófisis, a través de las relaciones entre las Catecolaminas centrales (neurotransmisores ya clásicos, con rutas intracerebrales definidas), la Somatostatina hipotalámica y la Hormona de Crecimiento hipofisaria (determinada ésta como niveles de hormona en sangre periférica).

Multitud de trabajos relacionan a la función catecolaminérgica con la secreción de Hormona de Crecimiento (ver Introducción), pero muy poco se sabe todavía de la relación entre Catecolaminas y Somatostatina, y de qué papel, si efectivamente tiene alguno, puede ejercer la Somatostatina en la relación Catecolaminas - Hormona de Crecimiento. Además, considerándose la Somatostatina no sólo una hormona hipotalámica hipofisiotropa, sino muy probablemente también una sustancia neuromoduladora, o al menos neuroactiva a nivel extra-hipotalámico, es muy posible la existencia de una interrelación entre las Catecolaminas y la Somatostatina, como se ha descrito para otros neurotransmisores. De hecho, diversas publicaciones recientes señalan la influencia de la Somatostatina de origen hipotalámico sobre la Noradrenalina, la Dopamina y otros neurotransmisores.

Hemos diseñado dos tipos de aproximaciones al estudio de la relación Catecolaminas - Somatostatina. En la primera, hemos utilizado una serie de fármacos modificadores de la actividad catecolaminérgica (ya sea por afectar su metabolismo o su actuación a nivel de receptor) para determinar los posibles efectos de estos

cambios sobre la Somatostatina en el hipotálamo y la Hormona de Crecimiento en plasma. En el segundo, dada la existencia de un ciclo ultradiano en la liberación de la Hormona de Crecimiento a la sangre y otro ultradiano en los niveles hipotalámicos de Dopamina descritos ambos en la literatura (179,186), se estudió la posibilidad de la existencia de un comportamiento similar en niveles de Somatostatina en el hipotálamo, que fuera responsable en parte del observado para la Hormona de Crecimiento, como algunos autores han propuesto (184), y que pudiera venir influido también en parte por el existente de Dopamina.

Para ello se estudió el contenido de Catecolaminas, Somatostatina y Hormona de Crecimiento a lo largo de un ciclo ultradiano comprendido entre 9,30 de la mañana a 2,30 de la tarde (como el descrito para la Dopamina), para así intentar establecer relaciones causales entre las posibles fluctuaciones horarias de los dos neurotransmisores, la Somatostatina y la Hormona de Crecimiento.

Para todo esto, fue necesario el contar con una técnica de cuantificación de Somatostatina en tejido hipotalámico que fuera fiable, y por tanto se necesitó montar un método de RIA de Somatostatina cuyo desarrollo también se detalla en los siguientes capítulos de este trabajo.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

MATERIAL Y METODOS

1. Animales.

Se utilizan ratas Wistar adultas con un peso de 294 ± 6 gr. y 8 - 12 semanas de edad. Se situaron en una habitación con iluminación controlada (14 horas luz y 10 oscuridad) y temperatura constante (20-22 C). Recibieron una dieta estandar completa y agua "ad libitum". Desde el primer mes de edad se las manejó asiduamente para acostumbrarlas a la manipulación humana de manera que en el día del experimento no se produjeran interferencias debidas al stress. Para los experimentos con drogas se utilizaron siempre machos, y para los de ritmos ultradianos ambos sexos indistintamente.

2. Pauta experimental.

Se realizaron dos tipos de protocolos básicos. En el primero se emplearon animales tratados con diversas drogas neuroactivas y se determinó el contenido de Somatostatina en hipotálamo, de Catecolaminas en cerebro y de Hormona de Crecimiento en plasma. En el segundo, animales sometidos a condiciones ambientales constantes pero sin manipulación previa alguna. En este caso se determinó el contenido hipotalámico de Somatostatina y de Catecolaminas y de Hormona de Crecimiento en sangre.

2.1. Administración de diferentes drogas modificadoras del metabolismo y/o la función catecolaminérgica.

En todas las experiencias las drogas se inyectaron intraperitonealmente en un volumen final de 1 ml. disueltas en suero salino (ClNa 0,9%), excepto el Disulfiram y la L-dopa que se administraron como una suspensión en Twen 80 (Sigma Labs., St. Louis, USA): H₂O destilada 1:9. Cada grupo tenía su propio control formado por animales de la misma edad y peso inyectados con suero salino tantas veces como se inyectaran drogas al grupo de "tratados".

Drogas modificadoras del metabolismo de las Catecolaminas:

- Experimento 1. Administración de alfa-metil-p-tirosina metil-éster (AMT, Sigma Labs.), 250 mg/kg de peso corporal, sacrificándose a los animales a las cuatro horas después de la inyección de la droga o suero salino.
- Experimento 2. Administración de L-dopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina, Sigma Labs.), 150 mg/kg, matándose a las tres horas de su administración.
- Experimento 3. Administración de Disulfiram (Dietiltiocarbamil disulfato, Sigma Labs) 400 mg/kg, matando cuatro horas después.
- Experimento 4. Administración de D,L-treo-dihidroxifenilserina (DOPS, Sigma Labs.), 50 y 100 mg/kg, sacrificándose los animales una hora después en ambos casos.
- Experimento 5. Administración de Disulfiram + L-dopa a las mismas dosis ya mencionadas, inyectándose la L-dopa tres horas después del Disulfiram y matándose una hora mas tarde.
- Experimento 6. Repetición de la experiencia 5, dejando actuar

En este caso a la L-dopa dos horas, es decir, se sacrificó a los animales cinco horas después del Disulfiram y dos horas tras la L-dopa.

Drogas modificadoras de la función catecolaminérgica:

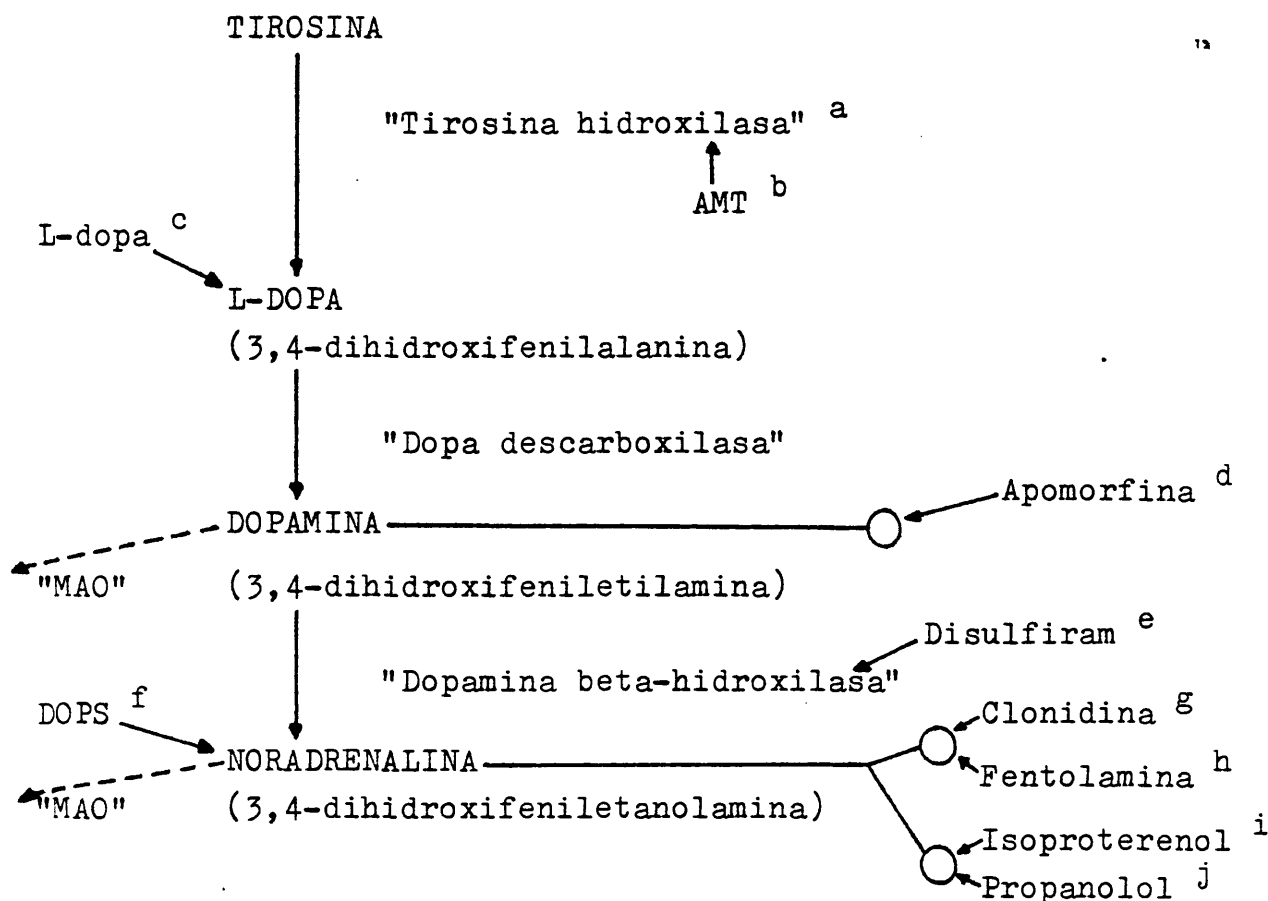
- Experimento 7. Administración de AMT (misma dosis que en el experimento 1) + Clonidina HCl (2,6-dicloro-N-2-imidazol-idinil-idenbenzamina, Böehringer Sohn, Alemania), 300 y 500 µg/kg, dejando actuar a la AMT tres horas, tras lo cual se inyectó la Clonidina, matándose a los 30-40 minutos después.
- Experimento 8. Administración de Clonidina, 500 µg/kg, matándose a los 30-40 minutos de la inyección de la droga.
- Experimento 9. Administración de AMT (misma dosis) + Apomorfina HCl (Sigma Labs.), 300 µg/Kg, con tiempos de administración y actuación iguales al experimento 7.
- Experimento 10. Apomorfina CLH, misma dosis, matando a los 30-40 minutos.
- Experimento 11. AMT (misma dosis) + Isoproterenol (1-(3, 4'-dihidroxifenil)-2- isopropilaminoetanol, Sigma Labs.), 2 y 3 mg/Kg, siguiendo la pauta del experimento 7.
- Experimento 12. Isoproterenol 3 mg/Kg, matando a los 30-40 minutos.
- Experimento 13. Fentolamina (2-((N-(m-hidroxifenil)-p-toluidino)-metil-) 2- imidazolina, "Regitina" de Ciba-Geigy, Suiza), 5 mg/Kg, sacrificando a los 30-45 minutos.
- Experimento 14. Propanolol (Isopropilamino 3-(naftiloxi) propanol-2, "Sumial" de Ici-Farma, España), 2,5 mg/Kg, matando a los 30-45 minutos.

Todas estas drogas actúan a distintos niveles de la ruta biosintética intraneuronal de las Catecolaminas, modificándola; o bien a nivel de receptores pre- y postsinápticos de la Dopamina y Noradrenalina, alterando entonces la actividad del neurotransmisor. Los puntos de actuación de todas ellas se especifican en el esquema de la página siguiente, al igual que su modo de acción.

2.2. Estudio del contenido de Somatostatina y Catecolaminas hipotalámicas y Hormona de Crecimiento plasmática a lo largo de un ciclo ultradiano.

Para ello se sacrificaron los animales a tiempos fijos con intervalos de 1/2 hora desde las 9,00 h. de la mañana hasta las 3,00 h. de la tarde. Se realizó en distintos días al ser un número de ratas demasiado grande para hacerlo en uno solo. De esta manera, los valores medios obtenidos para cada tiempo provienen de ratas sacrificadas a la misma hora pero en distintos días, todos ellos del mismo periodo estacional del año (un mes aproximadamente, en primavera). Los animales estaban sometidos a idénticas condiciones ambientales y manipulación. Fueron sacrificados en una habitación aparte y lo más rápidamente posible. A todos se les extrajo el hipotálamo y se recogió la sangre del tronco.

Nivel de actuación de los fármacos empleados en la ruta biosintética de las Catecolaminas.-



-
- a. Enzima limitante de la secuencia biosintética
 - b. Inhibidor de la actividad de la Tirosina hidroxilasa
 - c. Precursor de la biosíntesis de Catecolaminas
 - d. Agonista dopaminérgico
 - e. Inhibidor de la actividad de la Dopamina beta-hidroxilasa
 - f. Precursor directo de la Noradrenalina por descarboxilación
 - g. Agonista alfa-adrenérgico
 - h. Antagonista alfa-adrenérgico
 - i. Agonista beta-adrenérgico
 - j. Antagonista beta-adrnérgico

3. Procesado de las muestras de tejido hipotalámico para determinar el contenido de Somatostatina.

Los animales fueron sacrificados en todos los experimentos mediante decapitación en guillotina (Harvard App., USA)¹. A continuación se abrió la caja craneana y se extrajo el cerebro, previa rotura de los nervios ópticos. El tejido hipotalámico se separó del resto con unas pinzas de microcirujía siguiendo unos límites precisos: rostralmente, el quiasma óptico; caudalmente, los cuerpos mamilares; lateralmente, los surcos hipotalámicos, y con una profundidad de aproximadamente 1 mm. Inmediatamente se congeló la muestra en N₂ líquido. Toda la operación, desde la decapitación hasta la congelación, duró 1 minuto con el fin de minimizar las alteraciones postmortem. El tejido congelado se homogeneizó manualmente en tres pasos con 1,5 ml de Acido Acético 2 N y se calentó en baño de agua en ebullición durante 10 minutos para eliminar la actividad de proteasas. A continuación se repartió el volumen en dos tubos, 0,5 y 1 ml respectivamente, y se congeló a -20 C, permaneciendo así guardados. Las muestras de 0,5 ml se liofilizaron (Virtis Co., USA) y reconstituyeron con 1 ml de tampón Fosfato sódico salino 0,01 M - EDTA 0,025 N conteniendo Albúmina bovina (BSA, Fracción V de Cohen, Sigma Labs.) al 1% y mertiolato al 0,01% pH=7,6. Antes de su determinación por radioinmunoensayo las muestras se diluyeron 1:10 y 1:20 (v/v) en el tampón de ensayo. Las muestras de 1 ml se utilizaron para cuantificación de proteínas por colorimetría siguiendo el método de Lowry (189) y como reserva eventual.

4. Determinación de Somatostatina por Radioinmunoensayo.

Al ser la Somatostatina una hormona de reciente aislamiento y síntesis en el laboratorio, la técnica de valoración cuantitativa por radioinmunoensayo (RIA) no estaba perfectamente establecida, y por lo tanto fue necesaria una puesta a punto del método, que describimos a continuación.

4.1. Iodación de Somatostatina.

Se utilizó hormona sintética N-tirosin-somatostatina donada por el Dr. A. Schally (Nueva Orleans, USA). El procedimiento utilizado para la introducción de átomos radiactivos de ^{125}I en el residuo tirosil de la molécula sintética (la hormona natural no contiene ningún residuo de tirosina) fue el denominado "método enzimático de la Lactoperoxidasa" (190), con algunas modificaciones (191).

La reacción de iodación se realizó añadiendo los siguientes reactivos en un tubo de ensayo (12x75 mm) por este orden:

- 20 μl de Acetato sódico 0,4 M pH=5,6
- 5 μl de N-tir-somatostatina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en Acido Acético 2 N)
- 10 μl de solución de Lactoperoxidasa (Sigma Labs., 10 ng/ μl en Acetato sódico 0,1 M pH=5,6).
- 0,5 mCi de $^{125}\text{I}\text{Na}$ (Amersham, Inglaterra).
- 5 μl de H_2O_2 diluída 1:15x10³ (v/v) en H_2O destilada
- Se incuba la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente
- 5 μl de la misma solución de H_2O_2
- Se incuba otros 10 minutos

A continuación se transfiere la mezcla de reacción a una columna (1x25 cm) preparada con carboximetil celulosa (CM 22, Whatman Ltd. Inglaterra) para cromatografía de cambio iónico. De esta manera se separa la hormona marcada radiactivamente sin deteriorar de los productos de la reacción deteriorados por excesiva oxidación y del I_2 libre que haya quedado sin reaccionar.

4.1.1. Purificación de la hormona marcada.

La resina cambiadora de ión se equilibra con tampón Acetato Amónico 2 mM pH = 4,6 y se satura con BSA al 3% en el mismo tampón para evitar la adsorción inespecífica de la hormona a las paredes de la columna (192).

Una vez puesta la mezcla en el frente de la columna, el I_2 libre se eluye con el tampón mencionado, recogiendo un volumen de 10-15 ml. A continuación, la hormona marcada se eluye con Acetato Amónico 0,15 M pH = 4,6 recogiendo 40 fracciones, aproximadamente, de 1 ml en un colector de fracciones Gilson 1AMTDC.

De cada fracción del eluato se toman 10 μ l que se cuentan en un contador Gamma de centelleo (Packard, USA) durante 0,1 minutos. El perfil de elución así obtenido se expresa gráficamente enfrentando el volumen de elución con la radiactividad de cada fracción expresada como cuentas/0,1 minutos.

4.1.2. Criterio de pureza de la hormona marcada.

Existen varios métodos para determinar la pureza de la hormona marcada. Hemos utilizado el denominado "inmunológico", que

consiste en hacer una prueba de unión máxima específica e inespecífica al anticuerpo, de cada una de las fracciones de la purificación cromatográfica. Para ello, se siguió el siguiente protocolo de trabajo:

- En un tubo de ensayo se pone 0,1 ml de hormona marcada procedente de cada fracción (conteniendo aproximadamente 10^4 C.p.m.) + 0,1 ml del anticuerpo anti-somatostatina (a una concentración final de $1/28 \times 10^3$) + 0,5 ml de tampón EDTA 0,05 M - Fosfato sódico salino 0,01 M conteniendo BSA al 1% y azida sódica al 0,1%, pH= 7,6. Se incuba a $4^\circ\text{C}/24$ h.
- Se añade 1 ml de carbón activado (charcoal, Sigma Labs.) - dextrano T70 10:1 (p/p) diluido al 0,25% en tampón Fosfato sódico salino 0,01 M pH= 7,6 agitándose e incubando a $4^\circ\text{C}/40$ minutos. A continuación se centrifuga a $1000 \times g/15$ minutos/ 4°C (Sorval, DuPont Inst., USA).
- Se decanta el sobrenadante y se cuenta el precipitado en el contador gamma durante 1 minuto.

Para estudiar la unión inespecífica de la hormona marcada al carbón precipitante, se pusieron tubos en paralelo a los anteriores, en donde en vez de anticuerpo se puso 0,1 ml de tampón de ensayo. Esta unión inespecífica o "radiactividad inespecífica" es mayor cuanto mayor es la degradación de la hormona marcada. Por tanto la pureza hormonal vendrá expresada en función directa al porcentaje de complejo hormona marcada-anticuerpo formado, y en función inversa a la radiactividad inespecífica hallada para cada fracción, la cual habrá que restar de los tubos que contienen anticuerpo para poder determinar el porcentaje de unión máxima al

anticuerpo, fracción que se utilizará en el RIA como hormona marcada en buenas condiciones inmunológicas.

La unión específica de la hormona marcada se expresa en porcentaje en relación a la radiactividad inicial introducida (tubos de "cuentas totales", conteniendo sólo tampón de ensayo y hormona marcada).

4.1.3. Actividad específica de la hormona marcada.

El índice de la eficacia de la reacción de iodación lo da el porcentaje de utilización del ^{125}I , que se calcula por:

$$\frac{\text{radiactividad "p"}}{\text{radiactividad "t"}} \times 100$$

- radiactividad "p": expresada en "cuentas por minuto" (c.p.m.), es aquella contenida en el pico del perfil de elución cromatográfico y que contiene la hormona marcada de mayor pureza inmunológica.
- radiactividad "t": expresada en c.p.m., es aquella utilizada en el total de la reacción, despreciando la que se haya perdido en los utensilios empleados (pipetas, columnas...), que siempre fue menor del 10%.

El iodo incorporado a la molécula hormonal viene dado por la Actividad Específica de la hormona marcada, que se calcula por los pasos siguientes:

$$\text{c.p.m. "p"} / E = \text{d.p.m.}$$

donde E es "eficacia de contaje" del contador gamma utilizado, que en nuestro caso fue de 0,7; y d.p.m. son "desintegraciones por minuto", unidades que son transformables directamente en Curios a través de la siguiente relación:

$$\text{d.p.m. "p"} / \text{d.p.m. (1 Curio)} \times 1 \text{ Curio} = \text{radiactividad en Curios de la hormona marcada}$$

Conocida la cantidad de radiactividad que hay en el pico correspondiente a la hormona marcada en buenas condiciones inmunológicas y sabiendo la cantidad de hormona que se ha empleado para la reacción de iodación, aplicamos la fórmula de la Actividad Específica:

A.E. = Unidades de radiactividad / Unidades de hormona
que en nuestro caso vendrá dada en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de hormona.

4.2. Titulación de los Anticuerpos.

Los dos anticuerpos anti-Somatostatina empleados, "Ab 6" obtenido en nuestro laboratorio a partir de conejos (193) y el procedente de Immuno Nuclear Corp. (USA) "Ab M", fueron ensayados a diferentes concentraciones para determinar el título ideal a utilizar en el RIA en términos de máxima sensibilidad del método. Con los porcentajes de unión obtenidos para las distintas concentraciones de anticuerpo empleadas, se obtienen las denominadas "curvas de titulación" del anticuerpo.

4.3. Curva Patrón.

El rango de concentraciones utilizado como curva patrón es de 5.120 a 10 pg/ml. Como hormona de referencia se empleó Somatostatina cíclica sintética donada por el Dr. D. Coy (New Orleans) almacenada en una solución de 1 mg/ml en Acido Acético 2 N a 4°C. Los distintos puntos de la curva patrón se obtienen por dilución de esta solución en tampón EDTA 0,05 M con BSA al 1% pH= 7,4.

4.4. Método de RIA.

El protocolo de RIA se realiza según se detalla en la Tabla II. En cada ensayo, y junto con las distintas concentraciones de la curva patrón y las muestras a valorar, se ponen tubos de "cuentas totales" con 0,6 ml de tampón de ensayo (Fosfato sódico salino 0,01 M - EDTA 0,05 M - BSA 1%, pH= 7,4) y 0,1 ml de hormona marcada, mas otros tubos de "radiactividad inespecífica" conteniendo todos los reactivos del ensayo menos el anticuerpo. Por último, otros tubos "blanco" sin hormona fría que compita con la marcada y que por tanto nos indicará la máxima unión de la hormona marcada al anticuerpo posible en las condiciones de reacción utilizadas.

Tras la precipitación con carbón activado-dextrano, se centrifuga a 3.500 rpm/15 min. (Sorval, DuPont Ins., USA) a 4°C y se decanta el sobrenadante, contándose el precipitado en el contador gamma durante 1 minuto.

Tabla II. Esquema del protocolo del RIA de Somatostatina.

No. Tubo	Contenido	Tampón de ensayo	Curva patrón	Ab	H [#]	Carbón
		A		B	C	D
1-3	Cuentas totales	0,6 ml	-	-	0,1 ml	-
4-6	Radiactividad inespecífica	0,5 ml	-	-	"	1 ml
7-9	Blanco	0,4 ml	-	0,1 ml	"	"
10-12	Punto 1 (5.120 pg/ml)	0,3 ml	0,1 ml	"	"	"
13-15	Punto 2	"	"	"	"	"
.....
40,41	Control Interensayo ^a	"	(M) ^b	"	"	"
42,43	Muestra problema 1	"	"	"	"	"
.....					

a. Consistente en una mezcla de hipotálamos

b. 0,1 ml de muestra en lugar de los puntos de la curva patrón

Tiempos de incubación: A-B:24 h./4°C; C:48 h./4°C; D:40 min./4°C

Ab- Anticuerpo

H[#]- Hormona marcada

4.5. Cálculo de los resultados.

Comparando las c.p.m. medias de los tubos Blanco con las de los de Cuentas totales obtendremos el porcentaje de unión de la hormona marcada al anticuerpo, que tomaremos como porcentaje máximo o 100% de unión (194).

Los puntos de la curva patrón se hallan aplicando la siguiente fórmula:

$$(I) \quad \frac{B - RI}{B_0 - RI} \times 100$$

B- c.p.m. medias de cada punto patrón.

RI- radiactividad inespecífica.

B₀- c.p.m. medias de los puntos blanco.

Con los valores percentuales obtenidos se construye la curva patrón enfrentándolos a las diferentes concentraciones de hormona fría que se pusieron, en cuantificación logarítmica, obteniéndose así una representación "semi-logarítmica". Se pueden obtener representaciones lineales de la curva patrón aplicando el llamado sistema "logit-log", donde:

$$\text{Logit } B/B_0 = \ln \frac{B/B_0}{1-B/B_0}$$

Para hallar la concentración de hormona en cada muestra problema se sustituye en I la B por las c.p.m. medias de los duplicados de cada muestra, leyéndose el valor percentual obtenido en la curva patrón.

4.6. Control de calidad del RIA.

Existen una serie de parámetros que definen la validez del método de RIA (195). El primero, Sensibilidad, se entiende como la mínima dosis detectable por el método. Para establecerla se pueden utilizar diversos métodos. En nuestro caso comparamos los valores de los puntos mas bajos de la curva patrón con los valores Blanco, aplicando un test de significancia estadística.

El segundo, denominado Reproducibilidad o Precisión, viene definida por el coeficiente de variación:

$$\text{Desviación estandar/ Media x 100} = \%C.V.$$

Para delimitarlo, se emplean dos tipos de coeficientes de variación; el "inter-ensayo", que será aquel que se encuentre para una misma muestra leída en distintos ensayos, y el "intra-ensayo", que vendrá dado por el coeficiente de variación encontrado para una misma muestra leída en el mismo ensayo una serie de veces (en nuestro caso medimos la muestra en el mismo ensayo diez veces).

Para determinar la variabilidad debida a la dilución de las muestras, se diluye una muestra de tejido hipotalámico y se comparan los valores obtenidos gráficamente con la curva patrón, debiendo comportarse de manera semejante.

El último parámetro por definir se conoce como Especificidad y se entiende como la capacidad del anticuerpo empleado de discernir selectivamente entre varios antígenos potenciales, como otras hormonas hipotalámicas e hipofisarias e incluso proteínas no re-

lacionadas, eliminándose así posibles interferencias. Para ello se incubó una serie de hormonas (TRH, LHRH, ADH...) con el anticuerpo anti-Somatostatina empleado.

5. Procesado de las muestras para determinación de Catecolaminas.

La extracción de las muestras de cerebro e hipotálamo se realizó de igual forma a la descrita en el apartado para Somatostatina. El cerebro se extrajo entero, se diseccionó el hipotálamo, y se congeló inmediatamente en N_2 líquido. Las muestras de hipotálamo se cortaron en dos trozos siguiendo el contorno del ventrículo, guardándose uno para determinación de SRIH y el otro para Catecolaminas, previa congelación con N_2 .

6. Análisis fluorimétrico de Catecolaminas.

La técnica se ha desarrollado en colaboración con el laboratorio de esteroides del Instituto "Gregorio Marañón" del C.S. I.C. (Dr. J. Borrell). Se siguió el método de Schelleberger et al. (196), modificado (197). El ensayo se realiza en los siguientes pasos:

1. Homogeneización del tejido.
2. Extracción de las Catecolaminas en Acido Perclórico.
3. De una alícuota del extracto ácido se extraen las aminas mediante absorción en alúmina a pH alcalino.
4. Las aminas se desplazan de la alúmina con Acido Perclórico diluído, pasando a la fase ácida de donde se toman alícuotas para la reacción fluorimétrica.

El tejido se homogeneiza en 3 volúmenes (g/ml) de Acido Perclórico 0,4 N conteniendo Metabisulfito sódico al 0,1% y EDTA al 0,05%. Se centrifuga a 15×10^3 rpm/30 min./4°C en ultracentrifuga (Sorval). Se separa el sobrenadante, y el sedimento se rehomogeneiza de nuevo en las mismas condiciones. Se reúnen los sobrenadantes, llevándose a un volumen final de 6 volúmenes con ácido preclórico.

A continuación se toman 6 ml del extracto ácido y se añade solución de tricina (NaOH 0,5 N con tricina al 1,8% y EDTA al 2,5%) hasta alcanzar un pH de 9-9,2. Se añaden 350 mg de alúmina activada (Óxido de aluminio neutro grado I hervido en ClH 2 N/20 min., lavado con HCl y H₂O bidestilada hasta conseguir un pH del agua de 3-3,5, y calentado en estufa a 200°C/12h., manteniendose en desecador) y se agita la mezcla 20 minutos. Se centrifuga a 2.000 rpm/ 5 min., se desecha el sobrenadante y se lava el precipitado de alúmina con 20 ml de H₂O bidestilada, agitando 1 min., centrifugando de nuevo en las mismas condiciones y desechando el agua. Este lavado se repite 2 veces. A continuación se añaden 3 ml de Acido Perclórico 0,05 N a la alúmina y se agita de nuevo 20 min. Se centrifuga a 2.000 rpm/5 min., y del sobrenadante se toman dos partes alícuotas de 1 ml para blanco y problema, sobre las que se realiza la reacción fluorimétrica.

La reacción se llevó a cabo de la siguiente forma; añadiendo a una serie de tubos con 1,5 ml de tampón Fosfato-EDTA 0,05 N, pH=7 los siguientes reactivos:

-1 ml del extracto ácido

-0,2 ml de solución de I₂ 0,1 N (May & Baker, Inglaterra)

- Incubar 2 minutos
- 0,5 ml de solución alcalina de Sulfito sódico (2,5% en OHNa 5 N)
- Incubar otros dos minutos
- 0,4 ml de Acido Acético glacial, alcanzándose un pH de 4,4-4,8
- Calentar en estufa a 100°C/4 minutos
- Enfriar en hielo 5 minutos
- Se leen las muestras de Noradrenalina a temperatura ambiente a una activación de 390 mμ y una emisión de 490 mμ
- Se llevan las muestras de nuevo a la estufa a 100°C/40 minutos, enfriándose en hielo
- Se leen las muestras para Dopamina sin dejar que los tubos alcancen la temperatura ambiental.

A lo largo del método son llevados patrones de 400 ng de Dopamina y Noradrenalina para el cálculo de la recuperación. Los tubos Blanco se llevan a cabo invirtiendo el orden de adición de los reactivos.

6.1. Control de calidad del método fluorimétrico.

Para ello se definen los mismos parámetros de Sensibilidad y Reproducibilidad y además el de Recuperabilidad, entendiéndose este último como la cantidad de bioamina que se recupera después de haberse seguido todos los pasos del ensayo.

El método permite determinar muestras de hasta 50 ng, tanto para la Noradrenalina como para la Dopamina ($p < 0,001$) (197).

La variación intra-ensayo fue del 1,8%, tanto para la Dopamina como para la Noradrenalina, como se puede calcular a partir de los datos de la siguiente tabla.

Tabla III. Valores de Dopamina y Noradrenalina en una muestra ensayada por quintuplicado en un mismo experimento.

MUESTRA ^a	NORADRENALINA (ng/g tejido)	DOPAMINA
1	337	975
2	330	995
3	344	1016
4	344	975
5	344	975
$\bar{X} \pm$ D.S. \pm E.S.M.	$339 \pm 6 \pm 2,8$	$987 \pm 18 \pm 8,1$

a. La muestra corresponde a una mezcla de cerebros procedentes de 10 ratas normales.

La variación inter-ensayo fue del 8,9% para la Dopamina y del 10,7% para la Noradrenalina, como se concluye de los datos de la tabla IV.

Tabla IV. Valores de Dopamina y Noradrenalina de una misma muestra valorada en distintos ensayos (n=6).

MUESTRA	NORADRENALINA (ng/g tejido)	DOPAMINA (ng/g tejido)
1	217	479
2	245	501
3	206	405
4	270	507
5	209	426
6	240	484
$\bar{X} \pm$ D.S. \pm E.S.M.	231 \pm 24 \pm 10	467 \pm 41 \pm 17

7. Radioinmunoensayo de Hormona de Crecimiento.

Esta técnica se ha llevado a cabo con material biológico donado por el NIAMND (Dr. Parlow, USA). El proceso seguido fue, en esencia, el indicado por dicha institución, con ligeras modificaciones que a continuación indicamos.

7.1. Iodación de la hormona.

Se siguió el procedimiento de Greenwood (198), modificado en algunos aspectos. Fueron dos las técnicas de iodación empleadas; una siguiendo estrictamente las instrucciones del Dr. Parlow y otra ligeramente distinta con el fin de economizar cantidades apreciables de reactivos, que no dió los resultados apetecidos al obtenerse actividades específicas por debajo de 30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de GH, con lo que la sensibilidad del ensayo no era la requerida (194). Por tanto, se describe a continuación sólo la que utilizamos de manera rutinaria.

Se añaden los reactivos por el siguiente orden en un tubo de ensayo (10x75 mm):

- 100 μl de tampón Fosfato sódico 0,5 M pH=7,6
- 2 mCi de $^{125}\text{I}\text{Na}$ (Amersham, Inglaterra)
- 20 μg de NIAMND-GH-1-4, disuelta en NaHCO_3 0,01 M, 1 mg/ml
- 15 μl de Cloramina-T (BDH, Inglaterra) disuelta en Fosfato sódico 0,05 M pH=7,6, 3,5 mg/ml
- Se incuba la mezcla 45 segundos y se lleva a una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia, Suecia) con el fin de separar los distintos productos de la reacción por cromatografía de exclusión molecular.

La columna se encontraba previamente saturada con Albúmina bovina al 30% en tampón de elución: Barbital 0,05 M pH=8,6 y lavada con el mismo tampón, recogiendo fracciones de 0,5 ml, hasta completar un volumen de elución de unos 25 ml.

El criterio de pureza utilizado fue también el inmunológico, obteniéndose la máxima cantidad de hormona marcada en buenas con-

diciones en el primer pico del perfil de elución (alrededor de los 4-6 ml), con un 60% de unión al anticuerpo (diluido $1/20 \times 10^3$) y una radiactividad inespecífica por debajo del 10%.

La actividad específica media obtenida fue de aproximadamente 60 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de hormona, con un porcentaje de utilización del I_2 radiactivo del 60%.

7.2. Método de RIA.

Se utilizó el método del doble anticuerpo y siguiendo el esquema de trabajo que a continuación se detalla:

En el tubo de ensayo se añaden los siguientes reactivos por este orden:

- 300 μl de tampón de ensayo (Fosfato salino 0,01 M - EDTA 0,025 M conteniendo Albúmina bovina al 1% y azida sódica al 0,1%, pH=7,6).
- 100 μl de cada punto de la curva patrón (con un rango de concentraciones de 0,8 - 100 ng/ml) o bien, 50 μl de muestra a valorar + 50 μl del tampón de ensayo para igualar volúmenes.
- 100 μl de hormona marcada con 8×10^3 cpm/100 μl aproximadamente.
- 100 μl de Primer anticuerpo (NIAMND anti-rat GH-serum-4) con un título de $1/35 \times 10^3$ final.
- Se incuba 3 días/4°C.
- 25 μl de heparina sódica (10.000 U/ml, Rovi, España).
- 100 μl de una mezcla de sueros humanos diluida 1/300 inicial en el tampón de ensayo.
- 100 μl de Segundo anticuerpo (Gamma globulina de cabra anti-

-Primer anticuerpo, Antibodies Inc., USA) con una dilución inicial de 1/12.

- Se incubó 1 día a 4°C, se decanta el sobrenadante y se cuenta 1 minuto en el contador Gamma.
- En paralelo se disponen tubos de "Cuentas totales", "Radiactividad inespecífica" y "Blanco".

Se obtienen curvas patrón como la de la Figura 4, con una sensibilidad de 1,6 ng/ml de plasma ($p < 0,02$) y una variación intra-ensayo de 3,7 y 2,1% para los puntos 100 y 50 ng/ml respectivamente, y una variación inter-ensayo de 3,1% para una dosis de 45 ng/ml.

El porcentaje de unión máxima al anticuerpo, determinado por los tubos "Blanco" fue del $23 \pm 4,2\%$ ($\bar{X} \pm E.S.M.$) y el de unión inespecífica o RI del $5,1 \pm 1,2\%$.

8. Estudio estadístico de los resultados.

En las experiencias de animales tratados con drogas diversas, el estudio estadístico fue realizado aplicando el test de la "t de Student", comparando cada grupo tratado con su respectivo control. Se consideró un valor de "p" menor de 0,05 como estadísticamente significativo.

En las experiencias de estudio del ritmo ultradiano, se aplicó en ciertas ocasiones el coeficiente de correlación entre los diversos parámetros estudiados.

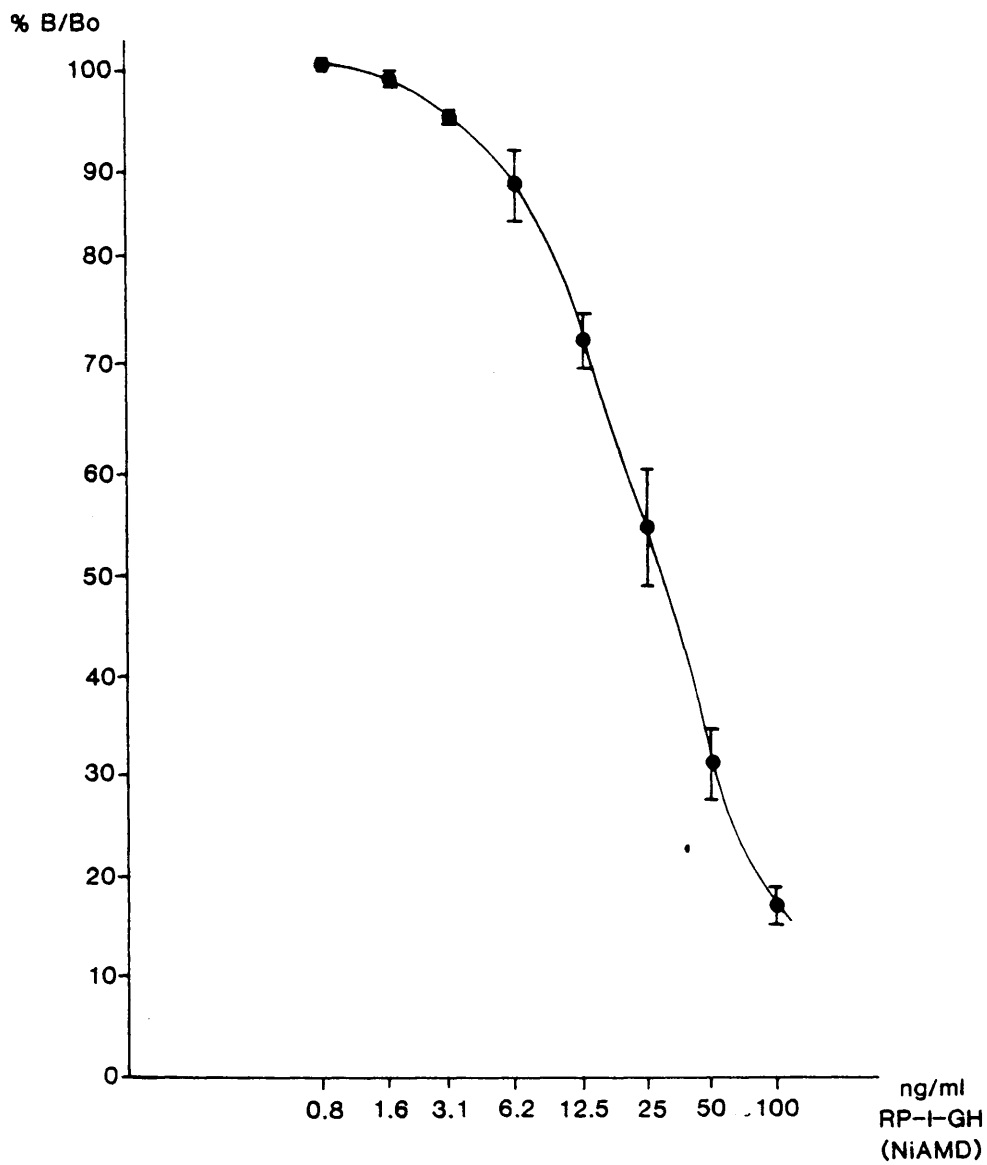


Figura 4

Figura 4. Curva patrón característica obtenida en el RIA de GH.

Notas.

1. En todos los experimentos, se recogió la sangre del tronco inmediatamente tras la decapitación y se puso en tubos mantenidos en baño de hielo, conteniendo EDTA disódico (1 mg/ml de sangre) para determinar el contenido de GH en plasma. Tras centrifugarse, se guardaron las muestras a -40°C hasta su determinación por RIA.

R E S U L T A D O S .

RESULTADOS.

1. Puesta a punto del RIA de Somatostatina.

Se describen a continuación los resultados obtenidos en cada uno de los pasos de la puesta a punto del método de RIA para la Somatostatina¹.

1.1. Iodación de Somatostatina.

La Figura 5 nos muestra el perfil de elución de dos cromatografías en CM-22 de la mezcla de reacción de la iodación por el método de la Lactoperoxidasa.

El primer pico (punto 0), corresponde al I_2 libre que ha quedado sin utilizar en la reacción y que se ha eluído con tampón Acetato Amónico 2 mM pH=4,6. La hormona degradada por exceso de oxidación se encuentra en el pico II, y la hormona marcada en buenas condiciones inmunológicas en el pico III. La calidad de la hormona marcada en cada una de las fracciones de los picos II y III se determinó por el método de unión máxima específica al anticuerpo.

El mayor porcentaje de unión (expresado como B/T) se encontró en los dos puntos posteriores al pico III (ver esquema de la página siguiente). Por tanto, fueran estas las fracciones elegidas para utilizar en el RIA, guardándose a $-20^{\circ}C$.

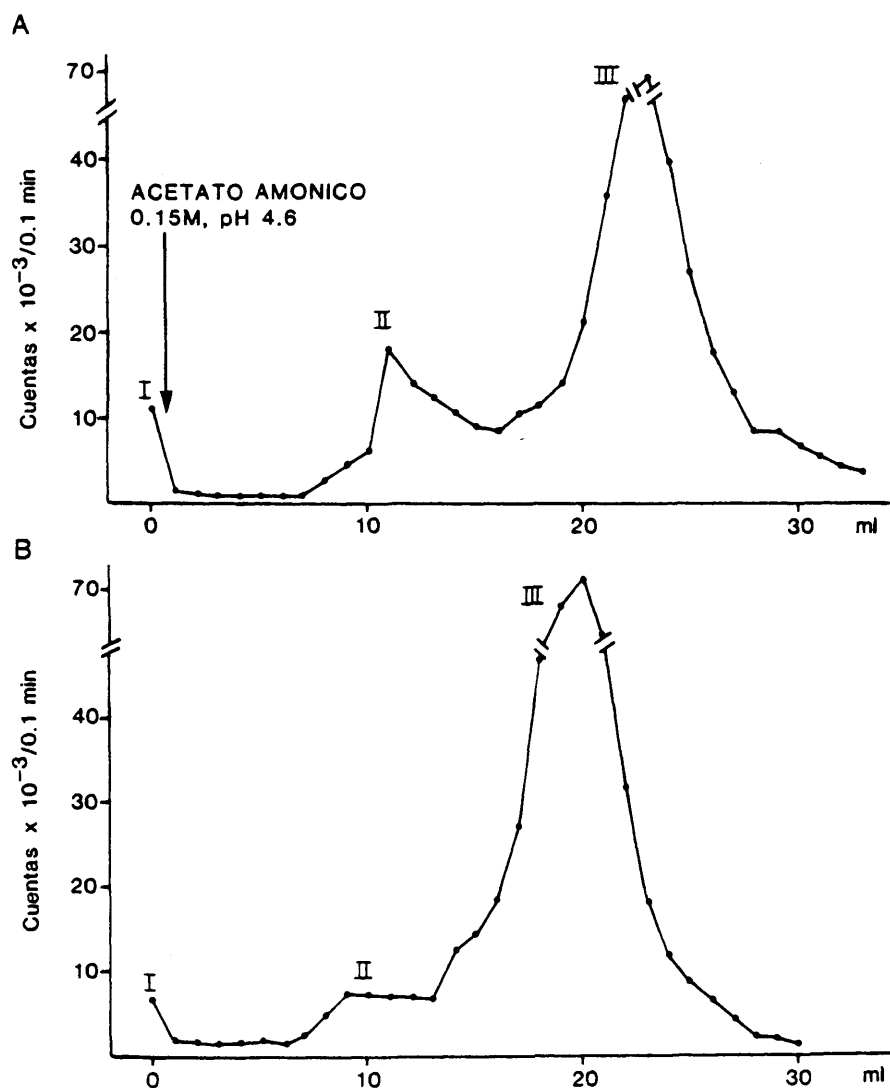


Figura 5

Figura 5. Representación de dos perfiles típicos obtenidos por cromatografía en CM-22 de la mezcla de reacción de iodación de 0,5 mg de N-Tir-SRIH con 0,5 mCi de iodo-125. En A. la actividad específica de la hormona marcada (pico III) fue de 62 uCi/ug de péptido, mientras que en B. fue un poco mayor, 86.7 uCi/ug.

Fracción	% Unión (B/T)	Radiactividad Inespecífica ($\bar{X} \pm$ E.S.M.)
1 Post-pico III	43,2 \pm 5,2	7,5 \pm 3,2
2 "	36,9 \pm 7,6	5,7 \pm 3,7

1.1.1. Eficacia de la reacción de iodación.

Determinada como porcentaje de utilización del ^{125}I Na en la reacción y como cantidad incorporada de éste a la molécula hormonal o Actividad Específica de la hormona, viene descrita en la tabla V, con cinco marcajes (de un total de quince realizados).

Estas actividades específicas nos permiten utilizar cantidades muy pequeñas de hormona radiactiva (aproximadamente 2 μg en 10.000 cpm), lo cual supone obtener una adecuada sensibilidad del RIA (194).

La hormona marcada tiene una vida media de un mes y medio a dos meses, siendo repurificada en la misma columna de cambio iónico al cabo de un mes aproximadamente, cuando las radiactividades inespecíficas halladas en el ensayo empezaban a elevarse a un 10%.

Tabla V. Parámetros determinantes de la eficacia de la reacción de iodación de Somatostatina.

% Utilización del ^{125}INa	Actividad Específica ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)
90	90
86,7	86,7
62,1	62,1
48,6	48,6
74,4	74,4
$\bar{X} \pm \text{E.S.M.}: 72,3 \pm 7,7\%$	$72,3 \pm 7,7 \mu\text{Ci}/\mu\text{g SRIH}$

1.2. Titulación de los anticuerpos.

La Figura 6 nos muestra las curvas de titulación del anticuerpo número 6, obtenido en nuestro laboratorio, y el anticuerpo M proveniente de fuentes comerciales, en concentraciones variables de los mismos, permaneciendo constantes los demás elementos del ensayo.

Se eligió la dilución $1/28 \times 10^3$ para el anticuerpo 6 y la $1/35 \times 10^3$ para el anticuerpo M, por dar una unión al antígeno de alrededor del 30%, con la cual se obtiene la sensibilidad óptima del ensayo.

La Figura 7 muestra las curvas patrón obtenidas con el an-

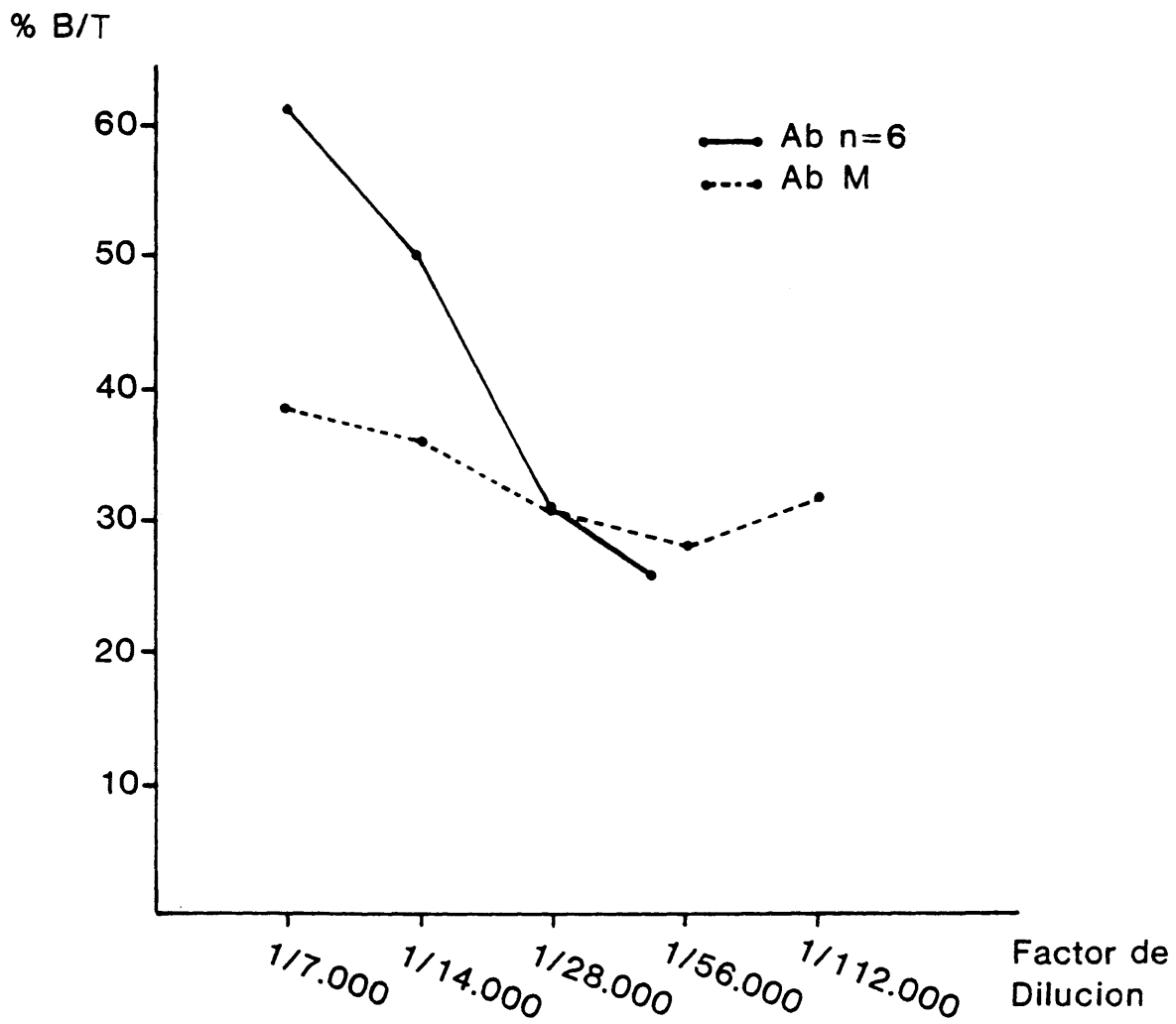


Figura 6

Figura 6. Curva de titulación del anticuerpo obtenido en nuestro laboratorio, Ab 6, y el obtenido de fuentes comerciales (Immunonuclear Corp., Ab M).

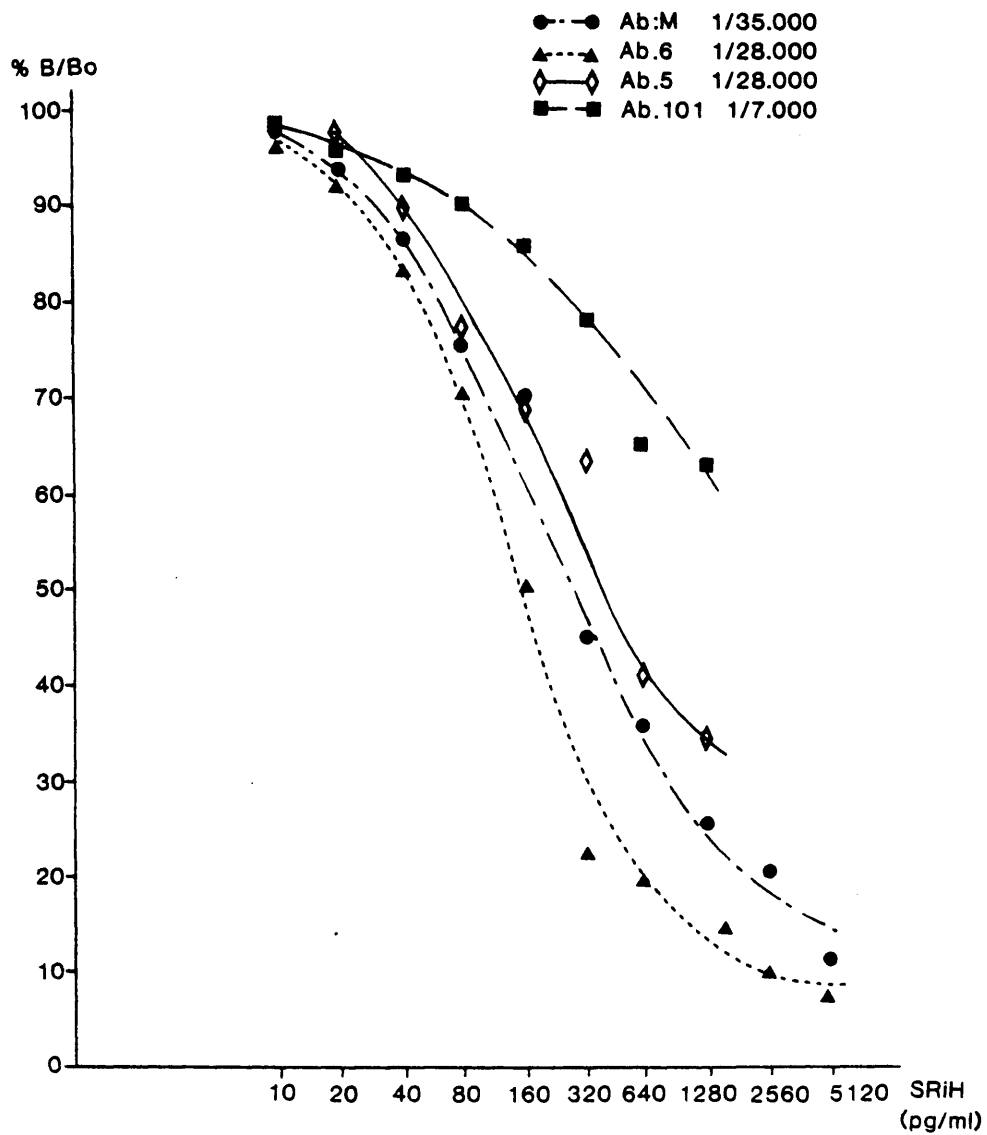


Figura 7

Figura 7. Representación de cuatro curvas patrón obtenidas con distintos anticuerpos. Ab M (Immunonuclear), Ab 5 y 6 (nuestro laboratorio) y Ab 101 (Dr. Arimura, Nueva Orleans, USA).

anticuerpo número 5 diluido $1/28 \times 10^3$ y el número 6 también diluido $1/28 \times 10^3$ de nuestro laboratorio, el anticuerpo M $1/35 \times 10^3$ y el anticuerpo número 101 $1/7 \times 10^3$ donado por el Dr. Arimura (Nueva Orleans, USA). Como se puede observar, las curvas mas precisas y sensibles son las correspondientes al número 6 y al M, ya que son las que se encuentran mas desplazadas a la izquierda de la gráfica y las de pendiente mas pronunciada. Cuanto mayor pendiente tenga una curva patrón, mayor precisión tiene en determinar la concentración de hormona de referencia que le corresponde a un valor de B/B_0 dado. Es por lo que se eligió el anticuerpo número 6 para el RIA, usándose el M tras haberse agotado el primero.

1.3. Curva patrón.

La Figura 8 refleja una curva patrón de Somatostatina sintética que corresponde a la media obtenida de 10 curvas (de un total de 43 realizadas) hechas a lo largo de dos años y medio.

En las condiciones de ensayo descritas, el porcentaje de unión máxima, dado por los tubos Blanco, fue de $39 \pm 3,8\%$ ($\bar{X} \pm \pm$ S.E.M.) y la RI del $7,7 \pm 0,6\%$.

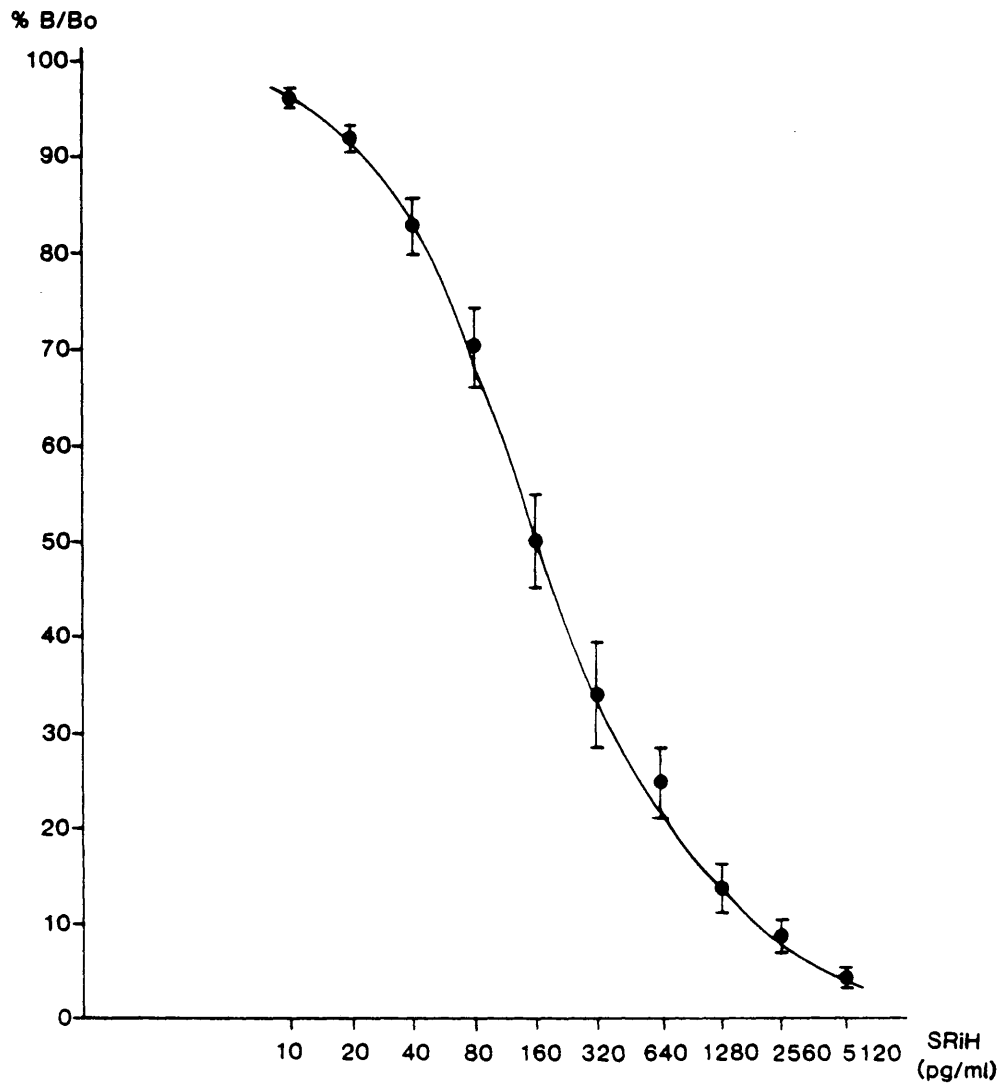


Figura 8

Figura 8. Curva patrón obtenida en el RIA de SRIH. Cada punto representa la media (\pm error estándar) de diez puntos obtenidos en distintos ensayos.

1.4. Sensibilidad, precisión y especificidad del RIA de Somatostatina.

La sensibilidad, calculada según los datos de la tabla VI, fue de 10 pg/ml ($p < 0,01$), suficiente para los requerimientos de nuestros protocolos. Las muestras se leyeron generalmente en la zona media de la curva patrón, idónea por ser la de mayor pendiente, para lo cual debían ser diluidas en el tampón de RIA hasta 1:40. Además, esta sensibilidad nos permite trabajar con un rango amplio de concentraciones.

Tabla VI. Sensibilidad del RIA de Somatostatina.

Blanco	20 pg/ml	10 pg/ml
Porcentaje de unión (B/T)		
34	32,9	33,9
29,8	27,6	29,8
35,4	33,6	34,4
48,7	45,6	47,2
33	30,7	31,7
34,4	33	35,5
32,2	28,6	31
48	46,2	47
31,8	28,3	29,2
51	47	50,2

Blanco vs 20 pg/ml; $t = 7,8$. $p < 0,001$

Blanco vs 10 pg/ml; $t = 4,5$. $p < 0,01$

Se aplicó un test de significancia estadística ("t apareada") a los distintos valores B/T obtenidos para los puntos 0 (que denominamos Blanco), 10 y 20 pg/ml.

La reproducibilidad del ensayo, definida por los coeficientes de variación inter e intra-ensayo, se calculó a partir de los datos de las tablas VII y VIII.

Como control inter-ensayo se utilizó una mezcla de hipotálamos de rata guardados en alícuotas a -20°C , determinándose su contenido en Somatostatina en cada uno de los ensayos realizados. La tabla VII describe los valores obtenidos para dicha mezcla a lo largo de 10 diferentes ensayos, y con los dos anticuerpos utilizados. Se determinó el coeficiente de variación de los valores obtenidos.

Los coeficientes de variación intra-ensayo se calcularon para diferentes concentraciones conocidas de hormona de referencia, también en 10 ensayos distintos.

Los valores obtenidos en ambos casos, están por debajo de los límites de variación que se admiten como óptimos (20% para la inter-ensayo y 5% para la intra-ensayo).

Para determinar la especificidad del anticuerpo anti-Somatostatina se estudió la posible interferencia de algunas hormonas: TRH, ADH, LHRH, glucagón e insulina, en la formación del complejo Somatostatina - anti-Somatostatina. Se observó que con dosis de hasta 100 μg de estas hormonas, el porcentaje de unión fue siempre menor que 0,001%, lo cual indica que el anticuerpo no reacciona con estas hormonas de forma apreciable, y por lo tanto es específico para la Somatostatina frente a estas hormonas.

Tabla VII. Reproducibilidad inter-ensayo del RIA de Somatostatina.

Anticuerpo 6		Valor obtenido (pg/ml)
Ensayo 1		240
2		300
3		320
4		360
5		380
$\bar{X} \pm$ E.S.M.:		320 \pm 24,4
% C.V.:		16,8%
Anticuerpo M		Valor obtenido (pg/ml)
Ensayo 1		370
2		350
3		320
4		300
5		260
$\bar{X} \pm$ E.S.M.:		320 \pm 19
% C.V.:		13,4%

Tabla VIII. Variación intra-ensayo para tres dosis de hormona.

DOSIS (pg/ml)	% Variación	Media
640	5; 1,4; 0,9; 1,8; 1,5; 0,6; 2,1; 0,6; 3,1	1,8%
320	6,4; 2; 1,1; 1,2; 1; 3,6; 0,8; 1,2; 1,6; 0,9	1,9%
160	6,8; 2,6; 1,3; 3; 4,8; 2,2; 2,8; 2,6; 2,2; 2,3	3%

La influencia del factor de dilución empleado en las muestras a valorar se estudió comparando los valores obtenidos para una mezcla de hipotálamos de rata diluida hasta 1:40 con una curva patrón; obteniéndose un paralelismo entre ambas (Figura 9B). Además, la representación gráfica de diluciones progresivas de dicha muestra dió una línea recta (Figura 9A), indicando la existencia de una relación lineal entre factor de dilución y contenido valorado de la hormona.

2. Catecolaminas cerebrales, Somatostatina hipotalámica y Hormona de crecimiento plasmática.

2.1. Evidencias de una relación entre Catecolaminas, Somatostatina y Hormona de crecimiento.

Los resultados de los experimentos 1 y 2, animales tratados con AMT y con L-dopa respectivamente, muestran una relación entre el contenido cerebral de Catecolaminas (Dopamina y Noradrenalina), hipotalámico de Somatostatina (SRIH) y plasmático de Hormona de crecimiento (GH), como se señala en las Figuras 10A y 10B.

Cuando ambas catecolaminas se encuentran disminuidas en el cerebro (en un 50% aproximadamente, $p < 0,001$) por acción de la AMT, inhibidora de la Tiroxina hidroxilasa, el contenido hipotalámico de SRIH se incrementa de 20 a 30 pg/ μ g prt., $p < 0,01$, mientras que el de GH en sangre disminuye de 55 a 25 ng/ml. En este último caso no se observó una significancia estadística en la disminución de GH debido a la gran variabilidad en los valores obtenidos para

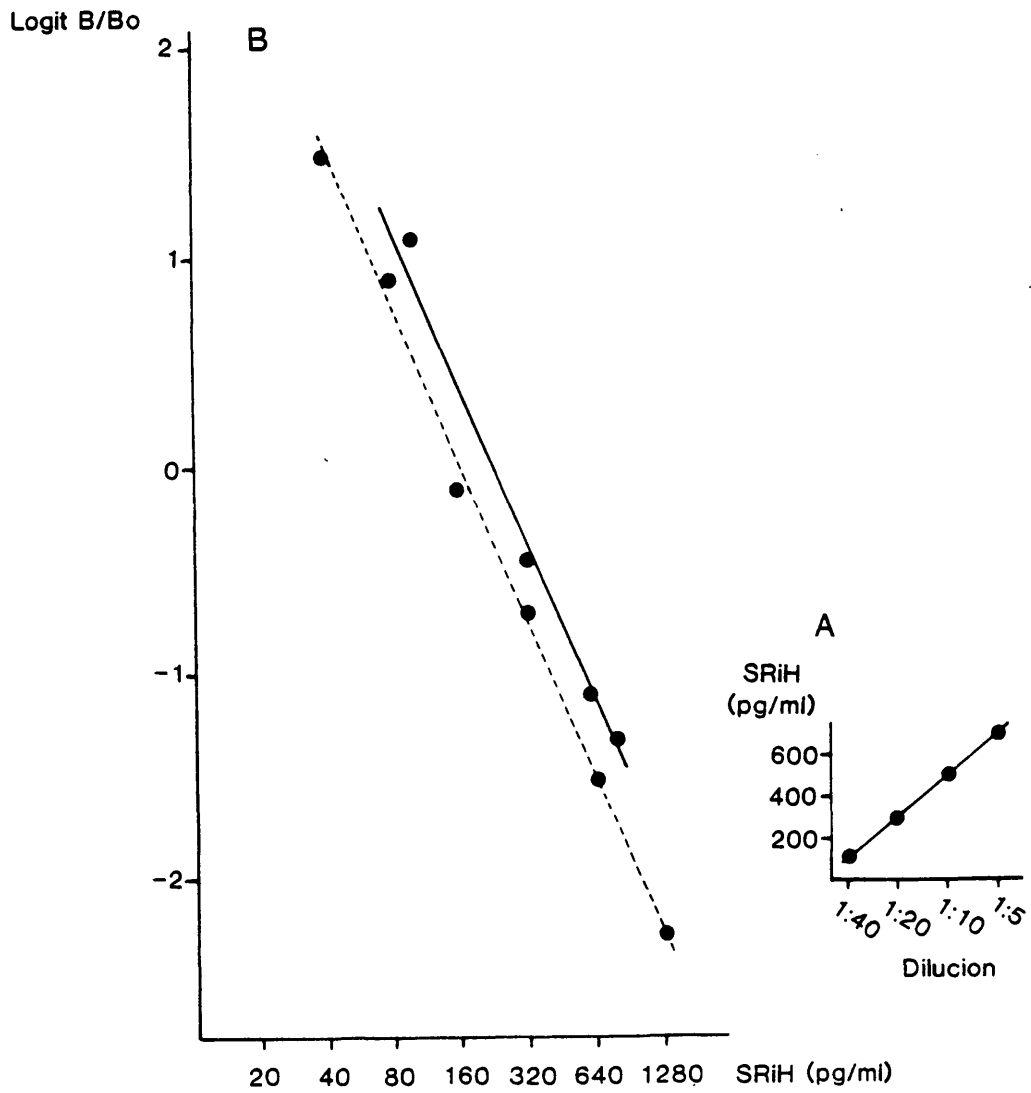


Figura 9

Figura 9. En A: representación de la relación lineal entre factor de dilución y contenido de SRIH en una mezcla de hipotálamos. B: Paralelismo de una mezcla de tejido hipotalámico (línea continua) y una curva patrón de SRIH sintética (línea discontinua) tras linearización Logit B/B_0 .

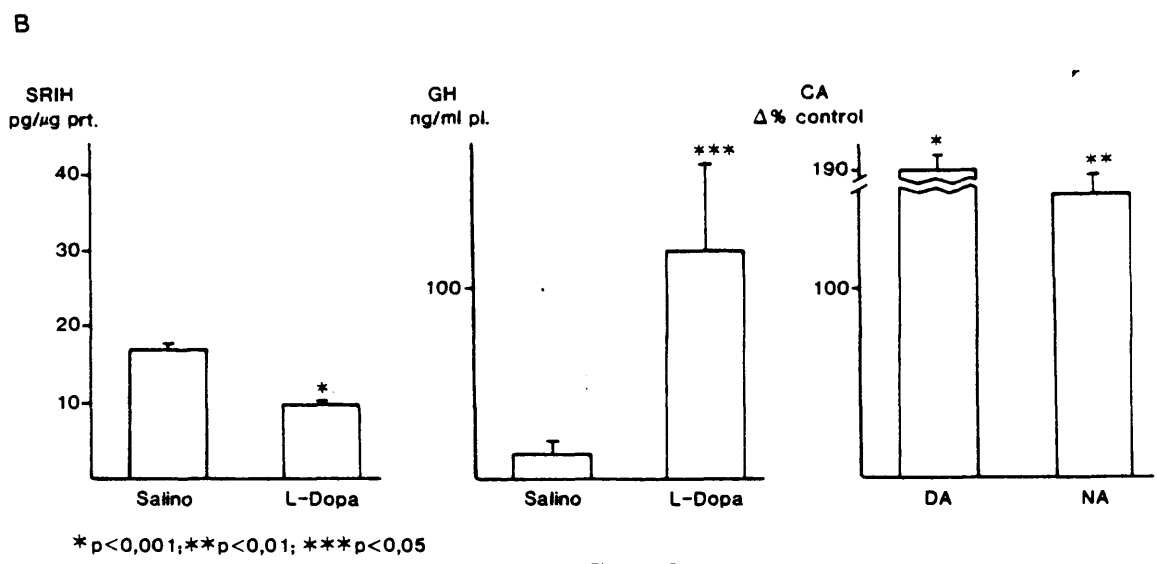
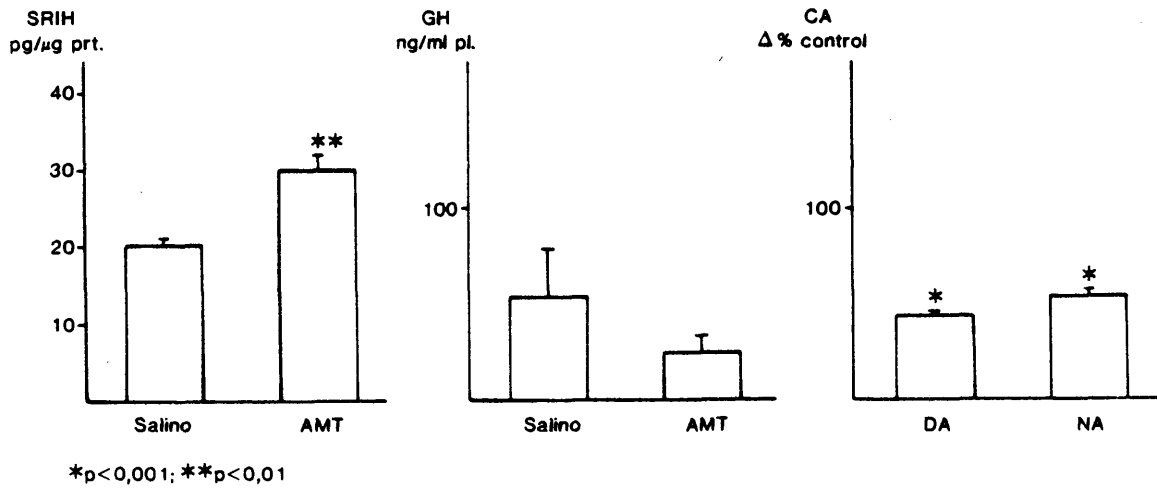


Figura 10

Figura 10. Efecto de la administración de A: AMT y B: L-dopa sobre los niveles de SRIH en hipotálamo, GH en plasma y CA en cerebro. Los valores hallados para las CA se expresan como incrementos o decrementos porcentuales de los valores control, tomando éstos como 100%. A. AMT: n=17, salino: n=11. B. L-dopa: n=5, salino: n=10.

Nota: este mismo sistema de representación se mantiene hasta la Figura 16.

las ratas control, ya que los niveles basales de esta hormona suelen ser muy dispersos debido a la existencia de un ritmo pulsátil circadiano para esta hormona (179). De cualquier forma, nuestros resultados concuerdan con los de otros autores. Además, este efecto de la AMT sobre la GH está ampliamente documentado en la literatura (65).

Por el contrario, la administración de L-dopa, precursor de la biosíntesis de catecolaminas, produjo efectos contrarios: aumento de la dopamina en un 190% ($p < 0,001$), de la noradrenalina en un 150% ($p < 0,01$) y disminución de la SRIH hipotalámica de 17 a 9,5 pg/ μ g prt. ($p < 0,001$). Al mismo tiempo, se observó un aumento en la liberación de GH de 13 a 120 ng/ml ($p < 0,05$), significativo en este caso por la pequeña desviación de los valores control ².

Por tanto, estos datos sugieren la posibilidad de que exista una relación inversa entre Catecolaminas y Somatostatina y directa entre éstas y la GH.

2.2. Control de la Somatostatina hipotalámica y la Hormona de crecimiento plasmática por la Dopamina.

Una vez que se comprobó que existía una relación entre las Catecolaminas cerebrales y la SRIH hipotalámica, se planteó cómo las dos catecolaminas principales en el Sistema nervioso central, esto es la Dopamina y la Noradrenalina, intervendrían en particular en el control de esta hormona hipotalámica.

Para estudiar el efecto de la Dopamina (DA) selectivamente, se planteó el experimento número 6, en el que la administración

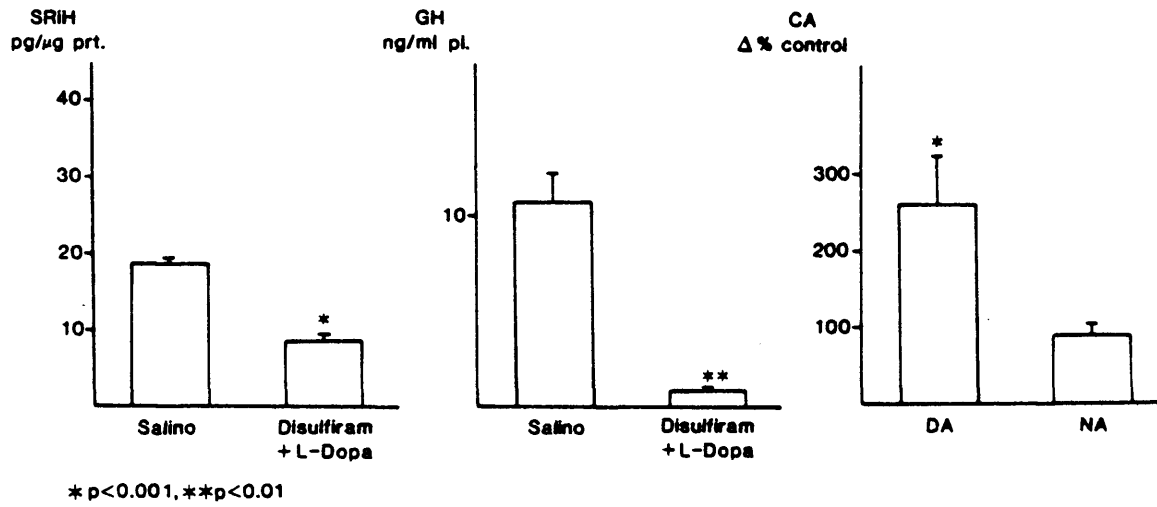
de L-dopa tras el Disulfiram produjo niveles altos de DA (262% del control), permaneciendo la Noradrenalina (NA) en niveles normales ³.

La Figura 11A nos muestra como tras esta elevación de la DA cerebral, el contenido de SRIH en hipotálamo baja drásticamente de 18,5 a 8,5 pg/ μ g prt., al igual que la GH plasmática (de 10,8 a menos de 0,8 ng/ml) ⁴.

Esto sugería que la DA actuaría de forma negativa sobre los niveles de SRIH en el hipotálamo y sobre la liberación de GH de la hipófisis.

Para confirmarlo, se llevaron a cabo los experimentos 9 y 10. En el primero de ellos la administración de AMT produjo una deplección tanto de DA como de NA de aproximadamente el 75 y 60% en el cerebro; pero la subsiguiente inyección de Apomorfina (agonista dopaminérgico) incrementaría la actividad dopaminérgica al mimetizar los efectos de la DA en los receptores pre- y postsinápticos. En la Figura 11B se observa que los niveles de DA y NA, tanto tras AMT sólo como tras AMT + Apomorfina, se encuentran muy disminuídos (no existiendo apenas diferencias entre ambos tratamientos porque el efecto de la Apomorfina sobre el "recambio metabólico" de la DA es a tiempos mas largos), mientras que la SRIH hipotalámica tras AMT se encuentra alta (33 pg/ μ g prt.) respecto a los niveles control de otros experimentos (ver controles de las figuras 6 y 7), como se había visto ya en el experimento 1. Por el contrario, las ratas tratadas con AMT+Apomorfina tienen disminuída significativamente la SRIH hipotalámica respecto a las tratadas con AMT (20 pg/ μ g prt.), alcanzándose niveles normales.

A



B

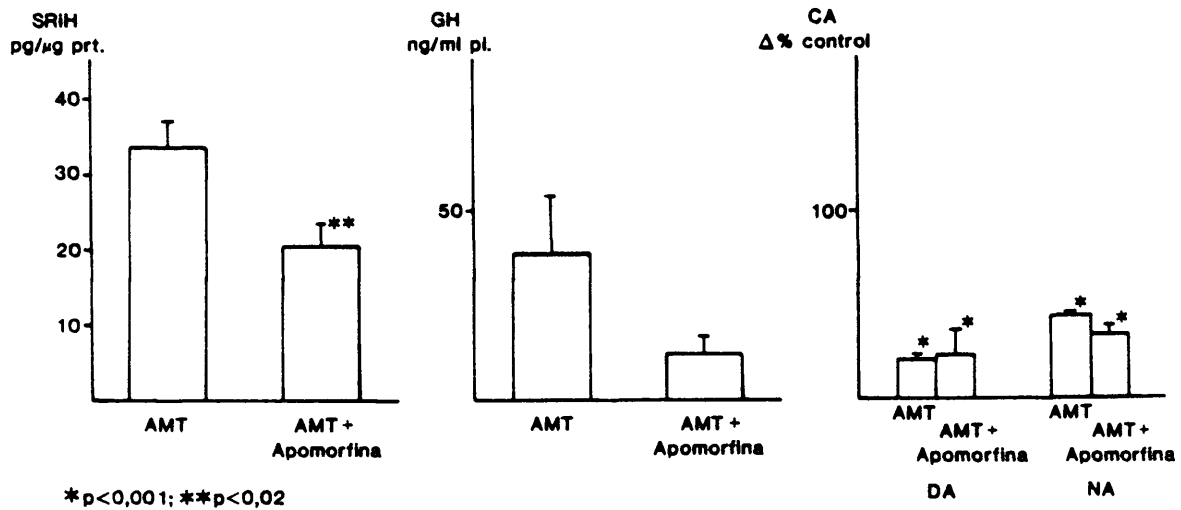


Figura 11

Figura 11. Efecto de la administración de A: Disulfiram (5 horas) + L-dopa (2 horas) y B: AMT y AMT + Apomorfina sobre los niveles de SRIH en hipotálamo, GH en plasma y CA en cerebro. A. Disulfiram + L-dopa: n=4, salino: n=5. B. AMT: n=8, AMT + Apomorfina: n=5.

En cuanto a la GH plasmática, los animales tratados con AMT+Apomorfina tenían los niveles más bajos que los tratados con AMT sólo (12 frente a 39 ng/ml), pero no de manera significativa.

En la experiencia número 10 se inyectó únicamente Apomorfina, incrementándose la actividad dopaminérgica sin alterar los niveles cerebrales de DA y NA (110 y 120% del control, respectivamente). La Figura 12A nos muestra que en paralelo a unos niveles de DA y NA ligeramente altos, pero no significativamente, se obtuvieron concentraciones de SRIH bajas en los animales tratados con la droga dopaminérgica (9 pg/ μ g prt.) respecto a los control (15,8 pg/ μ g prt.), y al mismo tiempo la GH plasmática disminuyó también de 60 a 44 ng/ml.

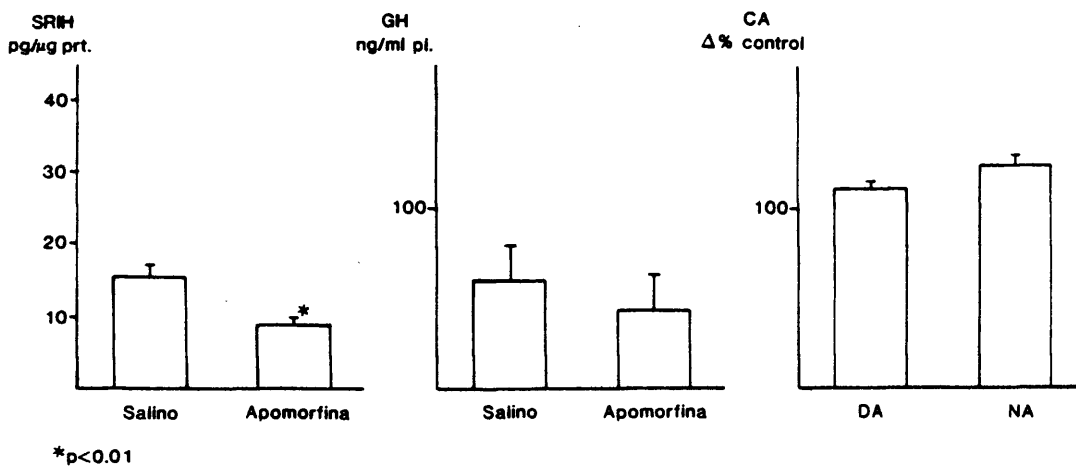
Es decir, ambos experimentos vienen a confirmar lo observado en el número 6, la DA parece disminuir los niveles hipotalámicos de SRIH y de alguna manera también afecta los de GH en plasma.

2.3. Control de la Somatostatina Hipotalámica y de la Hormona de crecimiento en plasma por la Noradrenalina.

El planteamiento de los experimentos 3 y 4 fue el determinar el efecto de la disminución y aumento de la NA en cerebro, respectivamente, sobre los niveles de SRIH en hipotálamo y de GH en plasma.

La Figura 12B muestra que tras una bajada de la NA del 40% del control provocada por la administración de Disulfiram, blo-

A



B

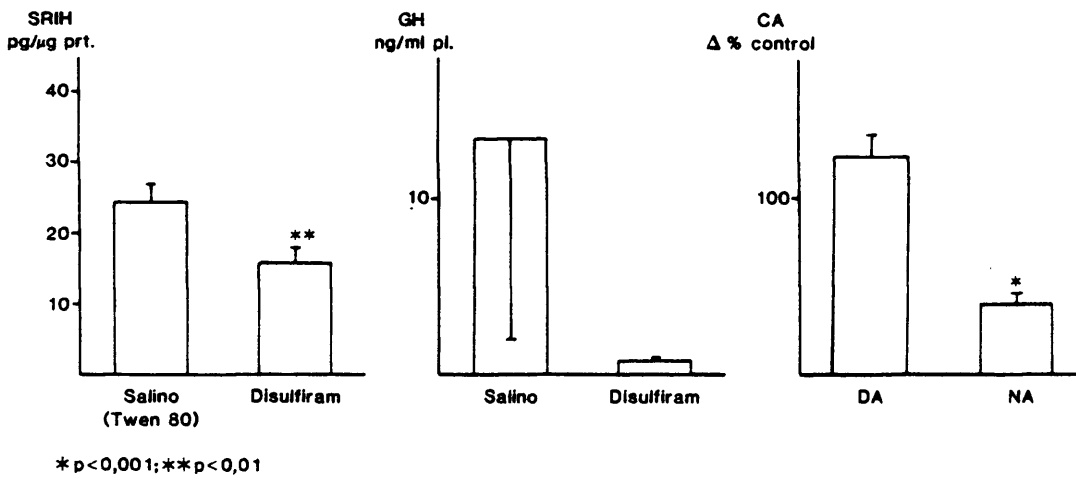


Figura 12

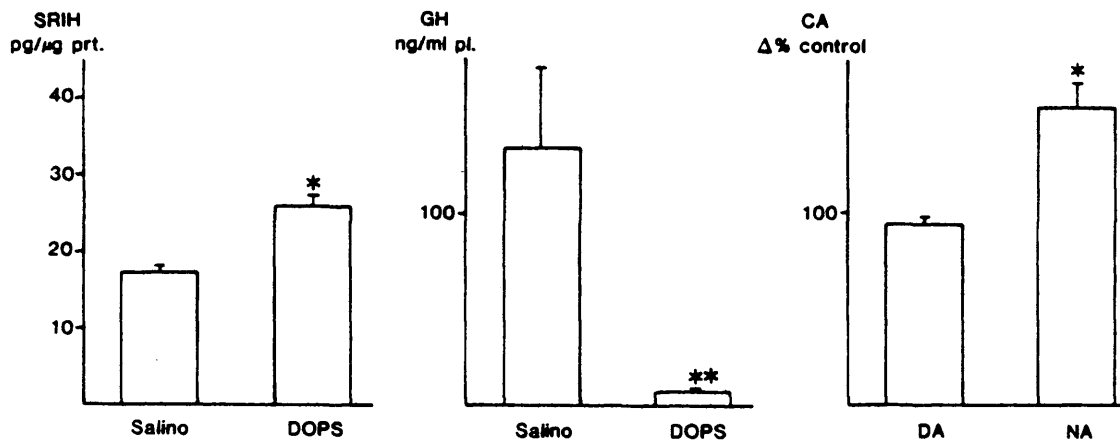
Figura 12. Efecto de la administración de A: Apomorfina y B: Disulfiram sobre los niveles de SRIH en hipotálamo, GH en plasma y CA en cerebro. A. Apomorfina: n=9, salino: n=6. B. Disulfiram: n=11, salino: n=11.

queante de la actividad de la dopamina beta-hidroxilasa, permaneciendo la DA algo alta (120% del control, no significativo), la SRIH en el hipotálamo disminuye también de 24 a 16, pg/ μ g prt. Lo mismo ocurre con la GH, de 13 a 0,8 ng/ml, pero sin ser significativo. Estos experimentos coinciden con lo encontrado en el experimento 6, en el que la administración de Disulfiram como control frente a la administración de Disulfiram + L-dopa produjo una bajada de la SRIH de 18,4 a 11 pg/ μ g prt. (datos no representados gráficamente).

En la Figura 13A se observa que el aumento producido por la administración de DOPS sobre los niveles de NA cerebral (precursor directo de la NA por descarboxilación) causó un aumento en paralelo de la SRIH, tanto a la dosis de 50 como de 100 mg/kg (esta última dosis no se representa gráficamente por obtenerse resultados idénticos: SRIH de 15 sube a 24 pg/ μ g prt. y la GH baja de 100 a 5,5 ng/ml), y una bajada en los niveles de GH en sangre.

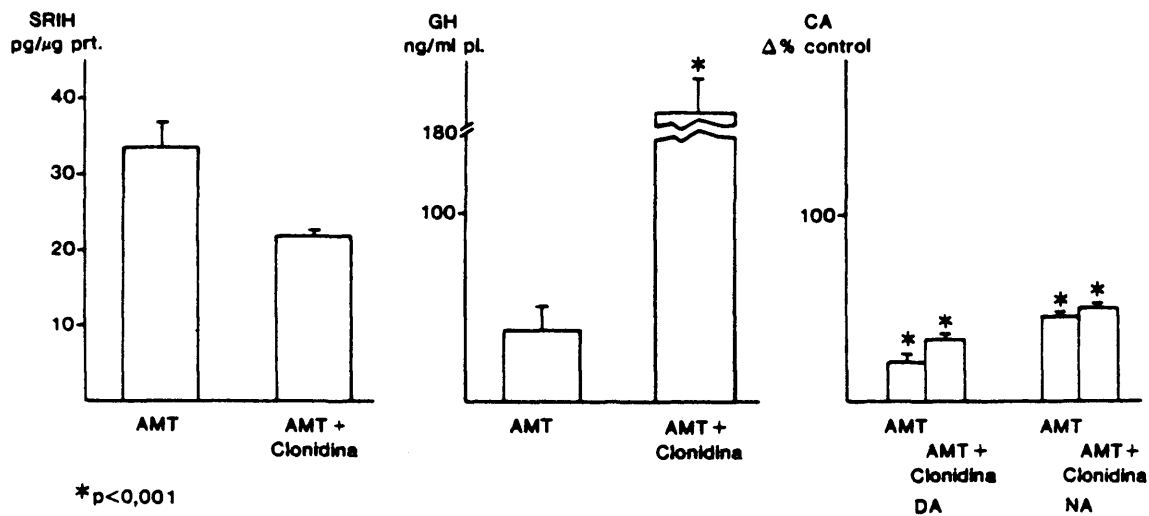
Estos resultados parecen indicar que la relación entre NA y SRIH es la contraria a la observada para la DA, es decir, la NA parece tener un efecto positivo sobre los niveles de SRIH en hipotálamo, mientras que sobre la GH su efecto no es tan claro, probablemente por existir interacciones complejas (ver discusión).

A



*p<0,01; **p<0,05

B



*p<0,001

Figura 13

Figura 13. Efecto de la administración de A: DOPS y B: AMT + Clonidina y AMT sobre los niveles de SRIH en hipotálamo, GH en plasma y CA en cerebro. A. DOPS: n=4, salino: n=4. B. AMT: n=8, AMT + Clonidina: n=5.

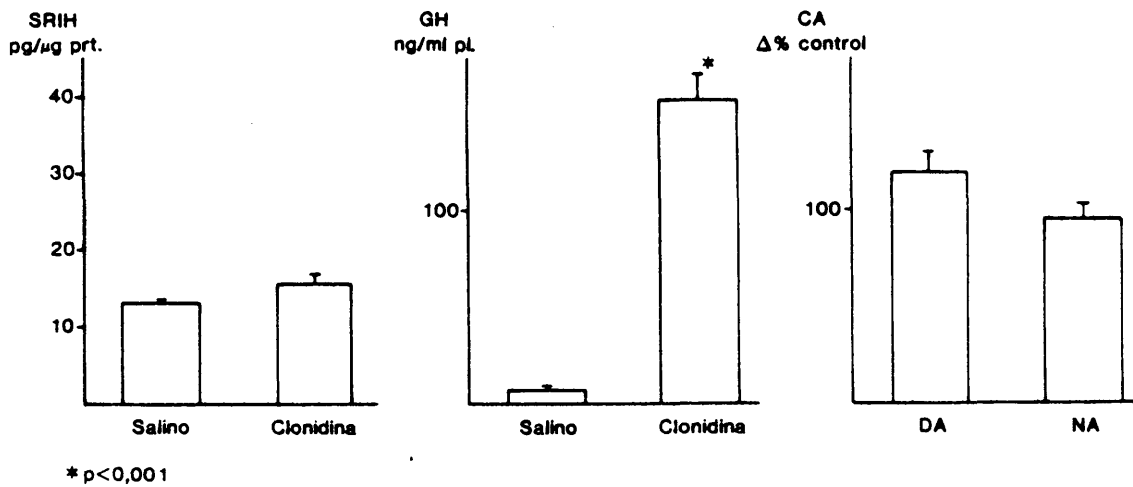
2.3.1. Actividad de las vias alfa-adrenérgicas y Somatostatina hipotalámica.

Gracias a la existencia de fármacos que interaccionan selectivamente sobre las vias alfa-adrenérgicas, se pudo profundizar sobre el papel de este subsistema adrenérgico en el control de la SRIH hipotalámica, una vez establecida la posible influencia de la NA sobre ésta.

Para ello se plantearon los experimentos 7, 8 y 13. En la Figura 13B se muestra el efecto de la administración de AMT y de AMT + Clonidina (agonista alfa-adrenérgico) sobre los niveles de DA, NA, SRIH y GH.

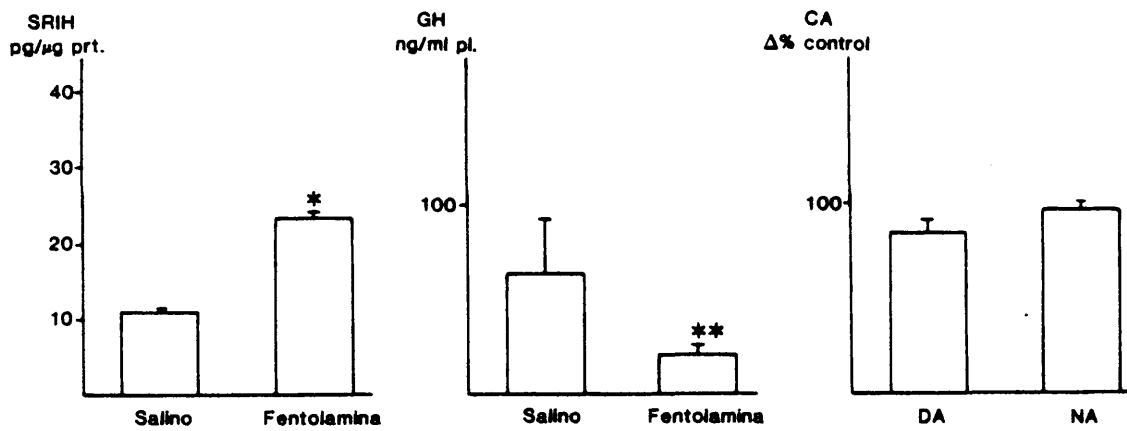
Mientras que ambas Catecolaminas se encuentran muy deplecionadas (alrededor del 30% del control para la DA y del 40% para la NA), la SRIH en el hipotálamo baja aproximadamente un 33% (lo cual no es significativo) y la GH plasmática se incrementa casi cinco veces (de 38 a 180 ng/ml). Esto ocurre tanto para la dosis de 300 µg como para la de 500 µg/kg (esta última dosis no se representa gráficamente por coincidir los resultados: SRIH bajó de 33 a 25 pg/µg prt., GH subió significativamente de 25 a 125 ng/ml).

El experimento 8, cuyos resultados se indican en la Figura 14A, nos muestra cómo tras la estimulación de las vias alfa-adrenérgicas producida por la administración de Clonidina (500 µg/kg) se produjo un gran aumento de la GH plasmática (de 5 a 158 ng/ml) sin apenas modificación de la SRIH hipotalámica (de 13 a 15,8 pg/µg prt.). A la vez, ambas Catecolaminas permanecie-



*p<0,001

B



*p<0,001; **p<0,01

Figura 14

Figura 14. Efecto de la administración de A: Clonidina y B: Fentolamina sobre los niveles de SRIH en hipotálamo, GH en plasma y CA en cerebro. A. Clonidina: n=5, salino: n=8. B. Fentolamina: n=5, salino: n=7.

ron prácticamente inalteradas: 120% del control para la DA y 93% para la NA.

Finalmente, el experimento 13, cuyos resultados se expresan en la Figura 14B, nos viene a confirmar la aparente función de las vías alfa-adrenérgicas sobre la secreción de GH. El uso de la Fentolamina como agente alfa-antagonista debería de reportarnos resultados en concordancia con los dos experimentos anteriores; y efectivamente, la GH en plasma bajó de manera significativa de 64 a 20,5 ng/ml, $p < 0,01$, y sin embargo, la SRIH hipotalámica se elevó de 11 a 23,5 pg/ μ g prt., $p < 0,001$. Al mismo tiempo, los niveles de Catecolaminas apenas se ven modificados: 83 y 97% del control para DA y NA respectivamente.

Las vías alfa-adrenérgicas, a pesar de estar claramente involucradas en el control de la GH, como sugieren estos resultados y los de otros autores, parecen afectar a la Somatostatina hipotalámica de manera no tan consistente, ya que el efecto de la Clonidina no parece muy específico, en el experimento 7 baja un poco la Somatostatina, y en el experimento 8 la sube, mientras que la Fentolamina la eleva claramente.

2.3.2. Actividad de las vias beta-adrenérgicas y Somatostatina hipotalámica.

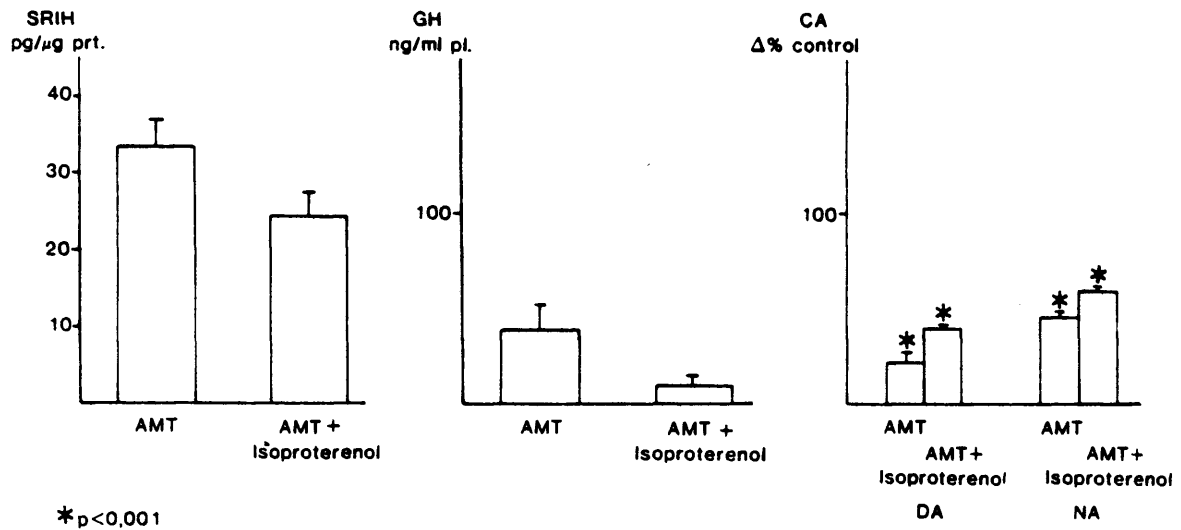
Para esclarecer la posible relación entre el subsistema beta-adrenérgico y la SRIH hipotalámica se utilizaron fármacos estimuladores o inhibidores de la actividad de estas rutas funcionales.

Los experimentos 11 y 12, cuyos resultados se expresan en las Figuras 15A y 15B nos indican que la estimulación de las vias beta-adrenérgicas por el Isoproterenol, ya sea en ratas pretratadas con AMT o por si solo, no produjo alteraciones significativas en el contenido de SRIH hipotalámica, ya que a pesar de que en el experimento 11 ésta baja bastante, de 33 a 24 pg/ μ g prt., en el experimento 12 los niveles basales y post-Isoproterenol son semejantes (12,9 y 10,6 respectivamente). La dosis de 3 mg/kg tras AMT produjo efectos similares: la SRIH disminuyó a 24,4 pg/ μ g prt.

En cuanto al efecto de la administración del agente beta-agonista sobre la GH plasmática, esta disminuyó por debajo de los valores "control", pero no de manera significativa ($0,05 < p < 0,1$). Por otra parte, los niveles de Catecolaminas no variaron respecto a sus controles (el experimento 12 perdió los valores de Catecolaminas por accidente).

En la experiencia número 14 se utilizó Propanolol como antagonista beta-adrenérgico, y en este caso, como se puede ver en la Figura 16A, la SRIH hipotalámica disminuyó de 16 a 8 pg/ μ g prt., $p < 0,02$, sin alterarse de manera significativa ni la GH ni las Catecolaminas.

A



B

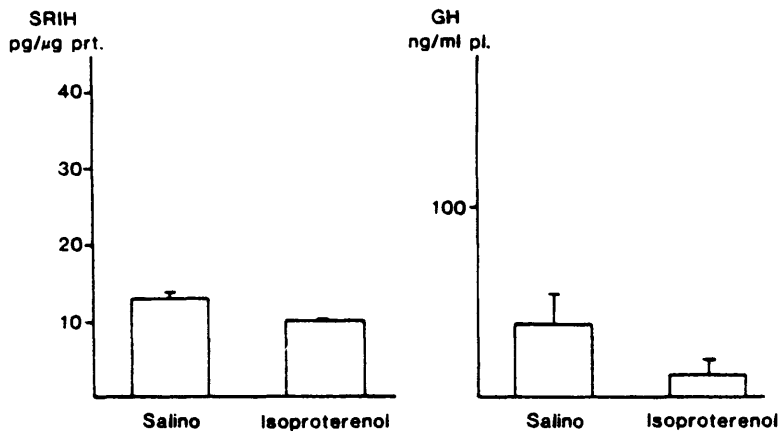
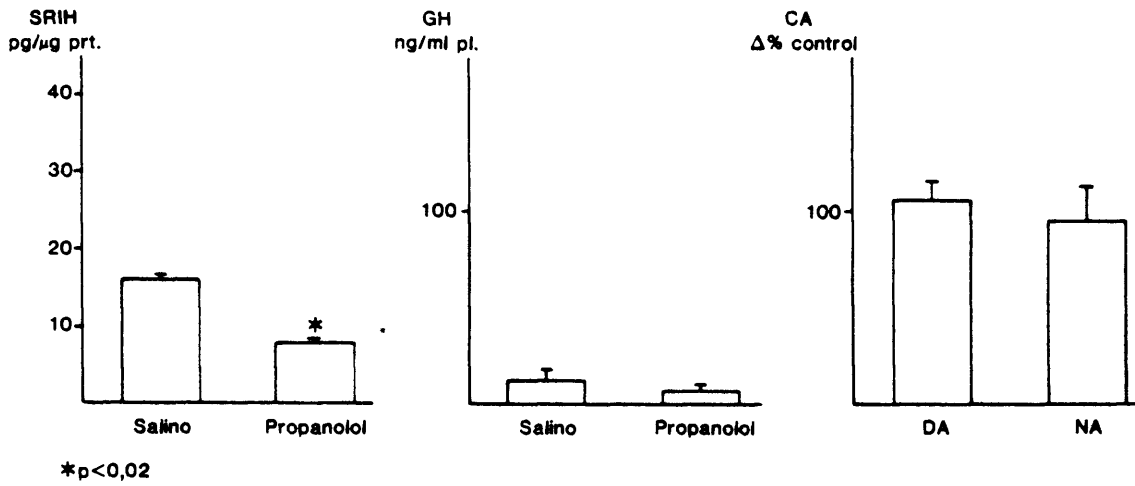


Figura 15

Figura 15. Efecto de la administración de A: AMT y AMT + Isoproterenol y B: Isoproterenol sobre los niveles de SRIH en hipotálamo, GH en plasma y CA en cerebro. A. AMT: n=8, AMT + Isoproterenol: n=5. B. Isoproterenol: n=5, salino: n=4.

Los valores de CA en B se perdieron por accidente.

A



B

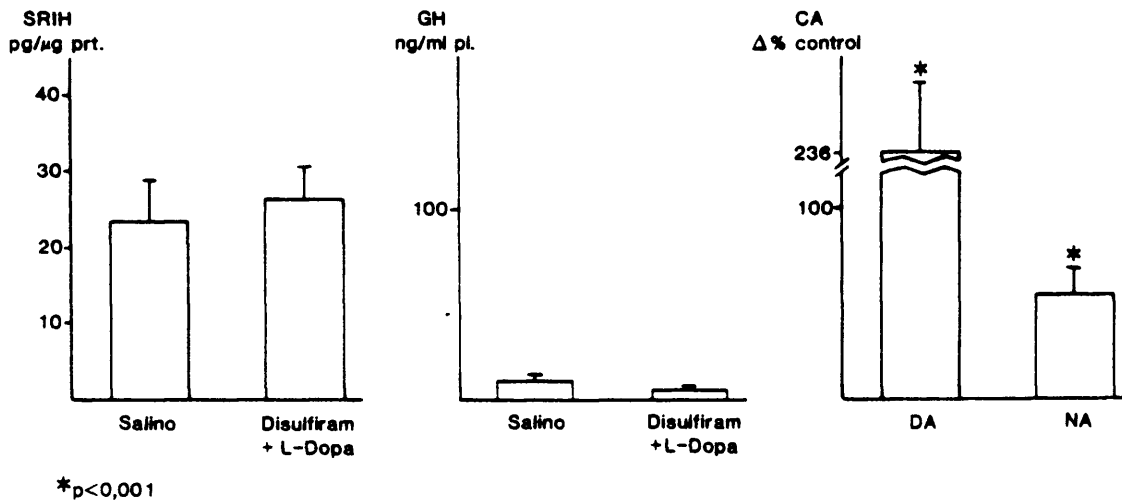


Figura 16

Figura 16. Efecto de la administracion de A: Propanolol y B: Disulfiram (4 horas) + L-dopa (1 hora) sobre los niveles de SRIH en hipotálamo, GH en plasma y CA en cerebro. A. Propanolol: $n=5$, salino: $n=6$. B. Disulfiram + L-dopa: $n=4$, salino: $n=4$.

El conjunto de estos experimentos parece indicar que las vías beta-adrenérgicas podrían tener un papel estimulador tónico sobre la SRIH, como se puede concluir del hecho de que el bloqueo de estas vías por el Propanolol produzca un descenso de los niveles de SRIH en el hipotálamo (ver discusión), mientras que sobre la GH plasmática podrían ejercer un papel inhibitorio quizás mediado por la SRIH.

2.4. Evidencias de la existencia de una interacción entre Dopamina y Noradrenalina sobre el control de la Somatostatina.

Establecida la existencia de una relación concreta de la DA y la NA con los niveles de SRIH en hipotálamo, se planteó el experimento 5 con el fin de estudiar el efecto de una variación simultánea y antagónica de la DA y la NA sobre la SRIH, de manera que se pudiera determinar el efecto combinado de ambos neurotransmisores, ya que las experiencias anteriores se habían diseñado de manera que se alteraran ambas bioaminas de igual forma, o una sola de ellas, dejando la otra inalterada.

En esta ocasión, la administración de Disulfiram + L-dopa (1 hora), produjo niveles bajos de NA y altos de DA. La Figura 16B muestra los resultados de esta experiencia. Junto a niveles del 236% de incremento de la DA y 45% de decremento de la NA, la SRIH hipotalámica permaneció sin alterar: 23,5 control frente a 26,5 pg/ μ g prt., de las tratadas, mientras que la GH disminuyó ligeramente.

Era de esperar, a la vista de los resultados anteriores, que la SRIH disminuyera drásticamente por el efecto combinado de una DA elevada y una NA baja, y sin embargo la SRIH permaneció apenas alterada.

Esto parece indicar que es necesaria la existencia de un equilibrio DA/NA para mantener los niveles de SRIH, y que sólo cuando este equilibrio se rompe, como tras una gran elevación o disminución de ambas Catecolaminas o de una de ellas selectivamente, los niveles de SRIH se ven modificados.

En cuanto a los niveles de GH, es posible aplicar el mismo razonamiento, quedando la posibilidad de que esa disminución ligera sea debida a una alteración en el GRF.

Las tablas IX y X sumarizan los resultados obtenidos tras el tratamiento de diversas drogas modificadoras del metabolismo catecolaminérgico y de aquellas modificadores de su función (agonistas y antagonistas) sobre los niveles de SRIH en hipotálamo y de GH en plasma.

Tabla IX. Efecto de la administración de drogas modificadoras del metabolismo de las Catecolaminas sobre la Somatostatina hipotalámica y la Hormona de Crecimiento plasmática.

TRATAMIENTO	N	SRIH (pg/ μ g prt.) ($\bar{X} \pm$ E.S.M.)	GH (ng/ml)
Salino	11	20,7 \pm 1,2	55 \pm 24,2
AMT	17	30,7 \pm 3,1 ^a	25,6 \pm 8,1
Salino	10	17 \pm 1,9	12,7 \pm 6,3
L-dopa	5	9,7 \pm 1 ^b	119 \pm 46,7 ^c
Salino	5	18,4 \pm 1,2	10,7 \pm 1,8
Disulfiram + L-dopa (2 h.)	4	8,5 \pm 1,1 ^b	0,8 \pm 0 ^a
Salino	4	17,3 \pm 0,8	135 \pm 42,7
DOPS	4	26,2 \pm 1,5 ^a	5 \pm 1,6 ^c
Salino	11	24,4 \pm 2,4	13,4 \pm 11,4
Disulfiram	11	16,3 \pm 2 ^a	0,8 \pm 0
Salino	4	23,5 \pm 5	10,2 \pm 2,4
Disulfiram +	4	26,5 \pm 4,7	4,6 \pm 0,9

a. $p < 0,01$; b. $p < 0,001$; c. $p < 0,05$

Tabla X. Efecto de la administración de drogas modificadoras de la función catecolaminérgica sobre la Somatostatina hipotalámica y la Hormona de Crecimiento plasmática.

TRATAMIENTO	N	SRIH (pg/ μ g prt.)	GH (ng/ml)
		(X \pm E.S.M.)	
AMT	8	33,7 \pm 3,4	38,9 \pm 17,5
AMT + Apomorfina	5	20,6 \pm 2,9 ^a	12,6 \pm 5,3
Salino	6	15,8 \pm 1,5	60 \pm 20
Apomorfina	9	9 \pm 1,7 ^b	44,7 \pm 21,3
AMT	8	33,7 \pm 3,4	38,9 \pm 17,5
AMT + Clonidina	5	22,3 \pm 0,5	182,4 \pm 18 ^c
Salino	8	13 \pm 0,6	5 \pm 0,7
Clonidina	5	15,8 \pm 1,2	158 \pm 13,3 ^c
Salino	7	11 \pm 0,5	64 \pm 28
Fentolamina	5	23,5 \pm 0,6 ^c	20,5 \pm 6 ^b
AMT	8	33,7 \pm 3,4	38,9 \pm 17,5
AMT + Isoproterenol	5	24,5 \pm 3,2	10 \pm 6

Tabla X. Continuación: efecto de la administración de drogas modificadoras de la función catecolaminérgica sobre la Somatostatina hipotalámica y la Hormona de Crecimiento plasmática.

TRATAMIENTO	N	SRIH (pg/ μ g prt.) ($\bar{X} \pm$ E.S.M.)	GH (ng/ml)
Salino	4	12,9 \pm 1	39,5 \pm 15,6
Isoproterenol	5	10,6 \pm 0,4	13 \pm 8,9
Salino	6	16 \pm 1,8	12 \pm 6
Propanolol	5	8,1 \pm 1 ^a	7,2 \pm 2,8

a. $p < 0,02$; b. $p < 0,01$; c. $p < 0,001$

3. Contenido a lo largo de un ciclo ultradiano de Somatostatina y Catecolaminas en el hipotálamo y de Hormona de Crecimiento en plasma.

La Figura 17 muestra el perfil de variación horaria de los niveles plasmáticos de GH e hipotalámicos de SRIH a lo largo del intervalo 9,30 - 14,30 horas.

En la tabla XI se detallan los valores numéricos para cada punto de las figuras 17 y 18. Se aprecia una ciclicidad de la GH en sangre, con ritmos de 1-2 horas: 9,30 a 11, 11 a 12 y 12,30 a 14,30; y picos de secreción máxima a las 10,30, 11,30 y 13 horas, mientras que el contenido de SRIH hipotalámica no tiene una variación cíclica obvia a lo largo de este mismo período.

En la Figura 18 se señalan los niveles de NA y DA hipotalámicas durante el mismo tiempo, observándose un ciclo de aproximadamente dos horas de duración para la DA, de 10 a 12 y 12 a 14 horas, y máximos a las 11 y 14 horas. La NA sin embargo, no parece tener una ritmicidad evidente a lo largo de este mismo período de tiempo.

Se realizaron pruebas de Regresión Lineal separadas para los siguientes parámetros: tiempo y niveles de SRIH, tiempo y niveles de DA, tiempo y niveles de NA. Se observó una correlación inversa significativa entre el tiempo 9,30 - 11,30 y los niveles de SRIH en hipotálamo: Coeficiente de Correlación (CC)= -5,8; $t=3,4$ y una $p < 0,01$; y una correlación directa entre los tiempos 12 - 14,30 y el contenido hipotalámico de SRIH, $CC= 5,2$; $t= 8,6$ y una $p < 0,001$.

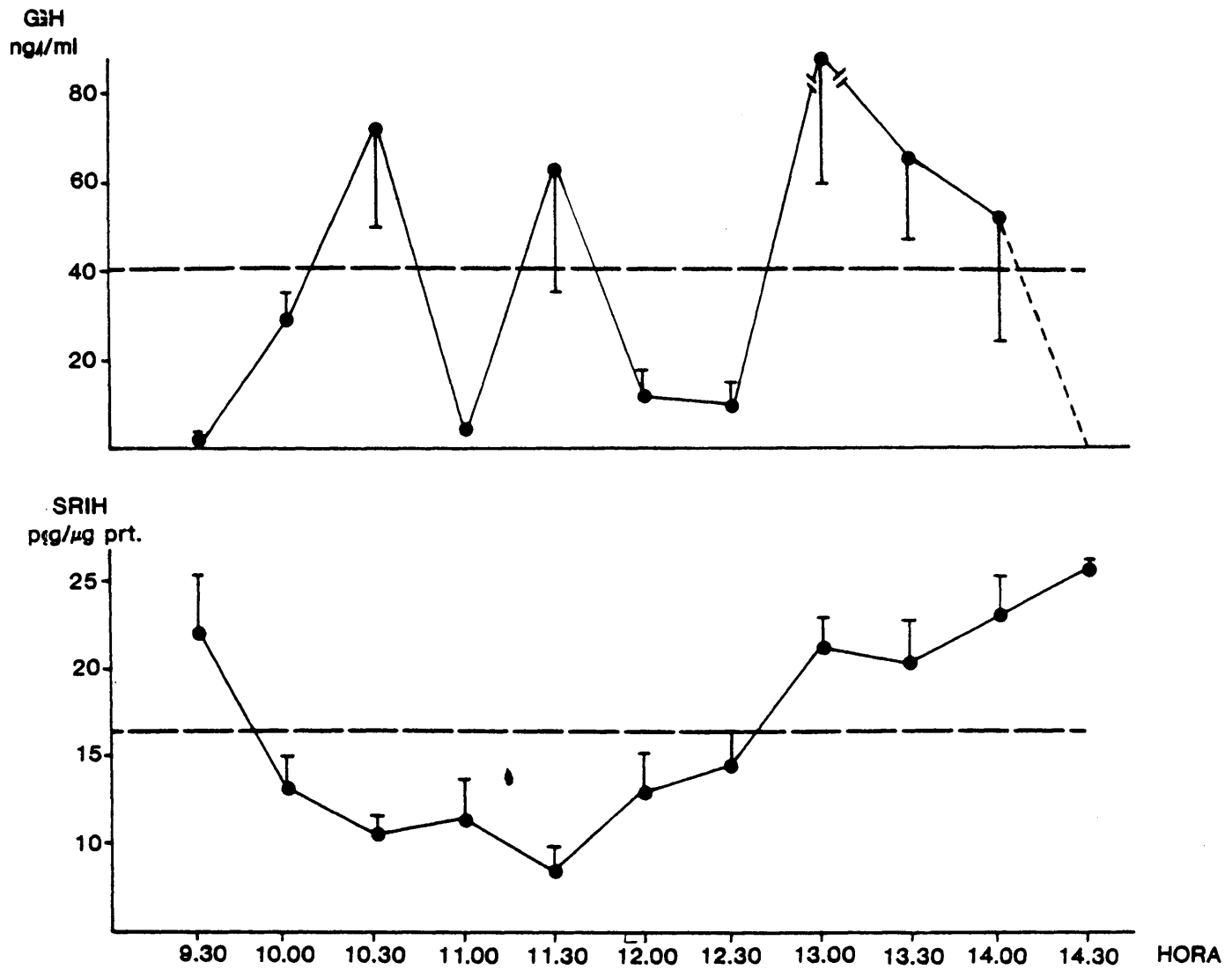


Figura 17

Figura 17. Concentraciones de GH en plasma y SRIH en hipotálamo medidas a lo largo de cinco horas (para hacer patente mas de un ciclo ultradiano de GH). Cada punto representa la media \pm error estándar de 4 - 13 animales. La línea horizontal discontinua es la media de todos los valores obtenidos de 9,30 a 14,30.

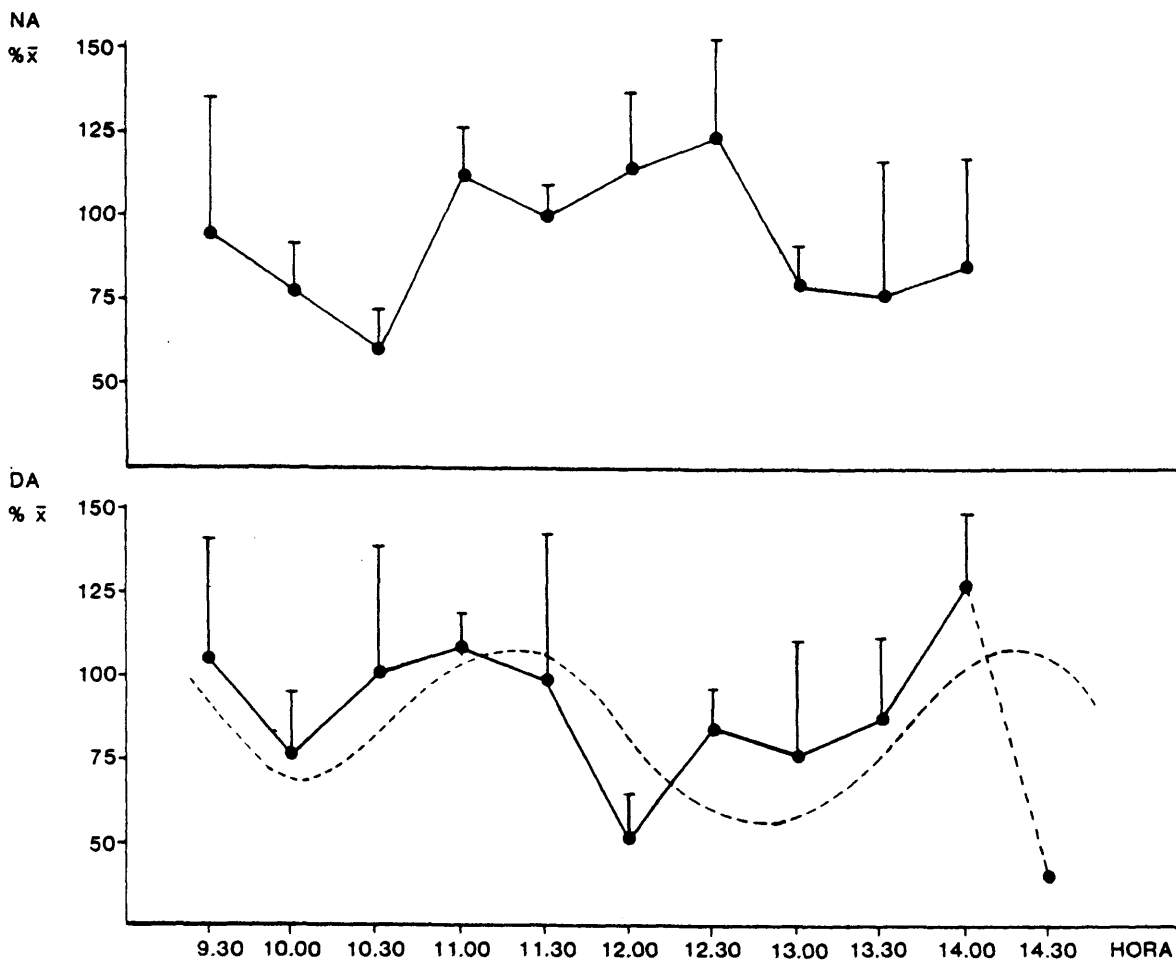


Figura 18

Figura 18. Niveles de Noradrenalina (NA) y Dopamina (DA) en hipotálamo a lo largo de cinco horas. Los resultados se expresan como incremento o decremento porcentual respecto a la media de todos los valores obtenidos, tomada ésta como 100%. El trazo discontinuo que circunda las variaciones en la concentración de DA representa el ciclo ideal ultradiano para esta bioamina.

Para el tiempo 12 - 14 horas, se observó una correlación directa con los niveles de DA, $CC= 30,5$; $t= 3,2$ y una $p<0,02$; y entre el tiempo 10,30 - 12,30 y los niveles de NA, $CC= 27,3$; $t= 2,3$ y una $p<0,02$.

Aplicando el mismo test de regresión lineal a los cinco parámetros (tiempo, SRIH, DA, NA y GH) tomados dos a dos, no se halló una correlación significativa para ninguno de ellos, lo cual no quiere decir que no se dé una relación entre las Catecolaminas, la GH y la SRIH, pero que en las condiciones experimentales dadas, ésta no se ha hecho aparente.

Probablemente, además, esto puede querer decir que las fluctuaciones pulsátiles de la GH y la bajada y subida de los niveles intra-hipotalámicos de SRIH no son consecuencia exclusiva de las fluctuaciones de las Catecolaminas centrales, sino que otros factores (distintos neurotransmisores, neuropéptidos, el GRF...) entran también en juego.

De cualquier forma, no se pueden descartar algunas relaciones mas o menos aparentes que se discutirán mas adelante.

Tabla XI. Niveles de Somatostatina y Catecolaminas en hipotálamo y de Hormona de Crecimiento en plasma a lo largo del período 9,30 - 14,30 horas.

HORA	N	SRIH (pg/μg prt.) ($\bar{X} \pm$ E.S.M.)	GH (ng/ml) ($\bar{X} \pm$ E.S.M.)	DA (% Control) ($\bar{X} \pm$ E.S.M.)	NA ($\bar{X} \pm$ E.S.M.)
9,30	6	22,1 \pm 3,4	2,6 \pm 1,4	106 \pm 35	93,5 \pm 46
10	6	13,3 \pm 1,8	29,3 \pm 6,1	78 \pm 21,8	79 \pm 16
10,30	7	10,7 \pm 1	73,1 \pm 24,5	102 \pm 40	59,8 \pm 13
11	10	11,6 \pm 2,3	5,5 \pm 1,1	109 \pm 11	112 \pm 17
11,30	7	8,5 \pm 1,5	64,1 \pm 29	100 \pm 38,9	100 \pm 9
12	11	12,9 \pm 2,3	12,3 \pm 6	53 \pm 17	117 \pm 22
12,30	13	14,5 \pm 2,1	10,7 \pm 4,5	85 \pm 13	122 \pm 38
13	12	21,2 \pm 1,8	92,3 \pm 29,1	76 \pm 30	81 \pm 13
13,30	6	20,3 \pm 2,3	65 \pm 18,2	89 \pm 25	77 \pm 41
14	7	23 \pm 2,4	52,4 \pm 28	129 \pm 22	85 \pm 38
14,30	4	25,6 \pm 0,5	0,8 \pm 0	- ^a	-

a. Las muestras de Catecolaminas para esos tiempos se perdieron por accidente.

Notas.

1. El desarrollo de esta técnica ha supuesto su utilización en protocolos de investigación paralelos llevados a cabo en este mismo laboratorio.
2. Se observan diferencias en los niveles basales entre el experimento 1 y 2 debido a la ya mencionada pulsatilidad en la secreción de esta hormona.
3. Los efectos del Disulfiram se discuten mas adelante.
4. Convencionalmente representamos los valores indetectables como menores de 0,8 ng/ml, límite inferior de sensibilidad de nuestra curva patrón en el RIA de GH.

D I S C U S S I O N .

DISCUSION.

1. Puesta a punto del radioinmunoensayo de Somatostatina. "

El método de iodación mediante lactoperoxidasa permite obtener una hormona marcada radiactiva menos alterada que con otros métodos de marcaje radiactivo en donde se utilizan oxidantes mas drásticos (como la cloramina-T del método Greenwood) que suelen alterar también en exceso la inmunorreactividad de la hormona radiactiva por oxidación de alguno de los residuos que participan en la interacción con el anticuerpo. De ahí que el perfil de elución cromatográfica en CM-22 muestre un pico de hormona dañada menor que el de hormona en buenas condiciones inmunologicas.

En definitiva, lo que interesa es que la hormona marcada sea capaz de reaccionar con el anticuerpo de forma análoga a como lo hará la forma endógena de la hormona, de tal manera que pueda competir con ésta. Esto se demuestra mediante la obtención de una curva patrón donde cantidades crecientes de hormona "fría" son capaces de desplazar progresivamente a cantidades constantes de hormona marcada.

Se elige como método de purificación de la mezcla de reacción de iodación la cromatografía de cambio iónico porque es más rápida y no se producen interferencias con la resina como ocurre con los geles de cromatografía por exclusión molecular (199).

Todas estas precauciones, no siempre observadas con otras hormonas peptídicas, se toman por la importancia que tiene el que la hormona marcada sea lo mas pura y estable posible, para obtener

sensibilidades adecuadas (en nuestro RIA se trabaja con rangos de concentración de pg/ml).

Este factor de la sensibilidad del método viene también determinado por la actividad específica de la hormona radiactiva, que al ser de 72 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ N-Tir-SRIH, está muy por encima de los mínimos establecidos de 30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de hormona (194).

Es importante también que el anticuerpo se pueda utilizar lo más diluido posible para evitar interacciones no deseables entre las moléculas del anticuerpo y las de hormona. Estas interacciones serían debidas a un excesivo número de moléculas de anticuerpo en comparación con las de hormona, que podrían dar lugar a precipitaciones inespecíficas. En la práctica, las concentraciones de anticuerpo óptimas varían según la calidad de éste y de la hormona en cuestión. Nuestros títulos de 1/28.000 y 1/35.000 para el Ab 6 y Ab M respectivamente, quedan dentro de lo normal para otros radioinmunoensayos descritos (200 201).

El rango que se obtiene para nuestra curva patrón, de 10 a 5.120 pg/ml es suficiente ya que abarca holgadamente los valores normales basales o estimulados de SRIH en hipotálamo (diluidos previamente).

Por otra parte, el hecho de que las muestras de hipotálamo de rata en concentraciones crecientes den rectas paralelas a la de la curva patrón, nos indica que lo que estamos determinando en el tejido hipotalámico es idéntico a la hormona de referencia utilizada, al menos en cuanto a su capacidad para reaccionar con el anticuerpo, o lo que es lo mismo, su inmunorreactividad.

Otra prueba de la identidad entre hormona endógena y hormona estandar es el que ambas poseen un comportamiento cromatográfico semejante en cromatografía en Sephadex G-25, como muestran datos publicados por nuestro laboratorio (202).

En definitiva, hemos desarrollado un método de RIA para somatostatina que nos permite valorar el contenido de esta hormona en el hipotálamo de rata (y otros tejidos) con entera fiabilidad y reproducibilidad de acuerdo con los controles de calidad del método de RIA que se describen en la literatura (194, 195).

2. Modulación de las Catecolaminas cerebrales: Efectos sobre la Somatostatina hipotalámica y la hormona de crecimiento plasmática.

La serie de experimentos realizados con el inhibidor (AMT) y el precursor (L-dopa) de la biosíntesis de DA y NA (203, 204), parecen establecer una relación inversa entre niveles en cerebro de catecolaminas e hipotalámicos de SRIH; mientras que con la GH, como ya han demostrado otros autores en la rata y otras especies (146-148, 150-152), la relación es directa: un incremento de catecolaminas en cerebro produce un incremento en la GH plasmática y viceversa.

Esto parece sugerir que el efecto global de las vías catecolaminérgicas sobre el contenido hipotalámico de SRIH es de tipo negativo. Ahora bien, el que esta influencia sea a nivel de síntesis y/o liberación de SRIH es más difícil de aclarar: ¿se acumula SRIH en el hipotálamo tras el tratamiento con AMT por una mayor síntesis y/o por una menor liberación?, y es más, ¿una mayor síntesis produciría una mayor liberación, y viceversa?.

Si observamos que a la vez se produce un descenso en los niveles plasmáticos de GH, hemos de considerar que difícilmente puede haber una menor liberación de SRIH a la sangre porta-hipofisaria tras AMT. El mismo fenómeno, pero a la inversa, se observa tras la administración de L-dopa.

Existen varias explicaciones posibles. Se ha observado que la administración de GABA produce un aumento en el contenido hipotalámico de SRIH y de GH en sangre en ratas (122), y que este

mismo neurotransmisor inhibe la liberación de ésta hormona hipotalámica en cultivos de células hipotalámicas (123). Esto se puede interpretar como que el GABA tiene un efecto inhibitor sobre la liberación de SRIH, lo que a su vez produce un aumento en el contenido hipotalámico de esta hormona y una desinhibición de la GH (122).

Si aplicamos el mismo razonamiento para explicar el efecto de la AMT y la L-dopa sobre la GH, nos encontramos con que sólo si invocamos la existencia de un segundo factor en juego, el GRF, se puede aclarar este mecanismo: no es posible que la SRIH se encuentre aumentada en el hipotálamo porque su liberación en la EM se halle disminuída y a la vez esté inhibiendo más a la GH.

Por tanto, este efecto de la AMT sería debido a que el GRF se encontrará disminuído en su actividad, lo que supondría una liberación de GH también disminuída. En efecto, algunos autores han demostrado que este GRF es catecolaminas-dependiente: si se administra AMT o clorpromacina a ratas conscientes, el pulso rítmico de GH desaparece, y no se restablece por administración de anti-SRIH (205), indicando que es el GRF el que se encuentra disminuído por defecto de catecolaminas, y que por tanto no es posible mantener la pulsatilidad. Un hecho que corrobora que esta pulsatilidad depende de la integridad funcional del GRF es que la administración de anti-SRIH es incapaz de abolirla (66). Por tanto, y según esto, se podría concluir que el efecto de disminución y aumento de GH tras AMT y L-dopa respectivamente, está mediado por el GRF, teniendo la SRIH una significación funcional secundaria como mediadora de los efectos de las catecolaminas

sobre la GH en la hipófisis.

Existe también la posibilidad de que la propia SRIH influya sobre el GRF de forma negativa (70) como se ha descrito para el TRH (55). Hay datos anatómicos que permiten esta hipótesis: en el núcleo ventromedial hipotalámico, zona donde algunos autores han localizado la actividad biológica de GRF (75, 206), hay una gran inervación somatostatinérgica cuya significación funcional se desconoce (19) que podría mediar una influencia de la SRIH sobre las neuronas productoras de GRF. De esta forma, la SRIH, modulada por las catecolaminas afectaría a su vez al GRF (el cual puede verse influido por las catecolaminas), originando este conjunto de interacciones una respuesta concreta de la célula somatotropa hipofisaria.

Sin embargo, se puede argüir que una mayor concentración hipotalámica de SRIH tras AMT no significa necesariamente el que haya una menor liberación, puede ser debida a una mayor síntesis que a su vez provoque una mayor liberación, es decir, que la transmisión peptidérgica de tipo somatostatinérgico se encuentre activada al desaparecer la inhibición catecolaminérgica tras la AMT, y que ocurra lo contrario cuando se administra L-dopa.

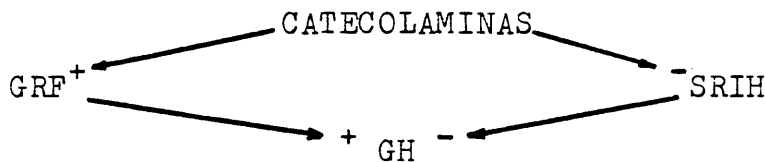
Se ha observado que la liberación de SRIH de cultivos neuronales producida por estímulos despolarizantes (K^+) sólo supone alrededor de un 2% del contenido tisular total (119), lo cual puede querer decir que una mayor liberación no tiene por qué afectar apreciablemente los niveles hipotalámicos de SRIH, disminuyéndolos ostensiblemente. Por el contrario, un mayor acúmulo por una mayor síntesis sí que podría afectar la liberación basal

de esta hormona a través de mecanismos de autorregulación intraneuronal.

Esta propuesta viene apoyada además por la observación de que la inyección de reserpina, inhibidor de la función catecolaminérgica (y serotoninérgica), provoca una disminución de la GH que se bloquea por la administración de anti-SRIH, lo que indica que es la SRIH la que está mediando el efecto de la reserpina (205). Lo mismo puede ocurrir cuando la actividad catecolaminérgica esté bloqueada por la AMT: que la liberación de SRIH esté aumentada también y produzca una disminución de GH. No se puede descartar un efecto de la serotonina en la acción de la reserpina sobre la GH a pesar de que se ha demostrado que la actividad de esta sobre la GH depende de sus propiedades anti catecolaminérgicas y no anti serotoninérgicas (148).

Ambas explicaciones no son incompatibles, y por tanto es posible explicar el mecanismo por una de las dos formas o por ambas; que la actividad de GRF se encuentre disminuída en parte, y que la de SRIH se encuentre aumentada en parte a la vez tras la administración de AMT y que ocurra lo contrario cuando se administre L-dopa.

En el siguiente cuadro se sumarizan estas conclusiones:



La actividad dopaminérgica parece a su vez ejercer una influencia negativa sobre los niveles de SRIH en hipotálamo, como indican nuestros resultados. Hemos observado también una disminución de los niveles plasmáticos de GH (aunque no significativa). Ambos datos sugieren que la DA estimula la liberación de SRIH a la sangre porta y que ésta inhibe la liberación de GH.

Efectivamente, diversos autores han encontrado un efecto estimulador de la DA sobre la liberación de SRIH en cultivos "in vitro" o en animales anestesiados, que explicaría este efecto inhibitorio de la DA sobre la GH, como otros autores han señalado también (116-118, 153).

Sin embargo, debido a que un estímulo liberador sobre las neuronas SRIH no parece afectar tanto a los niveles intrahipotalámicos de esta hormona como ya se ha indicado (119), y que no todos los autores han encontrado un efecto claro de la DA sobre la GH o la SRIH (65, 146, 147, 172), cabe sugerir otra explicación a estos resultados, quizás un poco más compleja, pero más plausible: los terminales dopaminérgicos a nivel de la EM tendrían un efecto estimulador sobre los axones somatostatinérgicos a ese mismo nivel, y a la vez, una influencia negativa a nivel de terminaciones DA en el hipotálamo anterior, sobre las neuronas SRIH, de tal manera que la suma de ambos efectos produjera un descenso neto en la concentración intrahipotalámica de SRIH.

Este mecanismo dual lo han propuesto también otros autores para explicar el efecto de la NA sobre la GH según se administre central o periféricamente (157), y además, está apoyado por la

evidencia anatómica de una inervación dopaminérgica no sólo a nivel de la EM sino también en la zona hipotalámica anterior (19). Igualmente, una influencia negativa de la DA sobre la actividad GRF como algunos autores han propuesto (207), podría estar incidiendo en este efecto de la DA sobre la secreción de GH.

Por tanto, podemos decir que el efecto de las vías DA sobre los niveles de SRIH en el hipotálamo es de tipo negativo, y que la disminución de la secreción de GH que se observa puede estar mediada por un efecto liberador de la DA sobre los terminales SRIH a nivel de la EM y/o de una inhibición de la actividad del GRF. Sin embargo, al no darse una disminución de la liberación de GH de forma evidente, el posible efecto que pudiera ejercer la DA bien a través de la SRIH por sí sola o en conjunto con el GRF, no es fácilmente definible con los presentes datos.

El efecto que ejerce la NA sobre la SRIH parece contrario al ejercido por la DA. La disminución de los niveles de NA cerebral producida por el inhibidor de su síntesis el disulfiram (208), y el incremento de NA que sigue a la administración de DOPS (151), producen una disminución y una elevación de la SRIH hipotalámica respectivamente, indicando una relación directa entre niveles en cerebro de NA e hipotalámicos de SRIH.

En cuanto a los efectos sobre los niveles de GH de estas modificaciones en los niveles de NA, los resultados no parecen claros. Ambas drogas, a pesar de que alteran de forma contraria a la NA, producen efectos similares sobre la GH, disminuyéndola

en ambos casos, aunque para el disulfiram el efecto no sea estadísticamente significativo. Una posible explicación a este respecto es que el incremento de NA produzca no solo una acumulación de SRIH en el hipotálamo, sino también una mayor liberación como algunos autores han podido comprobar en experiencias "in vitro" o en animales anestesiados (116, 118), donde al administrarse NA se producía un incremento en la liberación de SRIH (aunque no todos los autores han podido corroborar este efecto, ver 117, 119); con lo que este incremento de SRIH disminuirá los niveles de GH.

Por el contrario, el efecto del disulfiram disminuyendo los niveles de GH y a la vez de SRIH sólo se puede explicar si suponemos que el GRF se encuentra influido positivamente por la NA y negativamente por la DA (205, 207), y cuya disminución, producida por la deplección de NA y el ligero aumento en paralelo de la DA (ver resultados de la administración de disulfiram) en este caso produce una secreción disminuida de GH a pesar de que la SRIH pudiera estar también disminuida en cuanto a su liberación a la sangre porta. De hecho, se ha observado una disminución de la GH tras el disulfiram en ratas macho (209, 210) y en hembras ovariectomizadas cuyos hipotálamos no liberaban SRIH al serles añadidos NA en el medio de incubación, lo cual indicaría que la disminución de la GH estaría mediada fundamentalmente por una inhibición del GRF (164).

De cualquier forma, es evidente que los efectos de la modificación de la NA del cerebro sobre la GH no se pueden explicar únicamente por las modificaciones que se hacen aparentes para la

SRIH, siendo necesario involucrar al GRF en este efecto.

Hemos observado una influencia positiva de las vias alfa¹-adrenérgicas sobre la secreción de GH, efecto que está ampliamente documentado en la literatura y que parece común a todas las especies estudiadas (65, 71, 147, 151, 152, 153, 154, 157, 158). Diversos autores sostienen que este efecto está mediado por el GRF a partir de las siguientes observaciones: el decremento producido en la liberación de GH por la administración de reserpina se bloquea, e incluso se produce una estimulación de la GH por la administración de clonidina; efecto que se mantiene si se administra previamente a la clonidina un suero anti-SRIH a estos animales "reserpinizados", indicando que con o sin SRIH el estímulo alfa-adrenérgico se mantiene (205). Es más, el decremento producido por la yohimbina (antagonista alfa) sobre la GH no se ve antagonizado por una administración posterior de anti-SRIH (127), lo que parece apoyar que la SRIH no media el estímulo alfa-adrenérgico sobre la GH, y que es únicamente el GRF el responsable de su efecto positivo. Además, la estimulación eléctrica de determinadas zonas de la amígdala que producen un aumento en la liberación de GH, si se ve antagonizada por bloqueantes alfa como la fenoxibenzamina, pero no ocurre lo mismo cuando se estimula el núcleo Ventromedial hipotalámico (núcleo donde algunos autores han localizado la actividad de GRF), lo que sugiere que esta estimulación extrahipotalámica de tipo alfa-adrenérgico pudiera estar mediada por un GRF situado en este núcleo (43). De hecho existen abundantes terminaciones NA

en el núcleo Ventromedial que pudieran justificar este efecto (19).

Nuestros resultados parecen confirmar lo anteriormente dicho. Los niveles de SRIH en el hipotálamo no se alteran de manera evidente por la estimulación alfa-adrenérgica, a la vez que la GH se incrementa de forma evidente, lo que podría indicar que la SRIH no parece mediar este estímulo. La administración de fentolamina como depresor de la actividad de las vías alfa-adrenérgicas por el contrario si parece afectar los niveles de SRIH hipotalámica, aumentándolos, a la vez que la GH plasmática, como era de esperar, disminuye.

Esto pudiera indicar un tono alfa-adrenérgico inhibitor sobre las neuronas somatostatinérgicas, como estudios preliminares han sostenido (121). Es posible por tanto, que el subsistema alfa influya sobre la secreción de SRIH hipotalámica de manera que contribuya al efecto neto sobre la secreción de GH. De cualquier forma, la mediación del GRF en el estímulo alfa parece más importante que la somatostatinérgica, pudiendo ser esta de carácter secundario.

El papel de las vías beta-adrenérgicas a la vista de nuestros resultados parece ser contrario al de las alfa, produciendo una estimulación tónica sobre las neuronas de SRIH como indica el hecho de que el propranolol (beta bloqueante) produzca un descenso significativo de los niveles de SRIH en hipotálamo.

Existen evidencias aún preliminares, de que esto puede ser

así (121); sin embargo, el isoproterenol (beta agonista), al igual que ocurría con el alfa agonista clonidina no parece afectar de forma clara los niveles de SRIH, sugiriendo que en condiciones normales la neurona SRIH se encuentra máximamente estimulada por las vías beta, de tal forma que una mayor actividad de estas vías no puede alterar la función somatostatinérgica más.

En cuanto a lo observado en estos experimentos respecto a la GH, el beta agonista isoproterenol parece disminuirla, pero no de forma significativa, y el propanolol no la afecta. Ambos resultados concuerdan con lo observado por diversos autores (160, 162), pero siguen sin aclarar el posible papel de estas vías beta en el control de la secreción de GH en la rata, ya que en otras especies como el hombre y los primates, si parecen tener un efecto inhibitor (65, 160, 153). Por lo tanto, es difícil basarse en los presentes datos sobre la GH para intentar inferir el efecto de las vías beta-adrenérgicas sobre la SRIH hipotalámica.

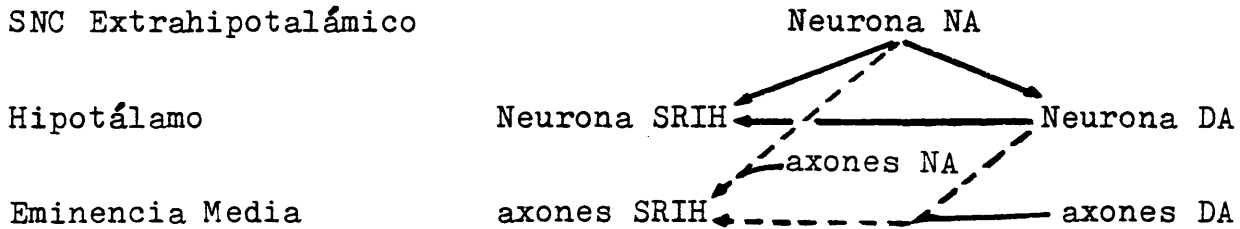
Estos resultados un poco complejos, no se pueden explicar en base a la farmacocinética de las drogas utilizadas ya que las dosis y tiempos de actuación empleados se han elegido siguiendo los estudios de la bibliografía, teniendo especial cuidado a la hora de elegir los tiempos de actividad, en no dejar incidir a los distintos agonistas y antagonistas catecolaminérgicos usados, sobre el recambio metabólico de las CA, como se ha descrito (211-214).

Es necesario invocar la existencia de una relación funcional o interacción entre las neuronas DA y NA para intentar explicar el hecho de que la SRIH hipotalámica no se altere cuando la primera esta muy aumentada y la segunda disminuída, ya que por sí misma, una relación directa e independiente de ambas vías catecolaminérgicas sobre la neurona SRIH no la aclara. De hecho, a la vista de los resultados obtenidos anteriormente, y supuesta una influencia neta de la NA y de la DA, se tendría que encontrar una disminución de la SRIH, ya que ambos factores, actuando independientemente la provocan.

Esta posible interacción entre ambas vías CA podría establecerse, de una manera por completo hipotética y que los presentes resultados no permiten más que especular, de la siguiente forma: la actividad de las neuronas NA centrales modularía en cierta manera la actividad de las dopaminérgicas en el hipotálamo en cuanto a su influencia sobre las neuronas SRIH al menos, de tal forma que en determinadas situaciones, la suma de estas interacciones determinen la respuesta somatostatinérgica concreta. En el siguiente cuadro se muestra como sería esta relación: a una actividad NA disminuída por el disulfiram le seguiría una actividad dopaminérgica también disminuída que a su vez se vería contrarrestada por un incremento en el contenido de DA producido por la administración de L-dopa, de manera que el resultado fuera una actividad de DA inalterada: por un lado recibiría un tono NA disminuído que disminuiría su propia actividad, y por otro, el incremento de su biosíntesis produciría un incremento en su ac-

tividad siendo el resultado neto de esta integración de factores antagónicos una actividad ni exagerada ni disminuída de la neurona DA, con lo que la SRIH no se alteraría.

-Posibles relaciones funcionales entre las neuronas Noradrenérgicas y Dopaminérgicas en el control de la actividad de las neuronas somatostatinérgicas.



-Posibles interacciones entre la Noradrenalina y la Dopamina sobre la liberación de Somatostatina en el hipotálamo.

<u>Tratamiento</u>	<u>Actividad neuronal</u>	<u>Liberación de SRIH</u>
Disulfiram+	NA↓ -----> DA↓	SRIH=
L-dopa (1 h.)	DA=	
	DA↑	
Disulfiram+	NA= -----> DA=	
L-dopa (2 h.)	DA↑	SRIH↓

Este esquema hipotético permite explicar los resultados obtenidos, no excluyendo otras posibles interpretaciones.

Existe una base anatómica que apoya este posible mecanismo. Se han descrito inervaciones noradrenérgicas al núcleo Arcuato y Area hipotalámica Anterior; es decir, a las áreas donde se localiza el sistema TIDA (grupo celular A 12) y las neuronas SRIH respectivamente, y además, como ya se ha indicado, estas neuronas del núcleo Arcuato no solo inervan la EM sino también emiten terminaciones a esa misma zona anterior donde se sitúan las neuronas de SRIH (19). Estas interacciones entre los tres sistemas pueden ser a nivel axo-dentrítico, axo-somático o axo-axónico. La confirmación o no de este modelo teórico supondrá nuevos resultados.

Por tanto, según los resultados obtenidos, se puede establecer una relación entre catecolaminas y somatostatina que globalmente sería de tipo inhibitor sobre los niveles de SRIH. La DA tendría un efecto también inhibitor sobre el contenido hipotalámico de esta hormona, mientras que el efecto neto de las vías noradrenérgicas sería estimulador, ejerciendo el subsistema alfa un tono inhibitor y el beta uno estimulador. El hecho de que la influencia de las vías NA consideradas globalmente sea de tipo estimulador viene a confirmar el carácter secundario de la inhibición alfa sobre la SRIH.

Esta influencia catecolaminérgica sobre la SRIH no basta para explicar por sí misma los efectos que se observan en la secreción de GH, haciéndose necesaria la involucración del GRF en la mediación de los efectos de las CA sobre la GH.

Esta última conclusión parece venir avalada por los resultados obtenidos en el estudio del contenido ultradiano de SRIH, GH y CA.

33. Variaciones ultradianas de Somatostatina, Catecolaminas y Hormona de crecimiento.

El ritmo de secreción pulsátil que se observa en la GH plasmática concuerda básicamente con lo obtenido por otros autores ((179, 183), a pesar de que el protocolo llevado a cabo en este estudio varíe ligeramente con el empleado en dichas publicaciones.

Hemos determinado el contenido de GH en plasma a una hora determinada sacrificando previamente al animal, mientras que otros autores han estudiado la variación de la GH a lo largo del día en un mismo animal canulado para poder extraerle la sangre de forma continua. Hemos recurrido a este método por ser el único que permite determinar simultáneamente el contenido hipotalámico de SRIH y CA, para lo que es necesario sacrificar al animal. Es por lo que en la bibliografía se obtienen ciclos de 2-3 horas y nosotros los encontramos de 1,30-2 horas, probablemente por el solapamiento entre los diferentes valores para cada animal individual, porque a pesar de que los animales mantenidos en idénticas condiciones ambientales poseen un ritmo de GH sincronizado, esta sincronización no es perfecta, encontrándose diferencias de media a una hora en la aparición de los picos máximos de secreción de una rata a otra (65).

Igualmente se ha observado un patrón pulsátil en el contenido hipotalámico de DA a lo largo del tiempo estudiado, que concuerda en este caso perfectamente con lo encontrado por otros autores que han utilizado un esquema de trabajo semejante al nuestro (186).

Estos mismos autores no encuentran sin embargo un patrón pulsátil en el contenido de NA en el hipotálamo, fenómeno asimismo observado por nosotros, y han querido relacionar a la DA como posible responsable en parte de la pulsatilidad en la secreción de GH, a pesar de que el papel de esta amina en la regulación de la GH en la rata no es perfectamente establecido.

A partir de estos datos hemos intentado estudiar el posible papel de la SRIH como mediadora entre ciclicidad de la DA y pulsatilidad de la GH, no encontrando una correlación estadísticamente significativa entre dichos parámetros. Según estos resultados, es difícil entonces poderle atribuir a la DA una función en la aparición de la pulsatilidad de la GH a partir de sus propias fluctuaciones ultradianas, y mucho menos relacionar a la SRIH como mediadora de este efecto como han sugerido algunos autores, (186), al menos en las condiciones experimentales empleadas por nosotros.

Por otra parte, es posible que en un estudio mas prolongado que abarcara el día entero por ejemplo, sí se pudiera apreciar una ritmicidad en los niveles de SRIH y NA (de hecho se observa una correlación entre determinados tiempos y niveles de SRIH y NA en el hipotálamo), pero esta sería de ciclos más largos necesariamente y por lo tanto difícilmente correlacionables con los de GH y DA, al menos en una escala temporal.

No puede descartarse la posibilidad de que el GRF pueda estar mediando el efecto de la pulsatilidad de la DA para provocar una pulsatilidad semejante en la GH a través de una ritmicidad propia. De hecho, el responsable de los picos de secreción máxima

de la GH parece ser el GRF y no la SRIH, ejerciendo ésta únicamente un efecto inhibitorio tónico, al parecer responsable de las bajadas periódicas en los niveles de GH en sangre (205, 182; 43).

Todo esto nos lleva a sugerir que las relaciones entre DA, NA y SRIH demostradas por los resultados obtenidos anteriormente, no se hacen aparentes a través de una variación pulsátil y paralela en el tiempo en los niveles de estas tres sustancias en el hipotálamo, y que por tanto no pueden justificar claramente la aparición de un ritmo de secreción pulsátil en la GH. Por otra parte, es distinto hablar de contenido hipotalámico que de secreción a la sangre, pudiendo la DA o la NA influir en la liberación de SRIH a la sangre porta para así incidir en la secreción de GH, de manera que no se altere apreciablemente el contenido tisular de esta hormona hipotalámica. Se daría por tanto una ciclicidad en la suelta de SRIH a la sangre porta sin hacerse apreciable a nivel celular por ser sólo un pequeño porcentaje de hormona la que se liberará. De hecho, muy recientemente se ha observado que la SRIH se libera a la EM en pulsos intermitentes con un ritmo de aproximadamente una hora y un rango de concentraciones de 1 a 10 pg min. (lo que supone una cantidad mínima del contenido tisular). Estos picos parecen responder a un sistema de retroalimentación corto entre GH y SRIH, sin hacerse evidente una mediación catecolaminérgica en este efecto. Por tanto, se podría describir un sistema hipotético de interrelación de la siguiente manera: el GRF y la SRIH modularían a la GH de forma que determinarían una secreción pulsátil de esta hormona debida a su vez probablemente

a la propia pulsatilidad en la secreción de SRIH y GRF. Este patrón de secreción de la SRIH y el GRF vendría producido por una modulación proveniente de centros nerviosos superiores. Esta actividad central parece ser llevada a cabo no en exclusiva por sistemas catecolaminérgicos, como los presentes resultados indican, haciéndose necesaria la involucración de otras vías de neurotransmisión para explicar el fenómeno de la pulsatilidad.

Nota: Partes de este trabajo han sido publicadas (215).

C O N C L U S I O N E S .

CONCLUSIONES.

- 1- Las catecolaminas influyen de manera negativa sobre los niveles de SRIH en el hipotálamo como se puede observar tras la administración de AMT y L-dopa.
- 2- La respuesta de la GH a las variaciones en el contenido de catecolaminas en cerebro puede estar mediada por la SRIH, si bien los datos de la literatura permiten sugerir que el GRF pudiera estar involucrado también, posibilidad que nuestros resultados no descartan.
- 3- El efecto de la dopamina sobre los niveles de SRIH en el hipotálamo parece ser de tipo inhibitorio.
- 4- El papel de la dopamina en el control de la secreción de GH no está establecido, ni nuestros datos son concluyentes al respecto. Sin embargo, los presentes resultados apoyan la hipótesis de que la SRIH media el efecto de la dopamina sobre la GH. No se excluye una participación mediadora del GRF.
- 5- Existe una relación directa entre niveles de noradrenalina en cerebro y SRIH en hipotálamo.

- 6- Sólo el papel mediador del GRF podría aclarar el efecto de las vías noradrenérgicas sobre la secreción de GH hipofisaria.
- 7- El efecto estimulador de la fentolamina sobre la SRIH parece indicar un tono inhibitor de las vías alfa-adrenérgicas sobre la actividad somatostatinérgica de tal manera que la clonidina es incapaz de inhibir la actividad SRIH porque esta se encuentra ya máximamente inhibida por el tono alfa-adrenérgico endógeno.
- 8- Las vías alfa-adrenérgicas modulan la actividad de la GH sin una clara intervención mediadora de la SRIH, favoreciéndose un papel principal del GRF como mediador de este efecto.
- 9- El efecto de las vías beta-adrenérgicas sobre los niveles de SRIH en el hipotálamo parece contrario al de las alfa, sugiriéndose un estímulo tónico de éstas sobre la neurona SRIH. De esta forma, el isoproterenol sería incapaz de estimular la actividad de la SRIH porque ésta se encontraría ya máximamente estimulada por el tono endógeno.
- 10- Con los datos disponibles no se puede esclarecer el papel de las vías beta-adrenérgicas en el control de la secreción de GH.

- 11- Los resultados obtenidos con los tratamientos combinados cisulfiram+L-dopa permiten establecer la existencia hipotética de una relación funcional entre vías noradrenérgicas y dopaminérgicas en el control de la secreción de somatostatina hipotalámica.

- 12- El establecido carácter pulsátil de la secreción de GH hipofisaria en la rata no parece estar mediado por una ciclicidad semejante en el contenido hipotalámico de SRIH, ni este parece estar correlacionado con el encontrado en los niveles de dopamina en hipotálamo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. T. Hökfelt, O. Johansson, R. Elde, M. Boldstein, S. Jeffcoate, N. White: "Aminergic and peptidergic hypothalamic pathways". En: "Neuroactive drugs in Endocrinology"; E.E. Müller ed., Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1980.
2. G. Fink, R. Porter: "The hypothalamo-hypophyseal system: model for central peptidergic and monoaminergic transmission". En: "Neurophysiology III"; R. Porter ed., Park Press, Baltimore 1978.
3. R. Elde, T. Hökfelt: "Distribution of hypothalamic hormones and other peptides in the brain". En: "Frontiers in Neuroendocrinology 5"; L. Martini, W.F. Ganong eds., Raven Press, New York 1978.
4. L.P. Renaud, H.W. Blume, Q.J. Pittman: "Neurophysiology and neuropharmacology of the hypothalamic tuberoinfundibular system". En: "Frontiers en Neuroendocrinology 5"; L. Martini, W. F. Ganong eds., Raven Press, New York 1978.
5. S.A. Joseph, K.M. Knigge: "The endocrine hypothalamus: recent anatomical studies". En: "The hypothalamus"; J.B. Martin, M. Baldessarini, S. Reichlin eds., Raven Press, New York 1978.
6. L. Krulich, A.P.S. Dharival, S.M. McCann: "Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro". Endocrinology 83, 783, 1968.

7. R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, R. Guillemin: "Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70, 684, 1973.
8. P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, R. Guillemin: "Hypothalamic peptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone". Science 197, 77, 1973.
9. A.V. Schally, A. Dupont, A. Arimura, T.W. Redding, N. Nishi, G. L. Linthicum, D.H. Schlesinger: "Isolation and structure of somatostatin from porcine hypothalamus". Biochemistry 15, 509, 1976.
10. J.M. Connon: "Molecular forms of somatostatin". En: "Gut hormones"; S.R. Bloom, J.M. Polak eds., Churchill-Livingstone, Edinburgh 1981.
11. A.V. Schally, W.Y. Huang, R.C.C. Chang, A. Arimura, T.W. Redding, R.P. Miller, H.W. Hunkapiller, L.E. Hood: "Isolation and structure of pro-somatostatin: a putative somatostatin precursor from pig hypothalamus". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 4489, 1980.
12. E.C. Griffiths, S.L. Jeffcoate, D.T. Holland: "Inactivation of somatostatin by peptidases in different areas of the rat brain". Acta Endocrinol. 85, 1, 1977.
13. A.G.E. Pearse: "The APUD concept and hormone production". Clinics in Endocrinology and Metab. 9, 211, 1980.

14. A. Arimura, D.H. Coy, M. Chihara, R. Fernandez Durango, E. Samols, K. Chihara, C.A. Meyers, A.V. Schally: "Somatostatin". En: "Gut hormones"; S.R. Bloom ed., Churchill - Livingstone, Edinburgh 1978.
15. L.C. Alpert, J.R. Brawer, Y.C. Patel, S. Reichlin: "Somatostatinergic neurons in anterior hypothalamus: immunohistochemical localization". *Endocrinology* 98, 255, 1976.
16. J. Epelbaum, J.O. Willoughby, P. Brazeau, J.B. Martin: "Effect of brain lesions and hypothalamic deafferentation on somatostatin distribution in the rat brain". *Endocrinology* 101, 1495, 1977.
17. C. Girod, M.P. Dubois, N. Durand: "Immunocytochemical evidence for the presence of somatostatin-immunoreactive fibers in the neurohypophysis of the monkey "Maccacus Irus". *Comptés Rendus. Societé de Biologie* 175, 347, 1981.
18. K.M. Knigge, S.A. Joseph, G.E. Hoffman: "Organization of LRF- and SRIF-neurons in the endocrine hypothalamus". En: "The hypothalamus"; J.B. Martin, M. Baldessarini, S. Reichlin eds., Raven Press, New York 1978.
19. T. Hökfelt, R. Elde, K. Fuxe, O. Johansson, A. Ljungdahl, M. Goldstein, R. Luft, S. Efendic, G. Nilsson, L. Terenius, D. Ganten, S.L. Jeffcoate, J. Rehfeld, S. Said, M. Pérez de la Mora, L. Possani, R. Tapia, L. Terán, R. Palacios: "Aminergic and peptidergic pathways in the nervous system with special reference to the hypothalamus". En: "The hypothalamus"; J.B.

Martin, M. Baldessarini, S. Reichlin eds., Raven Press, New York 1978.

20. J. Epelbaum, L.T. Arancibia, C. Kordon, O.P Ottersen, Y. Ben-Ari: "Regional distribution of somatostatin within the amigdaloid complex of the rat brain". Brain Res. 174, 1, 1979.
21. Y.C. Patel, S. Reichlin: "Somatostatin in hypothalamus, extra-hypothalamic brain and peripheral tissues of the rat". Endocrinology 102, 523, 1978.
22. M. Brownstein, A. Arimura, H. Sato, A.V. Schally, J.S. Kizer: "The regional distribution of somatostatin in the rat brain". Endocrinology 96, 1456, 1975.
23. M. Brownstein, A. Arimura, R. Fernandez Durango, A.V. Schally, M. Palkovits, J.S. Keizer: "The effect of hypothalamic deafferentation on somatostatin-like activity in the rat brain". Endocrinology 100, 246, 1977.
24. Y.C. Patel, H.H. Zingg, D. Fitz-Patrick, C.B. Srikant: "Somatostatin: some aspects of its physiology and pathophysiology". En: "Gut hormones"; S.R. Bloom, J.M. Polak eds., Churchill-Livingstone, Edinburgh 1981.
25. C. Léranth, T.H. Williams, J.Y. Jew, A. Arimura: "Immuno-electron microscopic identification of somatostatin in cells and axons of sympathetic ganglia in the Guinea pig". Cell and Tissue Res. 212, 83, 1980.
26. T. Hökfelt, R. Elde, O. Johansson, R. Luft, G. Nilsson, A. Arimura: "Immunohistochemical evidence for separate populations

- of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat". *Neuroscience* 1, 131, 1976.
27. C.G. Rassol, A.L. Schwartz, J.A. Bollinger, S. Reichlin, W.G. Bradley: "Immunoreactive somatostatin distribution and axoplasmic transport in rat peripheral nerve". *Endocrinology* 108, 996, 1981.
28. B. Krisch: "Somatostatin-immunoreactive fiber projections into the brain stem and the spinal cord of the rat". *Cell and Tissue Res.* 217, 531, 1981.
29. T. Hökfelt, L.G. Elfrin, R. Elde, M. Schultzberg, M. Goldstein, R. Luft: "Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74, 3587, 1977.
30. H.A. Dale: "Pharmacology and nerve endings". *Proc. Royal Soc. Med. (England)* 28, 318, 1935.
31. J.M. Polak, A.G.E. Pearse, L. Grimelius, S.R. Bloom, A. Arimura: "Growth hormone release inhibiting hormone (GHRIH) in gastrointestinal and pancreatic D-cells". *Lancet* 1, 1220, 1975.
32. B.L. Pimstone, M. Sheppard, B. Shapiro, S. Kronheim, A. Hudson, S. Hendricks, K. Waligora: "Localization in and release of somatostatin from brain and gut". *Fed. Proceedings* 38, 2330, 1979.
33. A. Arimura, H. Sato, A. Dupont, N. Nishi, A.V. Schally: "Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas". *Science* 189, 1007, 1975.

34. Y.C. Patel: "Peripheral distribution and actions of somatostatin". En: "Clinical neuroendocrinology: a pathophysiological approach"; G. Tolis, F. Labrie, J.B. Martin, F. Naftolin eds., Raven Press, New York 1979.
35. N. Brecha, H.J. Karten, C. Shenker: "Neurotensin-like and somatostatin-like immunoreactivity within amacrine cells of the retina". *Neuroscience* 6, 1329, 1981.
36. M.A. Ghatei, H.M. Sheppard, D.J. O'Shaughnessy, T.E. Adrian, G.P. McGregor, J.M. Polak, S.R. Bloom: "Hormonal peptides in the respiratory tract". *Acta Endocrinol.* 97, (supl. 243) Abstract-79, 1981.
37. G.W. Bennett, J.A. Edwarson, D. Marcano de Cotte, M. Berelowitz, B. Pimstone, S. Kronheim: "Release of somatostatin from rat brain synaptosomes". *J. Neurochem.* 32, 1127, 1979.
38. M. Berelowitz, S. Kronheim, B. Pimstone, M. Sheppard: "Potassium stimulated calcium dependent release of immunoreactive somatostatin from incubated rat hypothalamus". *J. Neurochem.* 31, 1537, 1978.
39. Y.C. Patel, H.H. Zingg, J.J. Dreifuss: "Somatostatin secretion from the rat neurohypophysis and stalk median eminence (SME) in vitro: calcium-dependent release by high potassium and electrical stimulation". *Metabolism* 27, (supl. 1) 1243, 1978.

40. L.L. Iversen, S.D. Iversen, F. Bloom, C. Douglas, M. Brown, W. Vale: "Calcium dependent release of somatostatin and neurotensin from rat brain "In vitro". Nature 273, 161, 1978.
41. S.L. Lee, V. Havlicek, A.E. Panerai, H.G. Friesen: "High ^{+}K induced release of somatostatin (SRIF) from the cortical preparations of rat brains". Physiol. Can. 9, 45, 1978.
42. K. Chihara, A. Arimura, C. Kubli-Garfias, A.V. Schally: "Enhancement of immunoreactive somatostatin release into the portal hypophysial blood by electrical stimulation of the preoptic area in the rat". Endocrinology 105, 1416, 1979.
43. L.C. Terry, J.B. Martin: "The effects of lateral hypothalamic-medial forebrain stimulation and somatostatin antiserum on pulsatile growth hormone secretion in freely behaving rats: evidence for a dual regulatory mechanism". Endocrinology 109, 622, 1981.
44. N. Marks: "Biotransformation and degradation of corticotropins lipotropins and hypothalamic peptides". En: "Frontiers in Neuroendocrinology 5"; L. Martini, W.F. Ganong eds., Raven Press, New York 1978.
45. A.J. Kastin, D.H. Coy, Y. Jacquet, A.V. Schally, N.P. Plotnikoff: "Central Nervous System effects of somatostatin". Metabolism 27, (supl. 1) 1247, 1978.
46. V. Havlicek, H.G. Friesen: "Comparison of behavioral effects of somatostatin and beta-endorphin in animals". En: "Central nervous system effects of hypothalamic hormones and other peptides"; R. Collu ed., Raven Press, New York 1979.

47. L.P. Renaud, J.B. Martin, P. Brazeau: "Depressant actions of TRH, LHRH, and SRIF on activity of central neurones". *Nature* 255, 233, 1975.
48. S. Ioffe, V. Havlicek. H.G. Friesen, V. Chernick: "Effect of somatostatin (SRIF) and L-glutamate on neurons of the sensorimotor cortex in awake habituated rabbits". *Brain Res.* 153, 414, 1978.
49. L. Korányi, D.I. Whitmoyer, C.H. Sawyer: "Effect of thyrotropin-releasing hormone, luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on neuronal activity of brain stem reticular formation and hippocampus in the female rat". *Experimental Neurol.* 57, 807, 1977.
50. M. Randic, V. Miletic: "Depressant actions of methionine-enkephalin and somatostatin in cat dorsal horn neurones activated by noxious stimuli". *Brain Res.* 152, 196, 1978.
51. P.L. Wood, D.L. Cheney, E. Costa: "Modulation of the turnover rate of hippocampal acetylcholine by neuropeptides: possible site of action of alfa-melanocyte-stimulating hormone and somatostatin". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 209, 97, 1979.
52. M. Göthert: "Somatostatin selectively inhibits noradrenaline release from hypothalamic neurones". *Nature* 288, 86, 1980.
53. A. Tsujimoto, S. Tanaka: "Stimulatory effect of somatostatin on norepinephrine release from rat brain cortex slices". *Life Sciences* 28, 903, 1981.

54. L. Terenius: "Somatostatin and ACTH are peptides with partial antagonist-like selectivity for opiate receptors".
Europ. J. Pharmacol. 38, 211, 1976.
55. Y. Hirooka, C.S. Hollander, S. Suzuki, P. Ferdinand, S.I. Juan: "Somatostatin inhibits release of thyrotropin releasing factor from organ cultures of rat hypothalamus". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 4509, 1978.
56. K. Chihara, A. Arimura, M. Chihara, A.V. Schally: "Effects of intraventricular administration of anti-somatostatin gamma-globulin on the lethal dose-50 of strychnine and pentobarbital in the rat". Endocrinology 103, 912, 1978.
57. D.A. Fisher, M.R. Brown: "Somatostatin analog: plasma catecholamine suppression mediated by the central nervous system". Endocrinology 107, 714, 1980.
58. C.B. Srikant, Y.C. Patel: "Somatostatin receptors. Identification and characterization in rat brain membranes". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 3930, 1981.
59. C.B. Srikant, Y.C. Patel: "Somatostatin analogs: dissociation of brain receptor binding affinities and pituitary actions in the rat". Endocrinology 108, 341, 1981.
60. M.L. Cohen, E. Rosing, K.S. Wiley, I.H. Sliter: "Somatostatin inhibits adrenergic and cholinergic neurotransmission in smooth muscle". Life Sciences 23, 1659, 1978.

61. A.J. Kastin, D.H. Coy, A.V. Schally, C.A. Meyers: "Activity of VIP, somatostatin and other peptides en the mouse "vas deferens" assay". Pharmacol. Biochem. Behav. 9, 673, 1978.
62. M. Brown, W. Vale: "Growth hormone release in the rat: effects of somatostatin and thyrotropin-releasing factor". Endocrinology 97, 1151, 1975.
63. A. Belanger, F. Labrie, P. Borgeat, M. Savany, J. Cote, J. Drowning, A.V. Schally, D.H. Coy, E. Coy, H. Immer, K. Sestunj, V. Nelson, M. Gotz: "Inhibition of GH and TSH release by growth hormone release inhibiting hormone". Moll. Cell. Endocrinol. 1, 329, 1974.
64. M. Stachura: "Influence of synthetic somatostatin upon GH release from perifused rat pituitaries". Endocrinology 99, 678, 1976.
65. J.B. Martin, P. Brazeau, G.S. Tannembaum, J.O. Willoughby, J. Epelbaum, L.C. Terry, D. Durand: "Neuroendocrine organization of growth hormone regulation". En: "The hypothalamus"; J.B. Martin, M. Baldessarini, S. Reichlin eds., Raven Press, New York 1978.
66. L. Ferland, F. Labrie, A. Arimura, A.V. Schally: "Physiological role of somatostatin in the control of GH and TSH secretion". Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 149, 1976.

67. R. Hall, M. Snow, M. Scanlon, B. Mora, A. Gomez-Pan: "Pituitary effects of somatostatin". *Metabolism* 27, (supl. 1) 1257, 1978.
68. P. Walker, J.H. Dussault, G. Alvarado-Urbina, A. Dupont: "The development of the hypothalamo-pituitary axis in the neonatal rat: hypothalamic somatostatin and pituitary and serum growth hormone concentrations". *Endocrinology* 101, 782, 1977.
69. R.A. Steiner, J.K. Stewart, J. Barber, D. Koerker, C.J. Goodner, A. Brown, P. Illner, C.C. Gale: "Somatostatin: a physiological role in the regulation of growth hormone secretion in the adolescent male baboon". *Endocrinology* 102, 1587, 1978.
70. K. Chihara, A. Arimura, M. Chihara, A.V. Schally: "Studies on the mechanism of growth hormone and thyrotropin responses to somatostatin antiserum in anaesthetized rats". *Endocrinology* 103, 1916, 1978.
71. M.A. Varner, S.L. Davis, J.J. Reeves: "Temporal serum concentrations of growth hormone, thyrotropin, insulin, and glucagon in sheep immunized against somatostatin". *Endocrinology* 106, 1027, 1980.
72. M.E. Molitch, L.E. Hliviak: "Growth hormone short-loop feedback: anatomic specification of growth hormone stimulation of hypothalamic somatostatin concentration". *Horm. Metab. Res.* 12, 559, 1980.

73. A. Kanatsuka, H. Makino, Y. Matshusima, M. Osegawa, M. Yamamoto, A. Kumagai: "Effect of hypophysectomy and growth hormone administration on somatostatin content in the rat hypothalamus". *Neuroendocrinology* 29, 186, 1979.
74. B. Baker, Y. Yen: "The influence of hypophysectomy on the stores of somatostatin in the hypothalamus and pituitary stem". *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 151, 599, 1976.
75. J.B. Martin: "Brain mechanisms for integration of growth hormone secretion". *Physiologist* 22, 23, 1979.
76. A. Arimura, W.D. Smith, A.V. Schally: "Blockade of the stress-induced decreased in blood GH by anti-somatostatin serum in rats". *Endocrinology* 98, 540, 1976.
77. L.C. Terry, W.R. Crowley: "The effects of exercise stress on somatostatin concentrations in discrete brain nuclei". *Brain Res.* 197, 543, 1980.
78. G.S. Tannebaum, J. Epelbaum, E. Colle, P. Brazeau, J.B. Martin: "Antiserum to somatostatin reverses starvation-induced inhibition of growth hormone but not insulin secretion". *Endocrinology* 102, 1909, 1978.
79. M. Berelowitz, K. Maeda, S. Harris, L.A. Frohman: "The effects of alterations in the pituitary-thyroid axis on hypothalamic content and "in vitro" release of somatostatin-like immunoreactivity". *Endocrinology* 107, 24, 1980.
80. A. Arimura, A.V. Schally: "Increase in basal and thyrotropin-releasing hormone (TRH)-stimulated secretion of thyrotropin

- (TSH) by passive immunization with antiserum to somatostatin in rats". *Endocrinology* 98, 1069, 1976.
81. W. Vale, C. Rivier, P. Brazeau, R. Guillemin: "Effects of somatostatin on the secretion of TSH and PRL". *Endocrinology* 95, 968, 1974.
82. T.M. Siler, S. Yen, W. Vale, R. Guillemin: "Inhibition by somatostatin of the release of TSH induced in man by TRH". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38, 742, 1974.
83. W. Flursheim, X. Kozbur: "Physiological modulation of TSH secretion by somatostatin and thyroliberin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 603, 1976.
84. M.D. Lumpkin, A. Negro-Vilar, S.M. McCann: "Paradoxical elevation of growth hormone by intraventricular somatostatin: possible ultrashort-loop feedback". *Science* 211, 1072, 1981.
85. R. Assan: "La somatostatine: revue des connaissances récentes". En: "Les neuro-hormones hypothalamiques"; 41 Congrès Français de Médecine, Masson, Paris 1977.
86. K.I. Richardson, A. Schonbrunn: "Inhibition of adrenocorticotropin secretion by somatostatin in pituitary cells in culture". *Endocrinology* 108, 281, 1981.
87. J.E. Gerich, M. Lorenzi: "The role of the autonomous nervous system and somatostatin in the control of insulin and glucagon secretion". En: "Frontiers in Neuroendocrinology 5"; L. Martini, W.F. Ganong eds., Raven Press, New York 1978.

88. G.S. Tannembaum: "Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: evidence of a role for endogenous circulating somatostatin". *Endocrinology* 108, 76, 1981.
89. S. Raptis, W. Schlegel, E.F. Pfeiffer: "Effects of somatostatin on gut and pancreas". En: "Gut hormones"; S.R. Bloom ed., Churchill - Livingstone, Edinburgh 1978.
90. K.E.M.M. Alberti, N.J. Christensen, S.E. Christensen, A.P. Hansen, J. Iversen, K. Lundbaek, K. Seyer-Hansen, H. Orskov: "Inhibition of insulin secretion by somatostatin". *Lancet* 2, 1299, 1973.
91. S. Efendic, P.E. Ling, R. Luft: "Somatostatin and insulin secretion". *Metabolism* 27, (supl. 1) 1275, 1978.
92. S. Efendic, T. Hökfelt, R. Luft: "Somatostatin and the endocrine pancreas". En: "Basic applications and clinical uses of hypothalamic hormones"; A.L. Charro, R. Fernandez-Durango, G. López del Campo eds., Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1976.
93. M. Itoh, L. Mandarino, J.E. Gerich: "Antisomatostatin gamma-globulin augments secretion of both insulin and glucagon in vitro: evidence for a physiologic role for endogenous somatostatin in the regulation of pancreatic A- and B-cell function". *Diabetes* 29, 693, 1980.
94. C. McIntosh, P. Schauder, R. Arnold, H. Frerichs, W. Creutzfeldt: "Somatostatin release from isolated rat pancreas islets: reversal of D-glyceraldehyde induced inhibition and the dynamics of

- release in a perfusion system". En: "Gut hormones"; S.R. Bloom ed., Churchill - Livingstone, Edinburgh 1978.
95. B.D. Noe, D.F. Fletcher, G.E. Baver, G.C. Weir, Y.C. Patel: "Somatostatin biosynthesis occurs in pancreatic islets". *Endocrinology* 102, 1675, 1978.
96. L.I. Larsson: "Somatostatin cells". En: "Gut hormones"; S.R. Bloom, J.M. Polak eds., Churchill - Livingstone, Edinburgh 1981.
97. V. Schusdziarra, R.H. Unger: "Physiology and pathophysiology of circulating somatostatin in dogs". En: "Gut hormones"; S.R. Bloom, J.M. Polak eds., Churchill - Livingstone, Edinburgh 1981.
98. G.N. De Vane, T.M. Siler, S.S.C. Yen: "Acute suppression of insulin and glucose levels by synthetic somatostatin in normal human subjects". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38, 913, 1974.
99. P.P.G. Gerber, E.R. Trimble, C.B. Wollheim, A.E. Renold, R.E. Miller: "Glucose and cyclic AMP as stimulators of somatostatin and insulin secretion from the isolated, perfused rat pancreas: a quantitative study". *Diabetes* 30, 40, 1981.
100. R.N. Honey, G.C. Weir: "Acetylcholine stimulates insulin, glucagon, and somatostatin release in the perfused chicken pancreas". *Endocrinology* 107, 1065, 1980.
101. E. Samols, J.I. Stagner, G.C. Weir: "Autonomic function and control of pancreatic somatostatin". *Diabetologia* 20, 388, 1981.

102. J. Dolais-Kitabgi, P. Kitabgi, P. Brazeau, P. Freychet: "Effect of neurotensin on insulin, glucagon and somatostatin release from isolated pancreatic islets". *Endocrinology* 105, 256, 1979.
103. M.W. Roy, M.J. Joves, R.E. Miller: "Pancreatic somatostatin secretion is suppressed by splanchnic nerve stimulation". *Diabetologia* 20, 102, 1981.
104. P.E. Lins, B. Peterson, S. Efendic: "Effects of short-term and prolonged infusions of somatostatin on endocrine pancreas, body weight and food intake in rats". *Acta Physiol. Scand.* 110, 267, 1980.
105. K. Polansky, J. Jaspan, W. Pugh, J. Dhurajwala, M. Abraham, P. Blix, R. Moosa: "Insulin and glucagon breakthrough of somatostatin suppression: importance of portal vein hormone measurements". *Diabetes* 30, 664, 1981.
106. R. Hall, J. Anderson, G.A. Smart, M. Besser: "Hypothalamus". En: "Fundamentals of clinical endocrinology"; R. Hall, J. Anderson, G.A. Smart, M. Besser eds., Pitman Books, London 1980.
107. S.J. Konturek, R. Król, W. Pawlick, J. Tasler, P. Thor, K. Walus, A.V. Schally: "Pharmacology of somatostatin". En: "Gut hormones"; S.R. Bloom ed., Churchill - Livingstone, Edinburgh 1978.
108. E.C. Lotter, R. Krinsky, J.M. McKay, C.M. Treneer, D. Porte, S. C. Woods: "Somatostatin decreases food intake of rats and baboons". *J. Comparative and Physiol. Psychol.* 95, 278, 1981.

109. V. Schusdziarra, E. Zyzner, D. Roviller, G. Boden, J.C. Brown, A. Arimura, R.H. Unger: "Splachnic somatostatin: a hormonal regulator of nutrient homeostasis". *Science* 207, 530, 1980.
110. J.L. Botha, A.I. Virik, P. Child, A. Lund, S. Van Tonder: "The effect of somatostatin on epinephrine-induced free fatty acid release in normal men". *South African Medic. J.* 52, 995, 1977.
111. B. Shapiro, K. Pienta, A. Heldsinger, A.I. Vinik: "Somatostatin is an agonist and non competitive antagonist in oxyntic cell function". *Endocrinology* 109, 1117, 1981.
112. M. Berelowitz, M. Cibelius, S. Epstein, N.H. Bell: "Biologic activity of somatostatin secreted from a transplantable rat medullary carcinoma of the thyroid". En: VI International Congress of Endocrinology, Abstract-76, Sidney 1980.
113. I.A. Reid, J.C. Rose: "An intrarenal effect of somatostatin on water excretion". *Endocrinology* 100, 782, 1977.
114. Y.C. Patel, T. Wheatley, D. Fitz-Patrick, G. Brock: "A sensitive radioimmunoassay for immunoreactive somatostatin in extracted plasma: measurement and characterization of portal and peripheral plasma in the rat". *Endocrinology* 107, 306, 1980.
115. A. Arimura, J.B. Fishback: "Somatostatin: regulation of secretion". *Neuroendocrinology* 33, 246, 1981.
116. A. Negro-Vilar, S.R. Ojeda, A. Arimura, S.M. McCann: "Dopamine and norepinephrine stimulate somatostatin release by median eminence fragments in vitro". *Life Sciences* 23, 1993, 1978.

117. K. Maeda, L.H. Frohman: "Release of somatostatin and thyrotropin-releasing hormone from rat hypothalamic fragments in vitro". *Endocrinology* 106, 1837, 1980.
118. K. Chihara, A. Arimura, A.V. Schally: "Effect of intraventricular injection of dopamine, norepinephrine, acetylcholine and 5-hydroxytryptamine on immunoreactive somatostatin release into rat hypophysial portal blood". *Endocrinology* 104, 1656, 1979.
119. L.C. Terry, O.P. Rorstard, J.B. Martin: "The release of biologically and immunologically reactive somatostatin from perfused hypothalamic fragments". *Endocrinology* 107, 794, 1980.
120. C.M. Lee, L.L. Iversen: "Release of somatostatin from extra-hypothalamic rat brain slices: inhibition by dopamine and morphine". *Brain Res.* 219, 355, 1981.
121. S. Sawano, R. Togane, T. Kobayashi, M. Irie, T. Kokubu: "The effects of adrenergic substances on portal immunoreactive somatostatin levels in rats". In: VI International Congress of Endocrinology, Abstract-165, Sidney 1980.
122. J. Takahara, S. Yunoki, H. Hogogi, W. Yakushiji, J. Kageyama, T. Ofuji: "Concomitant increases in serum growth hormone and hypothalamic somatostatin in rats after injection of gamma-aminobutyric acid, amino-oxyacetic acid or gamma-hydroxybutyric acid". *Endocrinology* 106, 343, 1980.

123. R. Gamse, D.E. Vaccaro, G. Gamse, M. Di Pace, T.O. Fox, S.L. Leeman: "Release of immunoreactive somatostatin from hypothalamic cells in culture: inhibition by gamma-amino-butyric acid". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 5552, 1980.
124. J. Epelbaum, L. Tapia-Arancibia, J. Besson, W. Rotsztejn, C. Kordon: "Vasoactive intestinal peptide inhibits release of somatostatin from hypothalamus in vitro". Europ. J. Pharmacol. 58, 493, 1979.
125. S.B. Richardson, C.S. Hollander, R. D'Eletto, P.W. Greenleaf, C. Thaw: "Acetylcholine inhibits the release of somatostatin from rat hypothalamus in vitro". Endocrinology 107, 122, 1980.
126. S.B. Richardson, P. Greenleaf, I. Starker: "Serotonin and acetylcholine inhibit somatostatin release from rat hypothalamus in organ culture". In: 61 Annual Meeting of the Endocrine Society (USA), Abstract-284, Anaheim 1979.
127. M.A. Arnold, J.D. Fernstrom: "Administration of antisomatostatin serum to rats reverses the inhibition of pulsatile growth hormone secretion produced by injection of metergoline but not yohimbine". Neuroendocrinology 31, 194, 1980.
128. M.C. Sheppard, S. Kronheim, B.L. Pimstone: "Effect of substance P, neurotensin, and the enkephalins on somatostatin release from the rat hypothalamus in vitro". J. Neurochem. 32, 647, 1979.

129. H. Abe, K. Chihara, T. Chiba, S. Matsukura, T. Fujita:
"Effects of various bioactive peptides on plasma immunoreactive somatostatin in rat hypophysial portal blood".
En: VI International Congress of Endocrinology, Abstract-77, Sidney 1980.
130. S.V. Drouva, J. Epelbaum, L. Tapia-Arancibia, E. Laplante, C. Kordon: "Opiate receptors modulate LHRH and SRIF release from mediobasal hypothalamic neurons". Neuroendocrinology 32, 163, 1981.
131. R.L. Moldow, C.S. Hollander: "Opiate peptides modulate somatostatin release from dispersed hypothalamic cells". Peptides 2, 489, 1981.
132. J.B. Martin, J. Audet, A. Saunders: "Effects of somatostatin and hypothalamic ventromedial lesions on GH release induced by morphine". Endocrinology 96, 839, 1975.
133. M.C. Sheppard, S. Kronheim, B.L. Pimstone: "Stimulation by growth hormone of somatostatin release from the rat hypothalamus "in vitro". Clinical Endocrinol. 9, 583, 1978.
134. G.S. Tannebaum: "Evidence for autoregulation of growth hormone secretion via the central nervous system". Endocrinology 107, 2117, 1980.
135. E. Penman, J.A.H. Wass, P. Goldberg, G.M. Besser, A.M. Dawson, L.H. Rees: "Response of circulating immunoreactive somatostatin to hormonal and nutritional stimuli in normal subjects". En: VI International Congress of Endocrinology, Abstract-167, Sidney 1980.

136. E. Ipp, R.E. Dobbs, V. Harris, A. Arimura, W. Vale, R.H. Unger: "The effects of gastrin, gastric inhibitory polypeptide, secretin, and the octapeptide of cholecystokinin upon immunoreactive somatostatin release by the perfused canine pancreas". *J. Clin. Invest.* 60, 1216, 1977.
137. K. Hermansen: "Pancreatic D-cell function in streptozotocin diabetes: studies with beta-hydroxybutyrate, glucose, lactate, and glucagon". *Diabetologia* 21, 282 (Abstract-224) 1981.
138. S. Epstein, M. Berelowitz, N.H. Bell: "Pentagastrin and glucagon stimulate serum somatostatin-like immunoreactivity in man". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51, 1227, 1980.
139. C. McIntosh, R.A. Pederson: "Local somatostatin secretion from the pancreas and stomach: "in vitro" studies". In: "Gut hormones"; S.R. Bloom, J.M. Polak eds., Churchill - Livingstone, Edinburgh 1981.
140. J.J. Holst, S.L. Jensen, O.V. Nielsen, T.W. Schwartz: "Nervous control of pancreatic somatostatin secretion in pigs". *Diabetologia* 21, (Abstract-234) 1981.
141. M.S. Robbins, L.H. Grouse, R.L. Sorensen, R.P. Elde: "Effect of muscimol on glucose-stimulated somatostatin and insulin release from the isolated, perfused rat pancreas". *Diabetes* 30, 168, 1981.

142. W.B. Watkins, J.F. Bruni, S.S. Yen: "Beta-endorphin and somatostatin in the pancreatic D-cell colocalization by immunocytochemistry". *J. Histochem. Cytochem.* 28, 1170, 1980.
143. Y. Goto, R.G. Carpenter, M. Berelowitz, L.A. Frohman: "Effect of ventromedial hypothalamic lesions on the secretion of somatostatin, insulin, and glucagon by the perfused rat pancreas". *Metabolism* 29, 986, 1980.
144. H.R. Berthoud, B. Jeenrenaud: "Acute hyperinsulinemia and its reversal by vagotomy after lesions of the ventromedial hypothalamus in anesthetized rats". *Endocrinology* 105, 146, 1979.
145. E. Ipp, H. Ritcher, C. Carberoglio, A. Moosa, A. Rubinstein: "Central control of circulating plasma somatostatin: effect of intracerebroventricular 2-deoxyglucose". *Diabetologia* 21, 285 (Abstract-243) 1981.
146. D. Durand, J.B. Martin, P. Brazeau: "Evidence for a role of alfa-adrenergic mechanisms in regulation of episodic growth hormone secretion in the rat". *Endocrinology* 100, 722, 1977.
147. S. Edén, K. Modigh: "Effects of apomorphine and clonidine on rat plasma growth hormone after pretreatment with reserpine and electroconvulsive shocks". *Brain Res.* 129, 379, 1977.
148. S. Edén, P. Bolle, K. Modigh: "Monoaminergic control of episodic growth hormone secretion in the rat: effects of reserpine, alfa-methyl-p-tyrosine, p-chlorophenylalanine and haloperidol". *Endocrinology* 105, 523, 1979.

149. J.B. Martin, J. Kontor, P. Mead: "Plasma growth hormone responses to hypothalamic, hippocampal and amygdaloid electrical stimulation: effects of variation in stimulus parameters and treatment with alfa-methyl-p-tyrosine (alfa-MT)". *Endocrinology* 92, 1354, 1973.
150. J.B. Martin: "Brain regulation of growth hormone secretion". En: "Frontiers in Neuroendocrinology 4"; L. Martini, W.F. Ganong eds., Raven Press, New York 1976.
151. J.W. Chambers, G.M. Brown: "Neurotransmitter regulation of growth hormone and ACTH in the Rhesus monkey: effects of biogenic amines". *Endocrinology* 98, 420, 1976.
152. F.J. Holland, G.E. Richards, S.L. Kaplan, W.F. Ganong, M. M. Grumbach: "The role of biogenic amines in the regulation of growth hormone and corticotropin secretion in the trained conscious dog". *Endocrinology* 102, 1452, 1978.
153. E.E. Müller, D. Cocchi, V. Locatelli, C. Frigerio, P. Mantegazza: "Control of growth hormone secretion by brain neurotransmitters". En: "Neuroendocrine correlates in Neurology and Psychiatry"; E.E. Müller ed., Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1979.
154. J. Stewart, D. Koerker, C. Goodner, C. Gale, R. Steiner: "Neural and metabolic regulation of spontaneous growth hormone secretion in the primate". En: VI International Congress of Endocrinology, Abstract-832, Sidney 1980.

155. R. Collu, F. Fraschini, L. Martini: "Role of indoleamines and catecholamines in the control of gonadotropin and growth hormone secretion". En: Progress in brain research 39," Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1973.
156. S. Lal, G. Tolis, J.B. Martin, G.M. Brown, H. Guyda: "Effect of clonidine on growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and tirotropin in the serum of normal men". J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 827, 1975.
157. T.A. Day, J.O. Willoughby: "Noradrenergic afferents to median eminence: inhibitory role in rhythmic growth hormone secretion". Brain Res. 202, 335, 1980.
158. S. Eden, E. Eriksson, J.B. Martin, K. Modigh: "Regulation of growth hormone secretion in the rat - Effects of antiserum to somatostatin and catecholamine receptor agonists". En: VI International Congress of Endocrinology, Abstract-252, Sidney 1980.
159. J. Jurcovicova, D. Jezova-Repceka, M. Vigas, I. Klines: "The effect of clonidine and phentolamine on growth hormone secretion during stress in the rat". Physiol. Bohemoslov. 27, 251, 1978.
160. C. Schaub, M. Blue-Pajot, F. Mounier, A. Segalen, J. Duhault: "Effects of noradrenergic agonists and antagonists on growth hormone secretion under gamma-hydroxybutyrate narco-analgesia in the rat". Psychoneuroendocrinology 5, 139, 1980.

161. G.P. Redmond, M.F. Hirsham: "Propranolol inhibits spontaneous growth hormone secretion in the rat". En: 64 Annual Meeting of the Endocrine Society (USA), Abstract-74, San Francisco 1982.
162. J.B. Martin, D. Durand, W. Gurd, G. Faille, J. Audet, P. Brazeau: "Neuropharmacological regulation of episodic growth hormone and prolactin secretion in the rat". *Endocrinology* 102, 106, 1978.
163. H. Hidaka, A. Nagasaka, A. Takeda: "Fusaric (5-Butylpicolinic) acid: its effects on plasma growth hormone". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37, 145, 1973.
164. A. Negro-Vilar, S.R. Ojeda, J.P. Advis, S.M. McCann: "Evidence for noradrenergic involvement in episodic prolactin and growth hormone release in ovariectomized rats". *Endocrinology* 105, 86, 1979.
165. P.T. Toivola, C.G. Gale: "Stimulation of growth hormone release by microinjection of norepinephrine into hypothalamus of baboons". *Endocrinology* 90, 895, 1972.
166. F. Camanni, F. Massara, L. Belforte, G.M. Molinatti: "Changes in plasma growth hormone levels in normal and acromegalic subjects following administration of 2-bromo-alfa-ergocryptine". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40, 363, 1975.

167. R.C. Gorenit: "Effect of apomorphine administration on serum concentrations of prolactin and growth hormone in cattle". *Experientia* 37, 204, 1981.
168. S. Lal, C.E. de la Vega, T.L. Sourkes, H.G. Friesen: "Effect of apomorphine on growth hormone, prolactin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone levels in human serum". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37, 719, 1973.
169. F. Casanueva, R. Betti, D. Cocchi, P. Zanardi, T. Motta, E.E. Müller: "A role for dopamine on growth hormone regulation in the dog". *Endocrinology* 108, 1469, 1981.
170. W.A. Brown, B.W. Williams: "Methylphenidate increases serum growth hormone concentrations". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43, 937, 1975.
171. J.O. Willoughby, P. Brazeau, J.B. Martin: "Pulsatile growth hormone and prolactin: effects of (+) Butaclamol, a dopamine receptor blocking agent". *Endocrinology* 101, 1298, 1977.
172. R. Yanai, H. Nagasawa: "Effect of 2-Br-alfa-ergocryptine on pituitary synthesis and release of prolactin and growth hormone in rats". *Hormone and Metab. Res.* 5, 1, 1974.
173. I. Wakabayashi, N. Miki, E. Ohmura, M. Kanda, H. Miyoshi, R. Demura, K. Shizume: "Effects of chlorpromazine, naloxone, and hypothalamic ventromedial lesions on vasoactive intestinal polypeptide induced growth hormone and prolactin releases in rats". *En: VI International Congress of Endocrinology, Abstract-337*, Sidney 1980.

174. G.M. Brown, P. Seeman, T. Lee: "Dopamine/ neuroleptic receptors in basal hypothalamus and pituitary". *Endocrinology* 99, 1407, 1976.
175. G.A. Gudelsky, J.C. Porter: "Release of newly synthesized dopamine into the hypophysial portal vasculature of the rat". *Endocrinology* 104, 583, 1979.
176. D.D. Nansel, G.A. Gudelsky, J.C. Porter: "Subcellular localization of dopamine in the anterior pituitary gland of the rat: apparent association of dopamine with prolactin secretory granules". *Endocrinology* 105, 1073, 1979.
177. M. Munemura, T.E. Cote, K. Tsunuta, R.C. Eskay, J.W. Kebalian: "The dopamine receptor in the intermediate lobe of rat pituitary gland: pharmacological characterization". *Endocrinology* 107, 1676, 1980.
178. W.F. Leebaw, L.A. Lee, P.D. Woolf: "Dopamine affects basal and augmented pituitary hormone secretion". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47, 480, 1978.
179. G.S. Tannembaum, J.B. Martin: "Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat". *Endocrinology* 98, 562, 1976.
180. S. Eden: "The secretory pattern of growth hormone". *Acta Physiol. Scand. suplemento-458*, 1978.

181. W.E. Sontag, R.W. Steger, L.J. Forman, J. Meites: "Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats". *Endocrinology* 107, 1875, 1980.
182. W.J. Willard, S.M. Reppert, S.M. Sager, J.B. Martin: "Light-dark entrainment of the growth hormone ultradian rhythm in the rat is mediated by the arcuate nucleus". *Endocrinology* 108, 2394, 1981.
183. J.O. Willoughby, L.C. Terry, P. Brazeau, J.B. Martin: "Pulsatile growth hormone, prolactin, and thyrotropin secretion in rats with hypothalamic deafferentation". *Brain Res.* 127, 137, 1977.
184. L.C. Terry, J. Epelbaum, J.B. Martin: "Monosodium glutamate: acute and chronic effects on rhythmic growth hormone and prolactin secretion, and somatostatin in the undisturbed male rat". *Brain Res.* 217, 129, 1981.
185. N.W. Kasting, J.B. Martin, M.A. Arnold: "Pulsatile somatostatin release from the median eminence of the unanaesthetized rat and its relationship to plasma growth hormone levels". *Endocrinology* 109, 1739, 1981.
186. E. Eriksson, S. Eden, K. Modigh, J. Häggendal: "Ultradian rhythm in rat hypothalamic dopamine levels". *J. Neural Transmission* 48, 305, 1980.

187. R. Luben, P. Brazeau, R. Guillemin: "Production of monoclonal antibodies to hypothalamic growth hormone releasing factor by exclusive use of in vitro immunization". En: 64 Annual Meeting of the Endocrine Society (USA), Abstract-539, San Francisco 1982.
188. P. Böhlen, M. Thorner, M. Cronin, J. Shively, B. Scheithauer: "Isolation from human neoplastic tissue and partial characterization of a growth hormone releasing factor (GRF)". En: 64 Annual Meeting of the Endocrine Society (USA), Abstract-540, San Francisco 1982.
189. O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall: "Protein measurement with Folin phenol reagent". J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
190. M. Morrison, G. Bayse, R.G. Webster: "Use of lactoperoxidase catalyzed iodination in immunochemical studies". Immunochem. 8, 289, 1971.
191. A. Arimura, H. Sato, D.H. Coy, A.V. Schally: "Radioimmunoassay for GH-release inhibiting hormone". Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 148, 784, 1975.
192. R.S. Yallow, S.A. Berson: "Labelling of proteins - problems and practices". Trans. New York Acad. Sci. 28, 1033, 1966.

193. F. Montiel: "Ontogenia de la somatostatina hipotalámica. Papel de la somatostatina hipotalámica en el síndrome de privación materna". Tesina de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, Madrid 1980.
194. R. Ekins: "The precision profile: its use in RIA assessment and design". *The Quarterly Ligand* 4, 33, 1981.
195. D. Rodbard: "Statistical quality control and routine data processing for RIA and immunoradiometric assays". *Clin. Chem.* 20/10, 1225, 1974.
196. M.K. Schelleberger, H.J. Gordon: "A rapid, simplified procedure for simultaneously assay of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine from discrete brain areas". *Anal. Biochem.* 39, 256, 1971.
197. C. Guaza, A. Torrellas, S. Borrell, J. Borrell: "The effects of acute and chronic administration of morphine on the turnover of brain and adrenal catecholamines in rats". *Psychopharmacology* 68, 43, 1980.
198. W. Hunter, F. Greenwood: "Preparation of iodine-131-labelled human growth hormone of high specific activity". *Nature* 194, 495, 1962.
199. Pharmacia Fine Chemicals: "Gel filtration: theory and practice". Uppsala 1979.

200. S. Kronheim, M. Berelowitz, B.L. Pimstone: "A radioimmunoassay for growth hormone release inhibiting hormone: method and quantitative distribution". Clin. Endocrinol. 5, 619, 1976.
201. E. Pemman, J.A. Wass, A. Lund, P.J. Lowry, J. Stewart, A.M. Dawson, G.M. Besser, L.H. Rees: "Development and validation of a specific radioimmunoassay for somatostatin in human plasma". Ann. Clin. Biochem. 16, 15, 1979.
202. R. Fernandez Durango, I. Torres, F. Montiel: "caracterización cromatográfica de la somatostatina plasmática en humanos". En: Resúmenes V Congreso Nacional de Diabetes, Sevilla 1980.
203. S. Spector, A. Sjoerdsma, S. Udenfriend: "Blockade of endogenous norepinephrine synthesis by alfa-methyl-p-tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase". J. Pharmacol. Exp. Ther. 147, 86, 1965.
204. K.E. Moore, K.T. Demarest, C.A. Johnston, R.H. Alper: "Pharmacological and endocrinological manipulations of tuberoinfundibular and tuberohypophyseal dopaminergic neurons". En: "Neuroactive drugs in Endocrinology"; E.E. Müller ed., Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1980.
205. S. Eden, E. Eriksson, J.B. Martin, K. Modigh: "Evidence for a growth hormone releasing factor mediating alfa-adrenergic influence on growth hormone secretion in the rat". Neuroendocrinology 33, 24, 1981.

206. G.S. Tannebaum, R. Eriksson: "Plasma growth hormone suppression in ventromedial hypothalamic lesioned rats is not due to hypersecretion of somatostatin". Fed. Proc. 41, 1507, 1982.
207. K. Fuxe, K. Andersson, V. Locatelli, L.F. Agnati, V. Mutt, P. Eneroth: "Hypothalamic catecholamine neuron systems and neuroendocrine control: effects of ergot drugs and neuropeptides". En: Neuroactive drugs in Endocrinology"; E.E. Müller ed., Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1980.
208. M. Goldstein, B. Anguste, E. Lauber, M.R. McKereghan: "Inhibition of dopamine-beta-hydroxylase by disulfiram". Life Sciences 3, 763, 1964.
209. L. Krulich, M.A. Mayfield, M.K. Steele, B.A. McMillen, S.M. McCann, J.I. Koenig: "Defferential effects of pharmacological manipulations of central alfa₁- and alfa₂-adrenergic receptors on the secretion of thyrotropin and growth hormone in male rats". Endocrinology 110, 796, 1982.
210. L.C. Terry, J.B. Martin: "Evidence for alfa-adrenergic regulation of episodic growth hormone and prolactin secretion in the undisturbed male rat". Endocrinology 108, 1869, 1981.
211. O.S. Steinsland, J.B. Hieble: "Dopaminergic inhibition of adrenergic neurotransmission as a model for studies on dopamine receptor mechanisms". Science 189, 443, 1980.

212. D.T. Lowenthal: "Pharmacokinetics of clonidine". J. Cardiovascular Pharmacol. 2, (Supl. 1), 329, 1980.
213. M. Casu, G. Biggio, G. Serra, G.L. Gessa: "Distinct receptors controlling dopamine synthesis and tyrosine hydroxylase in the striatum". En: "Neuroactive drugs in Endocrinology"; E.E. Müller ed., Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1980.
214. A. Carlsson: "Some aspects of dopamine in the central nervous system". En: "Advances in Neurology 5"; Raven Press, New York 1974.
215. I. Torres, C. Guaza, R. Fernandez Durango, J. Borrell, A.L. Charro: "Evidence for a modulatory role of catecholamines on hypothalamic somatostatin in the rat". Neuroendocrinology 35, 159, 1982.