

## Tesis de Posgrado

# Distribución y rol fisiológico de diferentes péptidos y enzimas en el hipotálamo del sapo *Bufo arenarum*, con especial énfasis en galanina

González Nicolini, María Valeria

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

González Nicolini, María Valeria. (1996). Distribución y rol fisiológico de diferentes péptidos y enzimas en el hipotálamo del sapo *Bufo arenarum*, con especial énfasis en galanina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2861\\_GonzalezNicolini.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2861_GonzalezNicolini.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

González Nicolini, María Valeria. "Distribución y rol fisiológico de diferentes péptidos y enzimas en el hipotálamo del sapo *Bufo arenarum*, con especial énfasis en galanina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2861\\_GonzalezNicolini.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2861_GonzalezNicolini.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**DISTRIBUCION Y ROL FISIOLÓGICO DE DIFERENTES PEPTIDOS Y  
ENZIMAS EN EL HIPOTALAMO DEL SAPO *Bufo arenarum*, CON  
ESPECIAL ENFASIS EN GALANINA.**

**María Valeria González Nicolini**

**Director de Tesis: Dr. Marcelo J. Villar.**

**Lugar de Trabajo: Instituto de Neurobiología**

**Serrano 669**

**Capital Federal.**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas  
en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad de Buenos Aires.**

**-1996-**

1996

52

DISTRIBUCION Y ROL FISIOLÓGICO DE DIFERENTES PEPTIDOS Y ENZIMAS EN  
EL HIPOTALAMO DEL SAPO *Bufo arenarum*, CON ESPECIAL ENFASIS EN  
GALANINA.

Este trabajo se llevó a cabo con el fin de comprender mejor la neuroanatomía química del área preóptico-hipotalámica del sapo, y especialmente los mecanismos regulatorios involucrados en el control de varios de los múltiples mensajeros neuronales allí presentes. Se analizó la influencia de manipulaciones experimentales en la expresión de sustancias neuroactivas poniendo énfasis particular en las neuronas que contienen el péptido galanina. Por otra parte un objetivo central de este trabajo de tesis fue estudiar las variaciones en la expresión de estas sustancias en condiciones extremas como por ejemplo durante la lesión neuronal.

Palabras claves: sapo, hipotálamo, hipofisectomía, inmunohistoquímica, galanina, sintetasa de óxido nítrico, colecistoquinina, vasopresina, tirosina hidroxilasa.

DISTRIBUTION AND PHYSIOLOGICAL ROLE OF DIFERENT PEPTIDES AND ENZIMES  
IN THE HYPOTHALAMS OF THE TOAD *Bufo arenarum*, WITH SPECIAL EMPHASIS IN  
GALANIN.

This work was conducted in order to get a better understanding of the chemical neuroanatomy of the preoptic-hypothalamic region of the toad and the regulatory mechanisms involved in the expression of some neuronal transmitters in the area. We studied the influence of experimental manipulations in the immunoreactivity of several neuroactive substances, with a particular interest in galanin containing neurons. A special aim of this work was to investigate the differential expression of these molecules under extreme circumstances such as neuronal damage.

Key words: toad, hypothalamus, hypophysectomy, immunohistochemistry, galanin, nitric oxide synthase, colecystokinin, vasopressin, tyrosine hydroxylase.

**A mis padres**

**A Christian y a Thomas**

**Al Dr. Marcelo J. Villar, por su invaluable  
enseñanza científica, su entusiasmo y  
apoyo constante. Por su personalidad  
generosa y actitud positiva en todo  
momento**

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento:

- Al Dr. J. H. Tramezzani por su colaboración científica y por brindarme el apoyo necesario para la realización de esta tesis.

- A la Dra. Angela Suburo, al Dr. Mario Bilinski, a la Dra. Sara Chiocchio y a la Dra. Beatriz Settembrini por su gran predisposición a la discusión de problemas científicos y técnicos.

- A la Dra. Adelaida Sánchez y a la Dra. Andrea Orezza por la revisión de este manuscrito.

- A todos los miembros del Instituto de Neurobiología por su ayuda en el trabajo diario, en especial a mis compañeras de laboratorio por su amistad y colaboración científica.

- A la Méd. Vet. Silvina Heisecke por su colaboración y habilidad técnica. A Angel Fusaro por su ayuda con las fotografías.

- A la Fundación del Instituto de Neurobiología, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Fundación Antorchas por el apoyo material y el otorgamiento de las becas internas. Al NIH por proveer la hormona de crecimiento.



## INDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCION	8
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIALES Y METODOS	38
4. RESULTADOS	53
5. DISCUSION	72
6. CONCLUSIONES	118
7. ILUSTRACIONES	121
8. LISTA DE ABREVIATURAS	155
9. REFERENCIAS	161
10. INDICE GENERAL	225

**RESUMEN**

La transmisión química es la principal vía de comunicación entre las células en los sistemas nervioso y endócrino. Los neurotransmisores, neuromoduladores y las hormonas son liberados desde terminales nerviosos para interactuar con receptores específicos y la señal extracelular es traducida en la célula efectora en una respuesta fisiológica. Dentro de la enorme diversidad de sustancias neuroactivas, los neuropéptidos, a menudo sintetizados como múltiples variantes moleculares, representan una forma de generar complejidad. El análisis de su distribución y plasticidad fenotípica, especialmente bajo estímulos específicos, lleva a una mejor comprensión de la estructura neuroquímica básica y de la funcionalidad de determinados circuitos.

Este trabajo se llevó a cabo con el fin de comprender mejor la neuroanatomía química del área preóptico-hipotalámica del sapo, y especialmente los mecanismos regulatorios involucrados en el control de varios de los múltiples mensajeros neuronales allí presentes. Se analizó la influencia de manipulaciones experimentales en la expresión de sustancias neuroactivas poniendo énfasis particular en las neuronas que contienen el péptido galanina. Por otra parte un objetivo central de este trabajo de tesis fue estudiar las variaciones en la expresión de estas sustancias en condiciones extremas como por ejemplo durante la lesión neuronal.

Se especula que este enfoque de investigación puede ayudar a dilucidar las demandas funcionales que afectan la estabilidad de un determinado circuito y ofrecer información para esclarecer los mecanismos de la expresión proteica especie-específica, así como los efectos de los neuropéptidos en la red neural y neuroendócrina.

## 1. INTRODUCCION

## **1.1. El Sistema Hipotalámico**

### **1.1.1. Generalidades**

Los organismos vivos, como lo señalara Claude Bernard (1878-1879), necesitan un medio interno constante. Los mecanismos responsables de mantener la estabilidad interna y coordinar las respuestas ante cualquier estímulo-disturbio que implique un cambio subsecuente en la homeostasis tienen un centro importante en el hipotálamo. Las regiones hipotalámicas pueden ser consideradas como una interfase entre el medio externo e interno y ejercen su influencia a través de la interacción de tres sistemas diferentes: el sistema neuroendócrino, el sistema nervioso autonómico y el sistema límbico (Swanson, 1987).

La neuroendocrinología constituye la rama de la neurobiología que se ocupa de la interdependencia funcional entre la actividad nerviosa y los efectos hormonales principalmente dentro del cerebro. Los problemas más importantes que estudia este área son los siguientes:

- 1- clasificación de los agentes hormonales producidos por las células nerviosas (neurohormonas);
- 2- producción y liberación de neurohormonas por células nerviosas;
- 3- mecanismos regulatorios y especialmente los retroalimentadores, involucrados en los efectos hormonales, incluyendo receptores y mecanismos de transducción de señales;
- 4- efectos directos de agentes hormonales en órganos blanco especiales;
- 5- la mediación de influencias ambientales en la actividad endócrina del cerebro.

El hipotálamo juega un rol en las funciones neuroendócrinas en dos formas: i) directamente, a nivel de la hipófisis posterior secretando sustancias neuroendócrinas en la circulación sistémica (estas hormonas liberadas por el lóbulo neural ejercen un efecto directo sobre funciones fisiológicas relacionadas con la regulación del equilibrio hidroelectrolítico, la presión arterial y la eyección de la leche), e ii) indirectamente, a nivel de la eminencia media (EM), secretando factores liberadores o inhibidores que alcanzan la hipófisis anterior a través del sistema vascular portal y regulan la secreción de las hormonas de la hipófisis anterior. La producción y liberación de neurohormonas está regulada tanto por mecanismos de retroalimentación hormonales como por aferencias nerviosas. Sin embargo, los mecanismos de adaptación y homeostasis sólo pueden operar si se recibe la información sobre una situación fisiológica particular. Para esto deben estar presentes los receptores que registren el medio interno y transfieran la información a las células nerviosas. El proceso regulatorio normal es un mecanismo de retroalimentación negativo. Esto significa que un alto nivel de hormonas periféricas o una disminución de la demanda de las mismas frena la liberación de la hormona o la actividad nerviosa que inicia su producción. Lo mismo puede ocurrir con variaciones en las condiciones fisiológicas de osmolaridad, contenido de sodio, glucemia y tantas otras reguladas por funciones nerviosas vía mediadores humorales. Además, debe tenerse en cuenta que estímulos externos tales como luz, temperatura, sonidos y disponibilidad de alimentos controlan funciones fisiológicas a través del sistema nervioso central (SNC) y de la actividad neuroendócrina. El hipotálamo recibe estímulos del medio externo vía aferencias nerviosas a partir de receptores especializados y los integra con parámetros fisiológicos internos para ser transmitidos a los órganos blanco.

El hipotálamo es una región del diencefalo que se encuentra en las paredes del tercer ventrículo por debajo del surco hipotalámico y se continúa a lo largo del piso de este ventrículo. La anatomía del hipotálamo es complicada porque los límites regionales entre las diferentes condensaciones celulares no están muy bien definidos y porque existen regiones relativamente grandes que consisten en masas de células ordenadas en forma difusa. Por otro lado, las áreas hipotalámicas que presentan respuestas anatómicas y somatomotoras específicas ante la estimulación eléctrica no siempre se corresponden con unidades nucleares morfológicamente definidas (Hess, 1947, 1956). Además se sabe que las áreas de producción de hormonas liberadoras tampoco coinciden con núcleos definidos en forma citoarquitectónica, sino que representan entidades funcionales mayores. De forma similar, estudios de reacciones comportamentales sugieren que "las neuronas responsables de un comportamiento en particular están dispersas por varias áreas cerebrales superponiéndose diversos sistemas neuronales" (Fisher, 1964).

Han habido desacuerdos considerables en cuanto al límite rostral del hipotálamo, pero ahora se acepta que la región preóptica se origina de una diferenciación rostral del hipotálamo y por lo tanto debe ser considerada parte del mismo. Esto ha sido ampliamente demostrado (Kuhlenbeck, 1927, 1930, 1937, 1954; Miura, 1933; Rose, 1935; Rose, 1942; Kuhlenbeck y Haymaker, 1949). Desde un punto de vista morfológico riguroso y estricto, basado en estudios anatómicos y ontogénicos comparativos, el hipotálamo se subdivide en cuatro regiones (Kuhlenbeck y Haymaker, 1949; Kuhlenbeck, 1954):

- 1- grupo nuclear entopeduncular y dorsal,
- 2- grupo anterior,
- 3- grupo medial y

4- grupo posterior.

Los tres últimos grupos, sin considerar la sustancia gris entopeduncular y dorsal, constituyen el hipotálamo convencional de la anatomía humana y sus límites pueden ser considerados ontogénicamente en base a dos surcos, el surco anterior intra-encefálico y el surco infundibular lateral. Durante el desarrollo el surco intra-encefálico pasa a formar la parte lateral del receso preóptico, alrededor del cual se localiza el área preóptica. En íntima asociación con el surco intra-encefálico, y caudalmente se encuentra el quiasma óptico (OC), que subdivide al hipotálamo en dos partes:

1- una parte preóptica rostral y

2- una parte infundibulo-mamilar caudal.

#### *1.1.2. El hipotálamo de los anfibios*

En los anfibios el control de la actividad secretora neuroendócrina dentro del diencefalo ocurre en el hipotálamo y en algunos órganos circunventriculares o endimarios. Como en todos los órdenes de vertebrados, la conexión entre el hipotálamo y la neurohipófisis está formada por el tracto hipotálamo-hipofisario (Hild, 1951; Mazzi, 1953; Legait y Legait, 1957; Dierickx, 1962; Weber, 1965). Además existen fibras que corren desde el hipotálamo al telencéfalo, al mesencéfalo y a ciertos órganos endimarios como el órgano subcomisural, el subfornical y el vasculoso de la lámina terminalis.

Además de los núcleos hipotalámicos activos neurosecretores, los órganos circunventriculares que pertenecen al grupo de los sistemas que contactan el fluido



cerebroespinal (FCS) también presentan actividad secretora. En el tercer ventrículo existen estructuras tipo receptor (neuronas-receptor) que contactan con el FCS y poseen procesos que protruyen en la cavidad del ventrículo; las mismas están presentes a lo largo de toda la extensión rostro-caudal del hipotálamo. A su vez el material secretor puede ser descargado dentro de los ventrículos cerebrales (Vigh y col., 1967, 1969; Vigh-Teighmann y col., 1969a, b; Vigh-Teighmann y Vigh, 1970).

En estos animales, el OC en el piso del diencefalo también divide al hipotálamo en una región preóptica rostral, que comienza en la lámina terminalis y una región infundibular caudal. El hipotálamo preóptico sólo contiene grupos de células periventriculares y puede ser subdividido en áreas anterior y posterior por medio de una zona bien definida, libre de células (Herrick, 1917; Kelley y col., 1975; Morrell y col., 1975; Neary y Northcutt, 1983). En el área preóptica anterior, un grupo de neuronas densamente agrupadas, está claramente laminado medialmente y se presenta más difuso lateralmente. Estas neuronas rodean el receso preóptico, excepto por una extensión dorsolateral contigua a la pars lateralis de la amígdala. Las mismas constituyen el núcleo preóptico (NPO) propiamente dicho. Medial y caudalmente el área preóptica anterior está separada del área preóptica posterior (más precisamente del brazo ventral del área magnocelular) por la zona libre de células, ya mencionada. En el NPO pueden distinguirse dos tipos de células: aquellas localizadas en forma intraependimaria y aquellas localizadas a los lados del epéndimo como células distales (Llinás y Precht, 1976); se ha confirmado por medio de técnicas histoquímicas que todas estas células contienen catecolaminas (Braak, 1970; Bartels, 1971). En investigaciones con microscopía electrónica no fue posible determinar donde terminan los axones que ellas proyectan; es probable que contacten el FCS, el núcleo del órgano paraventricular (NPvO), y/o la EM (Vigh-Teighmann y col., 1969a).

El área preóptica posterior contiene dos núcleos: el núcleo magnocelular y el núcleo supraquiasmático (Sc). La mitad rostral del núcleo magnocelular está dividida en los sectores dorsal (Mgd) y ventral (Mgv). El brazo dorsal, contiene neuronas grandes y algunas pequeñas y está bordeado dorsalmente por el núcleo ventromedial del tálamo, que posee una organización más laminar. El brazo ventral consiste de células grandes no laminadas, con zonas perinucleares claras y gran cantidad de neuronas de tamaño intermedio y pequeño. La mitad caudal del núcleo magnocelular parece una continuación de la mitad rostral del brazo dorsal debido a la existencia de escasas células relativamente grandes. El núcleo magnocelular es un sistema neurosecretor peptidérgico clásico desde donde los neuropéptidos son transportados a la EM y al lóbulo neural (Zambrano y De Robertis, 1968). Los cuerpos celulares dentro de este núcleo son más grandes que los de otras zonas y están inervados por fibras que poseen aminas biógenas (Vigh, 1969; Braak, 1970; Terlou y Ploemacher, 1973).

Caudalmente y según las descripciones tradicionales, el núcleo magnocelular se continúa en forma ventromedial con el Sc; un núcleo distintivamente laminado y de células pequeñas. El Sc está separado del anterior por una zona libre de células y caudalmente le forma un techo al OC, mientras éste aumenta en altura. Luego es reemplazado por el hipotálamo infundibular al final del OC.

El hipotálamo infundibular contiene dos núcleos periventriculares [el núcleo hipotalámico infundibular dorsal (NID) y ventral (NIV)] y un núcleo lateral [el núcleo hipotalámico infundibular lateral (LH)] (Herrick, 1917; Crosby y Woodburne, 1940; Neary y Northcutt, 1983). Este último núcleo consiste exclusivamente de células dispersas que se extienden hacia el OC y que se continúan caudalmente hasta un nivel infundibular medio.

Los núcleos hipotalámicos dorsal y ventral son monolaminados y forman las paredes del infundíbulo; el NIV es el más compacto de los dos. Este núcleo termina rostral al receso lateral del infundíbulo; en el mismo se encontraron dos tipos de células nerviosas: células neurosecretoras activas con citoplasmas y núcleos claros, fácilmente distinguibles de las células aminérgicas cercanas al epéndimo que envían protrusiones hacia la luz del ventrículo. El NID, al igual que el anterior contiene dos tipos de células y sería homólogo al núcleo arcuato de los mamíferos (van Oordt y col., 1972, 1974; Peute, 1973; Terlou y Ploemacher, 1973). Este núcleo envía fibras hacia la EM y ha sido involucrado en el control de la secreción de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) (Peute y Goos, 1970; Terlou y van Straaten, 1973).

Un pequeño conjunto de células fuertemente agrupadas, el NPvO del receso lateral del tercer ventrículo, aparece dorsomedialmente a la unión del NID y NIV. Este núcleo y su órgano ependimario se extienden en casi toda la longitud dorsal del borde del hipotálamo infundibular. El NPvO posee también dos tipos de células, unas de naturaleza aminérgica y otras que producen polipéptidos (Llinás y Precht, 1976); ambas envían protrusiones al ventrículo señalando una posible función quimiorreceptiva. Esta región correspondería al núcleo infundibular de mamíferos, aves y reptiles y se cree que participa en la regulación de la actividad gonadotrópica (Dierickx y col., 1972).

Por último el núcleo entopeduncular (NEP) puede también ser considerado parte del hipotálamo. Está formado por células dispersas que envuelven parcialmente al fascículo lateral del cerebro anterior (LFB) a nivel del OC. Sus conexiones sugieren una afinidad hipotalámica ya que recibe fibras del palio medial y proyecta al tegmentum (Neary y Northcutt, 1983); sin embargo, esto debería ser confirmado embriológicamente.

## 1.2. Función de los Neuropeptidos

### 1.2.1. Generalidades

En las últimas décadas se ha desarrollado un gran interés sobre el rol central de la comunicación intercelular en la homeostasis. Una comunicación efectiva requiere caminos dinámicos, que lleven mensajes informativos y precisos. Se ha demostrado que muchas clases de moléculas llevan estos mensajes, incluyendo nucleósidos, aminoácidos, aminas complejas, carbohidratos, esteroides y péptidos (Krieger, 1983). La importancia de pequeños péptidos en esta red de comunicación se ha extendido durante los últimos sesenta años a través de numerosos estudios fisiológicos y farmacológicos (Schally y col., 1978). Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos péptidos que expliquen las delicadas sutilezas de la comunicación intercelular.

En los últimos 15 años se ha hecho evidente que muchos otros péptidos, además de los factores liberadores e inhibidores, están presentes en el hipotálamo. Estos incluyen metionina- y leucina-encefalinas (ENK) (Hökfelt y col., 1977; Khachaturian y col., 1983), colecistoquinina (CCK) (Kiss y col., 1984), neurotensina (NT) (Kahn y col., 1980; Jennes y col., 1982), galanina (GAL) (Skofitsch y Jacobowitz, 1985; Melander y col., 1986a), angiotensina II (Fuxe y col., 1982; Lind y col., 1984), polipéptido intestinal vasoactivo/péptido histidina isoleucina (VIP/PHI) (Lorén y col., 1979; Card y col., 1981; Hökfelt y col., 1987a), bombesina (Panula y col., 1982), dinorfina (DYN) (Vincent y col., 1982; Fallon y Leslie, 1986), sustancia P (SP) (Ljungdahl y col., 1978) y neuropeptido tirosina (NPY) (Chronwale y col., 1985; de Quidt y Emson, 1986) entre otros.

Las técnicas de inmunohistoquímica han sido de crucial importancia para analizar la presencia de múltiples mensajeros en la misma célula. Desde que se desarrolló el concepto de que las células endócrinas pueden producir más de un mediador (Pearse, 1969; Owman y col., 1973), muchos ejemplos de co-localización de sustancias neuroactivas han sido descritos en el sistema nervioso (Jaim-Etchevery y Zieher, 1971, 1982; Hökfelt y col., 1980; Cuello, 1982; Chan-Palay y Palay, 1984; Hökfelt y col., 1984a; Hökfelt y col., 1986; Rushlow y col., 1995). La coexistencia de diferentes mensajeros dentro de la misma neurona es particularmente abundante en el hipotálamo, especialmente en las regiones que ejercen un control neuroendócrino (Brownstein y Mezey, 1986; Meister, 1989; Hökfelt y col., 1989; Eriksson y col., 1996). Se encontró que algunos de estos péptidos hipotalámicos de relevante importancia en una gran diversidad de funciones varían sus niveles de expresión frente a estímulos específicos. Discutiremos en detalle aquellos involucrados en este trabajo de tesis.

### 1.2.2. *Galanina*

La GAL, péptido con el extremo C-terminal  $\alpha$ -amidado, fue aislada en 1983 de la parte superior del intestino porcino y se encontró que tenía 29 aminoácidos (Tatemoto y col., 1983). El primer y último aminoácido eran glicina y alanina respectivamente y esta característica le dio nombre al péptido. Su secuencia ha sido conservada en los mamíferos ya que las estructuras de la GAL bovina y la de rata sólo difieren de la del cerdo en 4 y 3 aminoácidos respectivamente, en la región C-terminal de la molécula (Crawley y Wenk, 1989). También se ha determinado la estructura primaria de la GAL en la *Rana ridibunda*, la misma sólo difiere de la del cerdo en 2 aminoácidos también en la región C-terminal de la molécula (Chartrel y col., 1995). Está ampliamente distribuido en los sistemas nerviosos

central y periférico, el tracto gastrointestinal, el tracto urogenital y la médula adrenal de los mamíferos (Tatemoto y col., 1983; Rökaeus y col., 1984; Ekblad y col., 1985; Bauer y col., 1986a, b; Stjernquist y col., 1988; Pelto-Huikko, 1989) y no parece pertenecer a alguna de las familias polipeptídicas actualmente conocidas.

La distribución de neuronas inmunorreactivas a GAL (ir-GAL) en el cerebro de rata (Ch'ng y col., 1984; Rökaeus y col., 1984; Skofitsch y Jacobowitz, 1985; Melander y col., 1986a) y otros mamíferos (Beal y col., 1988; Gentlemann y col., 1989; Köhler y col., 1989; Michener y col., 1990; Walker y col., 1991) ha sido ampliamente descrita. En el telencéfalo se encontró inmunorreacción a GAL en cuerpos celulares de la banda diagonal y en cuerpos celulares y fibras del núcleo del septum medial (NMS). Se vieron también fibras positivas a la GAL en la formación hipocampal. Se halló una red de fibras y neuronas galaninérgicas en el núcleo del lecho de la estria terminalis y en el núcleo amigdalino. También se encontró una distribución particularmente densa de neuronas y fibras ir-GAL en el hipotálamo, con la mayor concentración de la misma en la EM. En el tronco encefálico se observó GAL en numerosas estructuras, entre ellas en la mayoría de las neuronas del locus coeruleus y en los núcleos del rafe. En la médula espinal, la GAL se encontró en neuronas de la sustancia gris intermedia, así como en interneuronas del asta posterior, y en fibras de la raíz dorsal (Zhang, 1994). Estas últimas tienen origen en neuronas sensitivas primarias pequeñas, que presentan una fuerte inmunotinción (Ju y col., 1987).

Por otra parte, se conoce menos sobre la distribución de sistemas neuronales con inmunorreacción a GAL en vertebrados no mamíferos. Solo algunos trabajos describen la distribución de GAL en el SNC de varios peces (Wurzinger y Skofitsch, 1989; Batten y col., 1990; Holmqvist y Ekström, 1991; Olivereau y Olivereau, 1991; Vallarino y col., 1991;

Yamamoto y col., 1992; Preston y col., 1995), y anfibios tales como *Rana temporaria* (Wolfbauer y Skofitsch, 1989), *R. esculenta* (Lázár y col., 1991), *Xenopus laevis* y urodelos (Lázár y col., 1991; Olivereau y Olivereau, 1992). Hasta el momento no existe una descripción completa de la distribución de inmunorreactividad a GAL en el SNC del sapo, excepto por un trabajo en el que se realiza una comparación entre *Bufo vulgaris* y otras tres especies de anfibios (*Ambystoma mexicanum*, *Pleurodeles waltlii* y *Xenopus laevis*) (Olivereau y Olivereau, 1992). En estas especies fueron observadas neuronas ir-GAL en el telencéfalo (núcleo estriado y amígdala); en el diencefalo (NPO, Sc, LH, NIV y NID y en el NPvO); y en el rombencéfalo (núcleo del tracto solitario). Las fibras galaninérgicas se extienden por regiones similares y por el septum medial, el telencéfalo ventral, el hipotálamo ventral (VH), la EM y varias regiones mesencefálicas y rombencefálicas.

La correlativa y amplia distribución de sitios de unión a GAL en el SNC, mostrada a través de ensayos de "binding" autorradiográficos (Skofitsch y col., 1986; Melander y Staines, 1986; Köhler y col., 1989; Arvidsson y col., 1991) sugiere que la misma está involucrada en una variedad de funciones cerebrales. De particular interés son los cambios observados en los niveles de GAL y de su ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en células que han sido sometidas a procesos de injuria en varios sistemas neuronales (Ch'ng y col., 1985; Hökfelt y col., 1987b; Villar y col., 1989a, 1990, 1991; Cortés y col., 1990a; Zhang, 1994; Zhang y col., 1994, 1995a, b; Barajon y col., 1996); los cuales sugieren que este péptido podría tener un rol en procesos reactivos de degeneración y/o regeneración. Por otro lado, la localización predominante en el hipotálamo tanto de ARNm codificante como de sitios receptores para GAL, indica que ella podría estar involucrada en funciones regulatorias neuroendócrinas. Esto está apoyado por el descubrimiento de la participación de la GAL en el control de la secreción de prolactina (PRL) y de la hormona de crecimiento

(GH) (Melander y col., 1987; Murakami y col., 1987; Sahu y col., 1987; Koshiyama y col., 1990) y en la regulación de la secreción de la hormona tiroestimulante (TSH), de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) y de la hormona luteinizante (Ottlecz y col., 1988; Hooi y col., 1990).

En resumen, la GAL parece ser un péptido con interrelaciones particulares y complejas con otras sustancias hormonales y neuroactivas. Probablemente afecte la regeneración y el crecimiento neuronal y la secreción de hormonas pituitarias, ya sea directamente o en combinación con otras sustancias y posiblemente también esté involucrada en otras funciones cerebrales superiores.

### *1.2.3. Colecistoquinina*

La hormona gastrointestinal CCK fue descubierta por su habilidad para estimular la secreción de jugo gástrico. Vanderhaeghen y colaboradores (1975) fueron los primeros en demostrar la presencia de CCK en el SNC de mamíferos. Un péptido similar a la CCK fue localizado en neuronas del hipotálamo del cerebro de anuros (Doerr-Schott y col., 1979). Se encontraron fibras inmunorreactivas a CCK (ir-CCK) cercanas al receso preóptico y también procesos celulares que surgen de grupos de células simétricas en el infundíbulo; estos se juntan en un tracto de fibras medial y atraviesan el piso del infundíbulo hacia la capa externa de la EM. Las fibras ir-CCK de la EM contienen gránulos neurosecretorios densos (Doerr-Schott y Garaud, 1981). El tectum óptico también muestra inmunotinción para CCK y la desaferentación de la retina contralateral provoca la desaparición de la inmunorreacción para CCK, confirmando un origen extrínseco de la misma (Kuljis y Karten, 1982, 1983). La concentración de CCK en el cerebro de la rana es de moderada a alta en



el hipotálamo (3-18,4 ng/mg de proteína) y baja en el cerebelo (0,6 ng/mg de proteína). La distribución es consistente con las cantidades de CCK medidas en los cerebros de rata (Schneider y col., 1979; Beinfeld y col., 1981), porcino y humano (Rehfeld, 1978). Estudios farmacológicos en los mamíferos apoyan el concepto de que la CCK es un importante neurotransmisor en el SNC (Rehfeld y col., 1979). Los efectos de la misma en el cerebro de los anfibios son totalmente desconocidos.

#### *1.2.4. Vasopresina*

Las neuronas magnocelulares del hipotálamo son las principales componentes del sistema hipotálamo-neurohipofisario. Estas neuronas sintetizan las hormonas vasopresina (VP) y oxitocina (OXY), las cuales son transportadas a lo largo de sus proyecciones axonales hasta los terminales ubicados en el lóbulo neural y son liberadas a la circulación sistémica para regular el balance hídrico y la contracción del músculo liso respectivamente. La VP es liberada en respuesta a estímulos que alteran la osmolaridad plasmática, tales como privación de agua o ingestión crónica de soluciones salinas. La VP y la OXY son sintetizadas por poblaciones celulares separadas dentro del núcleo supraóptico y paraventricular (Aspeslagh y col., 1976; Dierickx y Vandesande, 1977; Dierickx, 1980; Rhodes y col., 1981; Sofroniew, 1985; Hou-Yu y col., 1986; Mohr y col., 1988), mientras que las neuronas vasopresinérgicas se localizan principalmente en la parte ventral del núcleo supraóptico y en la parte central del núcleo paraventricular, las neuronas que contienen OXY se ubican en la parte dorsal del núcleo supraóptico y en la periferia del núcleo paraventricular. Se sabe que al igual que las neuronas de otros sistemas, las células magnocelulares son capaces de expresar múltiples agentes neuroactivos y tanto en las neuronas oxytocinérgicas como vasopresinérgicas ha sido demostrada la co-existencia

de un complemento único de moléculas biológicamente activas adicionales (Brownstein y Mezey, 1986; Meister y col., 1990b; Sawchenko y col., 1992). El significado funcional de este tipo de multipotencialidad en el sistema magnocelular no es del todo claro, existiendo escasa información sobre la regulación de esta co-localización de péptidos en el sistema (Deschepper y col., 1983; Kiss y Mezey, 1986; Sherman y col., 1986b; Young, 1986; Dohanics y col., 1990; Watts y Watts-Sánchez, 1995).

En términos fisiológicos, la regulación del balance del agua corporal representa uno de los procesos homeostáticos más simples; ya que un aumento en la osmolaridad del líquido extracelular (ejemplo de deshidratación celular) o una reducción en su volumen (ejemplo de deshidratación extracelular) desencadenan una serie bien definida de respuestas dirigidas primero a reducir el impacto de la deshidratación en los tejidos y luego, a llevar el volumen y la composición del fluido corporal nuevamente a sus valores normales. La naturaleza de estos eventos puede ser endócrina (involucra la secreción alterada de VP, aldosterona, angiotensina II, endotelina, y cada vez se agregan nuevos péptidos a esta lista), autonómica (regulación de la presión arterial) o comportamental (ingestión de agua, búsqueda de un ambiente acuático, etc.). La deshidratación extracelular puede desencadenarse por hemorragias, vómitos y transpiración o diarrea excesiva. Esta deshidratación extracelular (o hipovolemia) resulta de una pérdida de agua del compartimento extracelular y puede ser inducida experimentalmente mediante la privación de agua al animal. En forma diferente la deshidratación celular ocurre cuando un aumento en la osmolaridad del líquido extracelular lleva a la pérdida de agua del compartimento intracelular; lo cual puede ser inducido en los sapos mediante la inmersión de los mismos en una solución hiperosmótica. Si bien se definen estos fenómenos en forma separada, hay que tener en cuenta que la deshidratación no sólo activa a los

receptores de volumen ubicados en los grandes vasos y el corazón (Share, 1968; Gauer, 1978) debido a una disminución de la volemia, sino también a los osmorreceptores vía la inducción de la hiperosmolaridad. Así mismo, la activación de los osmorreceptores se produce durante una prolongada exposición a una solución salina, junto con la activación de receptores de sodio (Andersson, 1977; McKinley y col., 1978). Estos tres tipos de receptores participan en la regulación de la secreción de VP; por lo que ambos estímulos (deshidratación y sobrecarga salina) pueden llevar en definitiva a un mismo tipo de respuesta compensadora en cuanto a la participación de la VP; sin embargo dependiendo de la intensidad del estímulo se reclutarán una variedad de sistemas diferentes para compensar el desbalance provocado en la homeostasis hidroelectrolítica. El mecanismo exacto por el cual el disturbio osmolar influye sobre las neuronas vasopresinérgicas no está totalmente dilucidado, pero se sabe que la detección del cambio en la osmolaridad por parte de las neuronas magnocelulares vasopresinérgicas sólo explica parcialmente la subsecuente regulación (Leng y col., 1982; Sklar y Schrier, 1983; Sladek, 1983; Sladek y Armstrong, 1985). Por ello se presume que otros neurotransmisores y péptidos pueden estar involucrados en la regulación (Sklar y Schrier, 1983; Sladek, 1983; Sladek y Armstrong, 1985).

En la década del 50 se dilucidaron las estructuras de las hormonas neurohipofisarias arginina-VP y OXY de los mamíferos. Una década más tarde se aislaron y caracterizaron sus homólogas respectivas de anfibios, arginina-vasotocina (VT) y mesotocina (MT) de la hipófisis de *Rana esculenta* (Acher y col., 1960, 1964). Los precursores de VT y MT son estructuralmente similares a los precursores correspondientes en mamíferos. Las células inmunorreactivas para VP (ir-VP) son abundantes en el núcleo magnocelular del *Bufo japonicus* (Jokura y Urano, 1985) y de la *Rana catesbeiana* (Carr y

Norris, 1990). En los anfibios, las neuronas vasopresinérgicas proyectan a varias áreas extrahipotalámicas, incluyendo el tálamo, el palio, el tectum óptico y el tronco encefálico (Zoeller y Moore, 1986). Los axones que se originan de neuronas vasopresinérgicas también se proyectan a la EM, localizándose en la vecindad de los capilares portales. La presencia de altas concentraciones de VP en el sistema hipotálamo-hipofisario de anfibios ha sido confirmada por radioinmunoanálisis (RIA) (Zoeller y Moore, 1986). En la salamandra se encontraron cantidades significativas de VP en áreas extrahipotalámicas, incluyendo el palio, la amígdala, el estriado, el núcleo talámico tectal y el tronco encefálico (Zoeller y Moore, 1986).

En la rana, la deshidratación por falta de agua o por inmersión en soluciones hiperosmóticas induce una elevación en los niveles de VP plasmáticos (Bentley, 1969; Rosenbloom y Fisher, 1974; Nouwen y Kühn, 1983). Una reducción del volumen sanguíneo por shock hemorrágico también aumenta la secreción de VP (Bentley, 1969). La VP causa retención de agua porque: 1) estimula la captación de agua a través de la piel (Brown y Brown, 1982; Cree, 1988), 2) aumenta la reabsorción de agua por el túbulo renal (Sawyer y Pang, 1975) y 3) disminuye la velocidad de filtración glomerular (Cree, 1988). En anfibios, la hipótesis de que la VP produce antidiuresis debido en parte a una acción vasoconstrictora en el glomérulo, está apoyada por el hecho de que existen sitios de unión específicos para VP en el riñón. Los efectos de la VP en la retención de agua están también mediados por una acción indirecta en el sistema hipófiso-adrenal. En la *Rana ridibunda*, la VP estimula *in vitro* la secreción de ACTH en células de la pars distalis de la hipófisis (Tonon y col., 1986); sugiriendo que la VP, así como está documentado en los mamíferos (Gillies y Lowry, 1979), ejerce un rol fisiológico en la regulación de las células corticotropas de la hipófisis en los anfibios. En la trucha, las inyecciones cerebrales

intraventriculares de dosis nanomolares de VP causan un aumento de la presión arterial, en forma dosis-dependiente, sin afectar el ritmo cardíaco (Le Mevel y col., 1991). El hecho de que la administración intra-aórtica de las mismas dosis de VP inducen sólo un pequeño efecto nos indica que la VP ejerce una actividad presora potente a través de la acción directa sobre el cerebro en este animal (Le Mevel y col., 1991). En salamandras privadas de agua, la deshidratación disminuye los niveles de la VP en el Mgv, pero no modifica la concentración de VP en el Mgd, OC, NPvO o en el FCS (Zoeller y Moore, 1988); esto sugiere que las neuronas magnocelulares ventrales juegan un rol importante en el control del balance de agua.

#### *1.2.5. Sintetasa de óxido nítrico*

El óxido nítrico (NO) se considera una mensajero que se opone en sus efectos al sistema renina-angiotensina-aldosterona (Marletta y col., 1988). El NO es una parahormona que se sintetiza en el endotelio a partir de arginina a través de una progresiva oxidación mediante la actividad de la enzima sintetasa de NO (NOS) (Moncada y col., 1991) y que induce la relajación de la capa de músculo liso de los vasos sanguíneos, gracias al aumento de guanosin monofosfato cíclico (GMPc), al igual que el péptido atrial natriurético (ANP). En el endotelio, la secreción del NO está estimulada por hipertensión y por otras hormonas, y su acción vasodilatadora facilitaría la reducción de la presión arterial. Además, presenta efectos sobre la coagulación ya que puede disminuir la adhesión y agregación plaquetaria. Por otro lado, su presencia en los macrófagos está relacionada con un importante mecanismo citotóxico, en el que la síntesis de NO inducida por citoquinas, actúa como una primera línea de defensa contra las células tumorales, los microorganismos

intracelulares y otros patógenos demasiado grandes para ser fagocitados (como elementos fúngicos y parásitos helmintos) (Hibbs, 1991).

Tanto en humanos como en roedores, se forman cantidades relativamente grandes de NO en el SNC (Knowles y col., 1989), especialmente en el cerebelo. La NOS parece estar presente en grupos neuronales específicos: en el bulbo olfatorio y el tubérculo olfatorio, la corteza, el estriado, el tronco encefálico, la médula espinal y en los ganglios de la raíz dorsal (Bredt y col., 1990; Bredt y Snyder, 1992; Springall y col., 1992). Su distribución no concuerda con la de algún otro neurotransmisor conocido (Bredt y Snyder, 1992) y al NO se le atribuyen funciones tales como transmisor y modulador de la actividad nerviosa (Dawson y col., 1992). La NOS puede ser revelada histoquímicamente por su actividad oxidativa del fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (NADPH) o actividad NADPH-diaforasa. Summy-Long y col. (1984) fueron los primeros en demostrar esta actividad en neuronas magnocelulares hipotalámicas y en el lóbulo neural. Más tarde Sagar y Ferriero (1987) mostraron que la actividad de NADPH-diaforasa aumentaba en respuesta a la deshidratación provocada por sobrecarga salina.

La localización de NOS en anfibios es poco conocida. Hay un trabajo que analiza la distribución de la actividad NADPH-diaforasa en la médula espinal de *Xenopus laevis*, en ejemplares adultos y durante la metamorfosis (Crowe y col., 1995); pero sólo existe un estudio sobre la distribución de esta enzima en el cerebro del sapo *Bufo arenarum* que utiliza técnicas de enzima- e inmuno-histoquímica (Suburo y col., 1996). El mismo muestra una abundante presencia de la proteína en el bulbo olfatorio accesorio, palio lateral, estriado, tálamo, tectum óptico y en la médula espinal dorsal. Sin embargo estructuras nitrérgicas más débiles y en menor cantidad pueden ser demostradas en todos los niveles

del SNC de este anfibio. Hasta el momento no existen estudios fisiológicos ni farmacológicos sobre los efectos del NO en el cerebro de los anfibios.

#### 1.2.6. Tirosina hidroxilasa

La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima limitante en el camino biosintético de las catecolaminas (Levitt y col., 1965). Por lo tanto esta enzima es un importante centro de control hormonal en las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares. La TH puede ser regulada por modificación covalente por fosforilación/defosforilación (activación/inactivación) de la enzima existente o por alteración de la síntesis o degradación de la proteína enzimática (Masserano y Weiner, 1983; Zigmond y col., 1989). La TH presenta una distribución muy amplia en todo el SNC de los mamíferos. Las alteraciones en los niveles de TH pueden indicar cambios a largo plazo en la función neuronal dopaminérgica. Existe un número bajo de neuronas magnocelulares que contienen TH en los núcleos supraóptico y paraventricular de la rata (Swanson y col, 1981; Chan-Palay y col., 1984; Hökfelt y col., 1984b; Van den Pol y col., 1984), el cual es aumentado por la administración de una solución de NaCl al 2% como única fuente de líquido (Kiss y Mezey 1986; Young y col., 1987b; Meister y col., 1990a).

La distribución de la TH se estudió por medio de técnicas de inmunohistoquímica en el cerebro de *Xenopus laevis*. Se encontraron cuerpos celulares inmunorreactivos para TH en el bulbo olfatorio, el NPO, el Sc, el NPvO, el TP, el núcleo talámico posterior, el tracto solitario y en la capa ependimaria a lo largo del canal central del rombencéfalo y la médula espinal (González y col., 1993).

### 1.2.7. Péptido ligado al gen de calcitonina

El péptido ligado al gen de calcitonina (CGRP) es un péptido de 37 aminoácidos, producto de la expresión predominante del gen de calcitonina en el tejido nervioso (Amara y col., 1982; Rosenfeld y col., 1983). Se ha investigado la distribución de neuronas y fibras conteniendo CGRP en el cerebro de *Rana temporaria* (Wolfbauer y Skofitsch, 1989) y en el sistema hipotálamo-hipofisario de *Rana esculenta* (Mulatero y Fasolo, 1991). El telencéfalo de *Rana temporaria* contiene cuerpos celulares inmunorreactivos para CGRP en el núcleo de la banda diagonal de Broca (NDB). En el hipotálamo se encontraron células positivas para CGRP en el núcleo magnocelular, donde la mayoría de las neuronas positivas parecen ser del tipo que contacta con el FCS. Células inmunorreactivas para CGRP (ir-CGRP) también son abundantes en el infundíbulo dorsal de *Rana temporaria* y en el infundíbulo ventral de *Rana esculenta*. El tálamo anteroventral y el tegmentum anteroventral mesencefálico de *Rana temporaria* contienen células ir-CGRP (Wolfbauer y Skofitsch, 1989). Hay fibras ir-CGRP que cruzan a través del hipotálamo hacia la capa externa de la EM, pero no se encontraron fibras inmunoteñidas en el lóbulo neural de la hipófisis. En el asta dorsal de *Rana esculenta*, la inmunorreacción para CGRP y SP se encuentra dentro de las mismas fibras aferentes (Venesio y col., 1987), sugiriendo que ambos péptidos pueden actuar de una forma coordinada en la neurotransmisión sensitiva. También se encontró CGRP en los ganglios simpáticos de la rana toro. La presencia de fibras postganglionares simultáneamente positivas para CGRP y SP, indica que algunas fibras sensitivas se proyectan a través de la cadena ganglionar simpática hacia la periferia (Horn y Stofer, 1989). Todos estos datos sugieren que en los anfibios el CGRP podría actuar como un neurotransmisor sensitivo.



### 1.3. La Plasticidad Neural

Las neuronas magnocelulares hipotalámicas, sustrato de intensos fenómenos neuroendócrinos, se prestan adecuadamente a la observación y estudio, así como a la investigación a través de diversas manipulaciones experimentales. La hipofisectomía, la deshidratación y los cambios de temperatura son estímulos capaces de generar variaciones claras (netas) y fácilmente detectables del contenido neuroquímico de estas células. Esas características hacen del sistema hipotálamo-hipofisario un modelo favorable para el estudio de los fenómenos de plasticidad neuronal. El tejido nervioso presenta numerosas características que le confieren un "status" particular; la primer singularidad del sistema nervioso corresponde a la morfología de las neuronas, células polarizadas de formas variadas, que se encadenan en redes neuronales que permiten la transmisión del mensaje nervioso. En segundo lugar estas células son capaces de soportar numerosas modificaciones y remodelaciones incesantes de sus prolongaciones y conexiones, en las que el concepto de plasticidad fenotípico da cuenta de la variabilidad de las neuronas a lo largo de su existencia.

La plasticidad determina la capacidad de un organismo para modificar su funcionamiento en respuesta a los estímulos provenientes del entorno externo e interno (Hall, 1992). La plasticidad neuronal y las recomposiciones que ella engendra son particularmente evidentes a lo largo de la ontogénesis, durante la cual las neuronas migran, se diferencian, establecen conexiones múltiples y se organizan en circuitos complejos. Pero esos fenómenos pueden a menudo continuarse durante la vida adulta como lo atestigua la regeneración axonal después de una lesión bien estudiada en el sistema hipotálamo-hipofisario (Stutinsky, 1957; Adams y col., 1969; Dellmann y Carithers,

1992). Más allá de las circunstancias experimentales o patológicas, las neuronas son susceptibles de adaptarse a diversas condiciones fisiológicas y algunas de las modificaciones que ellas soportan, constituyen entonces un buen ejemplo de plasticidad estructural. Así, durante la lactancia, las neuronas oxitocinérgicas del hipotálamo anterior presentan anchas fijaciones membranosas que supuestamente facilitan una respuesta sincrónica de esas neuronas a los estímulos de la succión (Theodosis y Poulain, 1993). Las sinapsis múltiples, terminaciones nerviosas que contactan muchos elementos post-sinápticos, se vuelven igualmente numerosas durante la lactancia. Otro hallazgo inusual e inesperado es el hecho de que luego de la destrucción o daño parcial, por lo menos algunas neuronas neurosecretoras son capaces de regenerar toda o parte de la porción perdida y de mantener y restaurar su función; lo que además señala el carácter especial de estas neuronas (Stutinsky, 1957; Christ, 1962, 1966; Sterba y Brückner, 1967; Adams y col., 1969; Dellmann y Carithers, 1992; Villar y col., 1994b).

La organización estructural general, la degeneración y regeneración de las neuronas secretoras, así como el proceso de neurosecreción parecen ser básicamente idénticos en todo el reino animal. En una primer fase, luego de la interrupción del axón neurosecretor, los procesos distal y proximal reaccionan en forma casi idéntica desarrollando un denso sistema de formaciones tubulares proveniente del sistema del retículo endoplásmico liso. Al mismo tiempo hay un aumento de las demás organelas axoplásmicas en los extremos provenientes de porciones más distales o proximales del axón (vesículas con gránulos, mitocondrias, etc.) u originadas en el lugar (estructuras tipo lisosomas) (Dellmann y Rodríguez, 1970a, b, c). Estos cambios son habitualmente considerados como preparatorios para la regeneración (Christ, 1962, 1966). Además, en el soma neuronal se incrementa la actividad secretora y las organelas asociadas con ella

(Hild, 1951; Stutinsky, 1952, 1957; Billenstien y Lévèque, 1955; Etkin, 1962; Dellmann y Dale, 1966; Sathyanesan, 1966, 1969; Dellmann y Owsley, 1969; Budtz, 1970). En una segunda fase, los conos de crecimiento axonal conteniendo las numerosas formaciones tubulares y vesículas ya nombradas, comienzan a formar pequeñas gemaciones a partir del proceso proximal del axón como un inicio de la regeneración (Drager, 1950; Beck y Daniel, 1961; Sterba y Brückner, 1967; Adams y col., 1968, 1969; Kieman, 1970). Concurrentemente, existe evidencia de una actividad secretora aumentada en el cuerpo celular, donde las vesículas o los gránulos continúan aumentando en número en la porción terminal dilatada del axón, próxima al cono de crecimiento (Dellmann y Owsley, 1969). En la porción distal, mientras tanto, tiene lugar el proceso de degeneración axonal, aumentando las vacuolas autofágicas y los cuerpos laminares densos. La tercer fase, en la porción proximal, lleva a un establecimiento progresivo de los nuevos terminales del axón (Stutinsky, 1953, 1957; Diepen, 1962; Kawashima y col., 1966; Sloper, 1966; Sloper y col., 1967); y en la porción distal continúan los eventos autofágicos degenerativos. Durante este periodo, la actividad secretora del soma regresa lentamente a los valores normales (Billenstien y Lévèque, 1955; Murakami y col., 1968).

La plasticidad neuronal no se limita solamente a las recomposiciones de la organización anatómica de las neuronas, sino que afecta también a su contenido neuroquímico. La transmisión de información es la primera función de las neuronas y sus mensajeros químicos, los neurotransmisores, representan el soporte de la información transmitida por esas células. Ese "lenguaje" neuronal no es uniforme sino que varía de una célula a otra, dentro de una misma célula, y en función de las condiciones impuestas por el entorno. Un ejemplo histórico de plasticidad neuroquímica es la adquisición del fenotipo colinérgico o noradrenérgico de las neuronas originadas en la cresta neural en función de

su entorno (Patterson y Chun, 1974; Le Douarin, 1980; Landis y Patterson, 1981; Holgert y col., 1995).

Por otro lado en las neuronas magnocelulares de la rata la GAL co-localiza con VP y OXY, y se ha descrito un aumento en la expresión de estos péptidos, así como una variación en los niveles de DYN, ENK, VIP/PHI, hormona liberadora de corticotrofina (CRH), NPY, NOS, TH, CCK y proteínas de unión a guanosin trifosfato (proteínas G) en situaciones de hiperosmolaridad y diabetes insípida (Sherman y col., 1986a, 1988; Young, 1986; Van Tol y col., 1987; Young y col., 1987a, b, 1990; Rökæus y col., 1988b; Hooi y col., 1989; Larsen y col., 1992a, b; Watts, 1992; Villar y col., 1994a). Se han observado también otras variaciones durante un estímulo hiperosmótico, que incluyen el aumento del tamaño celular (Kalimo, 1975) y la disminución de los contactos entre las células gliales (Hatton y col., 1984) en esta región magnocelular hipotalámica. Además se sabe que muchas especies de animales exhiben cambios neuroquímicos, anatómicos y comportamentales seleccionados para optimizar la reproducción y la supervivencia en respuesta a alteraciones ambientales en cuanto al clima y a la disponibilidad de alimentos. Cambios endócrinos anuales en especies que migran o que hibernan están particularmente bien caracterizados debido a los extremos comportamientos que los cambios estacionales provocan en estas especies. Así, se ha detectado un aparente ritmo estacional en el contenido hipotalámico de CRH, de la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), de NT, y de neuromedina N en ratas; datos que indican que existiría un mecanismo que permite el aumento o la disminución de la disponibilidad fisiológica de estos neuropéptidos regulatorios en diferentes épocas del año (Bissette y col., 1995). La GAL, así como otros péptidos hipotalámicos, está relacionada con la termogénesis, la ingesta y otros efectos

metabólicos en la rata (Kyrkouli y col., 1986, 1990a, b; Bauer y col., 1989; Crawley y col., 1990, 1993).

En términos evolutivos, el gran número de diferentes neuropéptidos y su co-localización dentro de ciertas neuronas, probablemente represente una forma de generar diversidad interna por medio de procesos combinatorios. Las neuronas que producen neuropéptidos aparecen tardíamente durante el desarrollo, luego de que los mayores eventos morfológicos han ocurrido, sugiriendo que los neuropéptidos pueden producir un marco extremadamente plástico para la selección natural. En forma similar, las funciones neuroendócrinas e inmunológicas ejercidas por los neuropéptidos constituyen un enlace fundamental con otros sistemas homeostáticos que permiten la adaptación a cambios ambientales.

A partir de los años 70, el desarrollo de técnicas neurocitoquímicas ha permitido caracterizar las neuronas no solamente según criterios morfológicos sino también según sus particularidades funcionales. Sin embargo es con el advenimiento de la inmunohistoquímica (Falck, 1962) que han aparecido mapeos de neuronas realizados a partir de los mediadores químicos que ellos contienen y utilizan a nivel de sus terminaciones. Esta última técnica se ha revelado altamente poderosa e irremplazable para la localización de los neuropéptidos en el SNC y como señaláramos anteriormente en la demostración de que un neurotransmisor clásico co-existe generalmente con uno o muchos neuropéptidos dentro de una misma célula (Hökfelt y col., 1986). La plasticidad fenotípica descansa entonces sobre la naturaleza y la combinación de esa mezcla, susceptible de evolucionar en función de las condiciones fisiológicas y experimentales (Young y col., 1987b; Bondy y col., 1989b; Meister y col., 1990b). La puesta en evidencia de relaciones

funcionales por medio de inmunohistoquímica, nos permite por otro lado, aproximarnos a comprender el rol de los diferentes neurotransmisores en estudio, en la regulación de la plasticidad neuroquímica.

Nuestro interés en la regulación de la expresión peptidérgica en las neuronas magnocelulares hipotálamicas, y nuestro deseo de encontrar posibles interacciones entre dichos péptidos dentro de estas células, nos llevaron a investigar como se comportan ante perturbaciones patológicas y fisiológicas bien caracterizadas. Esto nos ayudará a ubicar el significado de la localización de péptidos en el hipotálamo en un contexto más fisiológico y a determinar si la regulación de los niveles de neuropéptidos en el hipotálamo del sapo responde en forma estímulo-específica.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de tesis consiste en determinar los posibles roles de mensajeros en neuronas magnocelulares y del área preóptica mediante modelos fisiológicos y patofisiológicos. Básicamente se estudió la variación de la expresión de varios péptidos y enzimas en las diferentes situaciones experimentales, determinando los mecanismos celulares que a nivel hipotalámico median los procesos de injuria celular (hipofisectomías), de deshidratación y de hibernación. Para esto se ha elegido como modelo experimental al sapo, pues en esta especie el hipotálamo basal es especialmente accesible, permitiendo varias maniobras quirúrgicas que no son factibles en la rata. Por otro lado, dada su condición de animal hibernante ofrece un buen modelo fisiológico para el estudio de la termorregulación. Además estos animales controlan la pérdida de agua a través de la piel lo cual provee al investigador con las herramientas apropiadas para estudiar la regulación de la deshidratación y la hiperosmolaridad.

**2.1.** Debido a todo esto nos pareció interesante analizar la presencia de GAL en el cerebro del sapo *Bufo arenarum*, animal que ha sido frecuentemente utilizado en estudios de plasticidad neural debido a la fácil accesibilidad a sus sistemas neuronales y a la alta tasa de sobrevivencia que presenta. Estudiamos específicamente las respuestas del péptido a las injurias producidas experimentalmente.

2.1.1.- El objetivo principal de esta parte del trabajo fue investigar la distribución del péptido GAL en el cerebro del sapo mediante técnicas de inmunocitoquímica.

2.1.2.- Por otra parte se estudió el efecto que injurias específicas al sistema hipotálamo-hipofisario (hipofisectomías) producían sobre la expresión de la GAL en neuronas magnocelulares hipotalámicas y otros sistemas neuronales del SNC.



2.1.3.- Además se determinó en base a experimentos con el uso de trasplantes de hipófisis, cuáles de los efectos observados obedecían a una causa endócrina y cuáles eran consecuencia directa de la lesión de su área de proyección.

2.1.4.- Mediante experimentos de sustitución hormonal se trató de completar la información sobre una posible regulación endócrina (GH dependiente) sobre la GAL en el hipotálamo del sapo.

2.1.5.- Por último se trató de dilucidar mediante técnicas de transporte axonal retrógrado, cuáles son las proyecciones neurales de las áreas en estudio.

2.2. En forma colateral se continuó con el estudio de la regulación de la GAL y otras moléculas neuroactivas como VP, CCK, TH, CGRP Y NOS en los procesos involucrados en la homeostasis hidromineral.

2.3. En último término y debido a diferencias estacionales observadas en la expresión de estos péptidos hipotalámicos durante el transcurso de los experimentos anteriores se diseñó un protocolo para determinar los efectos de la temperatura sobre la inmunomarcación de los mismos.

### **3. MATERIALES Y METODOS**

Se utilizó como modelo el cerebro del sapo *Bufo arenarum*. Los animales fueron recibidos y colocados inmediatamente en un ambiente natural con libre acceso a agua y comida, durante una semana antes de realizar los experimentos o fueron mantenidos en frascos individuales, en condiciones estables de temperatura y humedad. En todos los casos los animales fueron anestesiados por inmersión en una solución con metanosulfonato del etil-éster del ácido m-aminobenzoico al 2% (conocido también como sulfonato metano tricáinico) (MS 222, Sandoz Ltd., Suiza).

### **3.1. Experimentos Fisiológicos**

#### *3.1.1. Procedimiento quirúrgico de hipofisectomía, uso de trasplantes y sustitución hormonal*

Los animales (aproximadamente 100 sapos machos adultos que pesaban entre 150-200 gr) fueron sometidos a alguno de los siguientes procedimientos experimentales:

- 1- extirpación completa de la hipófisis (HPX) (n=18).
- 2- extirpación completa de la hipófisis, la cual es transplantada a la superficie del músculo semimembranoso, en el muslo, en una zona muy irrigada (HPX+TRANSP) (n=18).
- 3- extirpación de la pars distalis (PDX) (n=18).
- 4- extirpación de la pars distalis, que luego es transplantada (PDX+TRANSP) al igual que el grupo 2 (n=18).
- 5- extirpación de la pars distalis y terapia sustitutiva con GH (PDX+GH) (n=4).

6- extirpación de la pars distalis y terapia sustitutiva con solución salina (PDX+SL) (n=4).

7- animales en los cuales se simula la hipofisectomía sin extraerles la hipófisis (CONTROL) (n=4).

Luego de ser anestesiado con MS 222, el animal es colocado en decúbito dorsal, bajo lupa. La boca se mantiene abierta con un separador, se corta la mucosa bucal que recubre el paladar duro, se divulsionan los músculos retractores del bulbo y elevadores del ángulo escapular, y se desplazan con mucho cuidado las arterias carótidas internas hacia los laterales izquierdo y derecho respectivamente. Utilizando un tomo se seccionan: el hueso paraesfenoides por delante, los pterigoides en forma lateral y la unión del paraesfenoides con el atlas por detrás, de manera que al retirar el hueso seccionado queda una ventana de acceso a la hipófisis. Luego:

1.- la misma es retirada en su totalidad (separada de la EM) con pinzas de disección, cuidando de no provocar una hemorragia intensa (grupos experimentales HPX y HPX+TRANSP), o

2.- la pars distalis es cuidadosamente separada del lóbulo neurointermedio (grupos experimentales PDX, PDX+TRANSP, PDX+GH, PDX+SL) (Fig. 1) o

3.- no se realiza ninguna maniobra (CONTROL).

La hipófisis o la pars distalis fueron descartadas (HPX y PDX) o autotransplantadas (HPX+TRANSP y PDX+TRANSP) de acuerdo al tipo de operación a realizar. La ventana es sellada con parafilm y se permite que los animales se recuperen de la anestesia por 1 a 2

hs antes de reubicarlos en frascos de plástico en condiciones de temperatura y humedad constantes. En esas condiciones se los mantiene durante 2, 3, 7 y 14 días.

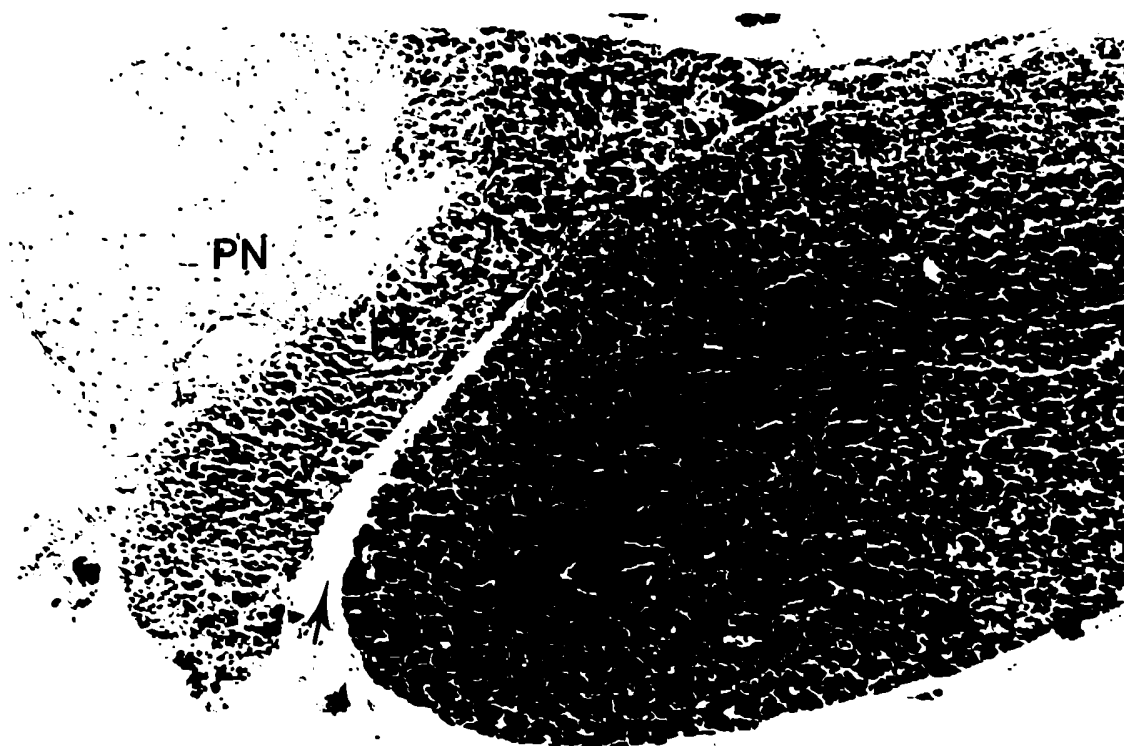


Figura 1. Microfotografía de una hipófisis de sapo, teñida con hematoxilina-eosina. Se puede observar que la pars distalis (Pds) se desprende con mucha facilidad del lóbulo neurointermedio [lóbulo neural o pars nervosa (PN) + lóbulo intermedio o pars intermedia (PI)], sin la necesidad de realizar maniobras complicadas. Colocando una pinza fina en la unión de la pars distalis y la pars intermedia (flecha) se puede separar la primera sólo con un leve movimiento.

A los grupos de animales a los cuales se les transplantó la propia hipófisis (HPX+TRANSP) o la pars distalis (PDX+TRANSP) al muslo, en una zona muy irrigada cercana a la arteria femoral (en el músculo semimembranoso), se le realizaron otros

transplantes de hipófisis o pars distalis homólogas cada 48 hs durante el transcurso de los 3 ó 7 días que se los dejó sobrevivir, de manera tal de asegurar de esta forma una dosis suficiente de hormonas hipofisarias circulantes en los animales durante el transcurso del experimento (Houssay y Giusti, 1929). Cuatro animales PDX fueron tratados con GH bovina (PDX+GH) (NIH-USDA-bGH-B-1 1,9 IU/mg) 200 µg (Walker Farmer y col., 1977) o solución salina (PDX+SL) en inyecciones diarias en el saco linfático dorsal durante siete días luego de la extirpación de la pars distalis.

Luego de 2, 3, 7 y 14 días, los 7 grupos de animales: HPX, HPX+TRANSP, PDX, PDX+TRANSP, PDX+GH, PDX+SL y CONTROL fueron anestesiados y luego perfundidos por corazón, primero con 50 ml de solución fisiológica (0,6% NaCl a 4° C) y luego con 300 ml también a 4° C de una solución fijadora mezcla de paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 2% en buffer fosfato de sodio (PBS) a pH 6,9 (Zamboni y De Martino, 1967). El cerebro y la médula fueron extraídos con mucho cuidado.

### *3.1.2. Situaciones de desequilibrio en el balance hidromineral*

En estos experimentos se utilizaron 80 sapos machos adultos (100-150 gr). Los animales fueron mantenidos en frascos en forma individual, en una de las siguientes cuatro condiciones:

- 1- fueron mantenidos en una solución de NaCl al 1% (700 ml) por 24 hs, seguida de una solución de NaCl al 2% (700 ml) por 48 hs (animales con sobrecarga salina=SL).
- 2- fueron privados de agua por tres días (deshidratados=D).

3- fueron mantenidos en agua (700 ml) por tres días (animales con sobrecarga de volumen=VL).

4- fueron mantenidos en un ambiente natural con libre acceso al agua por tres días (control).

Luego de tres días, los animales experimentales y los controles fueron anestesiados y perfundidos como ya se mencionó, por corazón, primero con 50 ml de solución fisiológica (0,6% NaCl a 4° C) y luego con 300 ml de una solución fijadora mezcla de paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 2% en PBS a 4° C. Al igual que en los experimentos anteriores, el cerebro y la médula fueron extraídos con mucho cuidado.

### *3.1.3. Hibernación simulada en los sapos*

En este experimento se examinaron los efectos de la hibernación sobre la inmunorreactividad a la GAL en el NPO y a la NOS en el área magnocelular en 18 sapos capturados durante la primavera; los mismos fueron divididos en 2 grupos: 9 animales hibernantes y 9 animales control. El grupo control fue mantenido en condiciones naturales con disponibilidad de comida y agua en un ambiente especialmente diseñado para imitar las condiciones silvestres a las que están habituados estos animales; el mismo consiste en una construcción de 4 metros cuadrados rellena con tierra, en la que se permitió el crecimiento de pasto y plantas. El lugar contaba con una pileta de material que cumplía las funciones de estanque y a la cual los animales tenían libre acceso. Para asegurar la provisión de insectos como fuente de alimento se dispuso de una lámpara de exterior que se mantenía encendida durante las horas de la noche; así este grupo experimental permaneció en condiciones de cautiverio a temperatura ambiente y con intervalos naturales

de luz-oscuridad correspondientes a las estaciones de primavera y verano. La hibernación fue inducida artificialmente manteniendo los animales a 6-10° C en oscuridad constante por dos semanas; el cambio térmico corresponde a la temperatura a la cual los sapos comienzan a hibernar en condiciones naturales. Durante la hibernación los sapos no fueron alimentados.

Luego de dos semanas, ambos grupos de animales fueron anestesiados y luego perfundidos por corazón, primero con solución fisiológica y luego con una solución fijadora como en los experimentos anteriores. Nuevamente el cerebro y la médula de cada animal fueron extraídos con sumo cuidado.

### **3.2. Técnicas de Inmunocitoquímica**

#### ***3.2.1. Método de Avidina/Biotina (ABC Kit-Vector Laboratories)***

Se perfunde al animal con una solución de paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 2% en PBS, se extrae el cerebro con su médula espinal y se dejan 24 hs de sobrefijación, luego se lavan en sucrosa al 10% en buffer PBS durante 48 hs. Se hacen cortes frontales y sagitales seriados, por congelación, de un espesor de 20 µm en un crióstato (Microm Zeiss, Alemania) que se montan en portaobjetos previamente gelatinizados. Luego se dejan secar por 2 hs y se lavan en buffer PBS 0,01 M. Se incubaron con el primer anticuerpo en cámara húmeda durante 24 hs a 4° C. Se utilizaron: anticuerpos contra el péptido GAL (generados en conejo y pertenecientes a la firma Peninsula Labs. Inc., Belmont) en una dilución 1:2000, anticuerpos contra el péptido VP



(generados en conejo y pertenecientes a la firma Peninsula Labs. Inc., Belmont) en una dilución 1:3000, anticuerpos contra el péptido CCK (generados en conejo y pertenecientes a la firma Peninsula Labs. Inc., Belmont) en una dilución 1:1000 y CCK (generados en ratón, 2D4 y 28,2; Hökfelt y col., 1988) en una dilución 1:2000, anticuerpos contra la enzima TH (generados en conejo y pertenecientes a la firma Incstar Stillwater, Minnesota USA) en una dilución 1:2000, anticuerpos contra la enzima NOS (generados en conejo y pertenecientes a la firma Wellcome Research Labs., Kent) en una dilución 1:2000 y anticuerpos contra el péptido CGRP (generados en conejo y pertenecientes a la firma Peninsula Labs. Inc., Belmont) en una dilución 1:1000. Luego los cortes se lavaron y se incubaron con el segundo anticuerpo biotinilado (Vector Labs. Inc., Burlingame) durante 30 minutos, en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Después se lavaron con solución buffer PBS 0,01 M y se incubaron con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa durante 1 h (Hsu y col., 1981), también en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Por último, se realizó el revelado con 3,3' diamino bencidina y peróxido de hidrógeno en buffer Tris-HCl 0,1 M a pH 7. Finalmente los cortes se lavaron en buffer PBS, se deshidrataron y se cubrieron con Permunt y cubreobjetos. Los preparados fueron observados con un microscopio Zeiss Universal y se obtuvieron fotografías usando película AGFA, APX 25 (Kodak, USA).

### *3.2.2. Método de Avidina/Biotina con amplificación con níquel (ABC Kit-Vector Laboratories)*

En el procesamiento se repiten los pasos del método anterior con la diferencia que en el revelado se realiza una amplificación de la reacción, agregando a la solución reveladora glucosa, glucosa oxidasa y sulfato de amonio-níquel (Shu y col., 1988).

### *3.2.3. Método de fluorescencia*

Se repiten los primeros pasos del método anterior hasta la incubación con el segundo anticuerpo; en este caso la incubación fue realizada con un segundo anticuerpo ligado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Boehringer, Mannheim, Stockolm), en una dilución 1:80 durante 30 minutos a 37° C. Luego las secciones se lavaron en buffer y se cubrieron con una mezcla de PBS y glicerol (1:3), que contiene para-fenilendiamina para disminuir la velocidad de pérdida de la fluorescencia (Johnson y De C. Nogueira Araujo, 1981; Platt y Michael, 1983) y con cubreobjetos. Los cortes se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot FXA. Las fotografías de fluorescencia se realizaron utilizando película Kodak Tri X (Kodak Polaroid, USA). En algunos casos también se utilizó el sistema de imágenes confocales de rayo láser con un equipo Bio Rad MRC 600 equipado con un láser combinado de krypton/argón y un microscopio Nikon Optiflot II. Se utilizó un filtro standard BHS de canal único con un fondo de excitación (488 DF para FITC) para la detección de inmunofluorescencia. Las imágenes elegidas fueron impresas utilizando una impresora Sony UP-5200 MD.

### **3.3. Técnica de Hematoxilina-Eosina**

A los animales perfundidos correspondientes al grupo experimental HPX+TRANSP y PDX+TRANSP del experimento de hipofisectomía también se les extrajo el trasplante de hipófisis o adenohipófisis pegado al músculo semimembranoso y se lo sumergió en una solución de formol al 4% en agua destilada durante varios días. Se deshidrató en alcoholes de concentración creciente durante 12 hs cada uno. Luego se pasó por mezclas de alcohol

100/xilol de distintas concentraciones (3/1, 1/1, 1/3) durante 20 min en cada caso y luego se pasó por distintas mezclas de xilol/parafina (3/1 y 1/1) durante 1 h cada una en estufa a 37° C. Por último se lo incluyó en parafina y se lo mantuvo en la estufa durante toda la noche. Se montó el taco y se realizaron cortes de 8 µm de espesor en un micrótomo Minot, los mismos se montaron sobre portaobjetos previamente gelatinizados y luego se hidrataron pasándolos por xilol y por sucesivas soluciones de alcohol de concentración decreciente. Se lavaron en agua destilada y se tiñeron con hematoxilina (5% en agua destilada y alcohol) 4 min, se lavaron primero con agua corriente y luego con agua destilada y se tiñeron con eosina (1% en agua destilada). Se deshidrataron, se cubrieron con Permout y con cubreobjetos para su observación al microscopio. Las fotografías se obtuvieron utilizando una película Ektar 25 (Kodak, USA).

### **3.4. Análisis Estadístico**

*3.4.1. Cuantificación de neuronas ir-GAL en el NPO en el estudio de hipofisectomía y de hibernación inducida, y cuantificación de neuronas ir-NOS en el área magnocelular en este último estudio.*

Para la validez del estudio cuantitativo de la marcación neuronal se procedió de la siguiente manera: se tomaron 7 grupos de animales, cada uno compuesto por un animal control, un animal hipofisectomizado con 7 días de sobrevida (HPX) y un animal hipofisectomizado con transplantes de hipófisis con 7 días de sobrevida (HPX+TRANSP). Los cerebros de estos tres animales fueron procesados para inmunohistoquímica (con el método de ABC con amplificación con níquel) en forma paralela y simultánea de forma tal

de minimizar las variaciones técnicas. Una vez procesados se procedió al conteo del número de neuronas por área (NPO, Sc, VH y región infundibular). Se contaron secciones frontales seriadas de cada animal y se determinó el promedio para el análisis estadístico final. Se usó un ANOVA de un factor con tres niveles de tratamiento, seguido por un test "t" de Student para determinar los diferentes perfiles celulares entre los grupos. El criterio de significación se determinó como  $P < 0,001$ . En forma análoga, cuando se analizaron las variaciones en el número de células inmunoteñidas para GAL y NOS en el experimento de hibernación inducida, se procesaron simultáneamente para inmunohistoquímica el cerebro de un sapo control y el cerebro de un sapo tratado ( $N=7$ ); se contó el número de neuronas positivas por área (NPO para GAL y región magnocelular para NOS) en secciones seriadas y se obtuvo el promedio, que se analizó mediante un ANOVA de un factor con dos niveles de tratamiento, seguido de un test "t" de Student como en el caso anterior.

#### *3.4.2. Cuantificación de inmunorreactividad de los diferentes péptidos y enzimas utilizados en el experimento de cambio en la osmolaridad.*

La medición de la densidad óptica de los cortes inmunoteñidos correspondientes a la región magnocelular se llevó a cabo usando un sistema de análisis de imagen (OPTIMAS 4.10). En forma similar a los estudios anteriores los cerebros de los animales experimentales (SL, D, VL) y control fueron procesados simultáneamente para la técnica de inmunohistoquímica. Se realizaron 6 grupos de los 4 tratamientos para cada anticuerpo analizado. Una imagen analógica de video del área considerada fue obtenida con una cámara de alta performance CCD (COHU) unida a un microscopio Zeiss equipado con un objetivo de 16X y un condensador de campo oscuro; la misma fue digitalizada en una pantalla que capta imágenes de video (Trinitron, Sony) conectada a una computadora

personal 486 equipada con una placa conversora analógica/digital (frame grabber OCULUS-TCX, CORECO Inc., Canadá). En cada caso se determinó el número de células y la intensidad de la inmunotinción. Para determinar las diferencias entre los distintos tratamientos utilizados, tanto en la cantidad de neuronas como en la densidad de la marcación correspondientes a cada péptido, se utilizó un ANOVA de un factor con cuatro niveles de tratamiento seguido por un test "t" de Student y un estudio de comparación múltiple de Bonferroni. El criterio de significación que se usó fue  $P < 0,001$ .

### **3.5. Controles**

Para realizar los controles de las inmunotinciones, se incubaron secciones paralelas en donde cada antisuero fue preadsorbido con el péptido correspondiente en cada caso ( $10^{-6}$  M). Se incubaron también secciones sólo con el primer o segundo anticuerpo que luego fueron procesados por la técnica de ABC con amplificación con níquel, y como último control se realizaron diluciones crecientes de los diferentes antisueros hasta la desaparición completa de la inmunotinción.

### **3.6. Radioinmunoensayo**

Las determinaciones de GH en el suero de los animales experimentales y control correspondientes a los experimentos de hipofisectomía total y parcial, se realizaron con métodos inmunológicos (RIA). Las muestras de sangre se obtuvieron por punsión cardíaca previa la perfusión del animal. En el dosaje de GH se siguió la técnica descrita en las

instrucciones del "National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases" del "National Hormone and Pituitary Program" (NIDDK-NHPP-NIH).

El buffer que se utilizó en las diferentes etapas del RIA es PBS (buffer fosfato de sodio 0,01 M con NaCl 0,15 M y 0,01% mertiolate a pH 7,6). La preparación de hormona purificada (GH de rata) para marcar con iodo radioactivo ( $^{125}\text{I}$ ) fue provista por el NIDDK-NHPP-NIH. La introducción de un átomo de  $^{125}\text{I}$  en las moléculas de la hormona se realizó con el método de la cloramina-T (1 min. de exposición). La hormona marcada se purificó pasándola por una columna (10x1 cm) de Sephadex G 50. Se utilizaron 2,5  $\mu\text{g}$  de hormona y 1 mCi de  $^{125}\text{I}\text{Na}$  (New England Nuclear).

El anticuerpo dirigido contra la molécula de GH de rata se obtuvo en mono y fue provisto por el NIH. La dilución del primer anticuerpo se preparó en una solución de suero normal de mono al 3% (SNM-PBS-0,05 M EDTA). La dilución inicial utilizada fue: anti-rGH 1:6000. La separación de la hormona libre de la unida al anticuerpo se efectuó con un segundo anticuerpo dirigido contra las inmunoglobulinas de mono (generado en cabra) (origen NIH). Se utilizó una preparación de referencia provista por el programa del NIH, GH RP2.

El protocolo de ensayo fue el siguiente:

- 1- buffer (PBS-BSA-1% EDTA),
- 2- muestra o preparación de referencia; éstas, junto con el buffer, deben ocupar un volumen máximo de 300  $\mu\text{l}$ ,

3- 100  $\mu$ l de hormona marcada  
(aproximadamente 19000 cpm),

4- 100  $\mu$ l del primer anticuerpo.

La mezcla se incubó durante 36 hs a temperatura ambiente. En ese momento se agregaron 100  $\mu$ l del segundo anticuerpo en una dilución 1:20 y se continuó la incubación durante 48 hs más. Se agregan 500  $\mu$ l de polietilenglicol y mediante una centrifugación (3500 rpm  $\times$  30 min a 4° C) se precipitó el complejo "segundo anticuerpo-primer anticuerpo-hormona", luego se procedió a aspirar el sobrenadante. La radioactividad del precipitado se contó en un contador gama (ABBOTT Lab.).

La curva (% de unido vs. log de la masa total de hormona) fue lineal entre: 0,15 y 2,5 ng de RP2 (GH) para el experimento de animales hipofisectomizados ("pool" de 7 muestras para cada grupo). Todas las muestras se dosaron en el mismo ensayo. La curva (% de unido vs. log de la masa total de hormona) fue lineal entre: 0,039 y 2,5 ng de RP2 (GH) para el experimento de animales pars distalectomizados ("pool" de 7 muestras para cada grupo). Todas las muestras se dosaron en el mismo ensayo.

### **3.7. Transporte Axonal Retrógrado**

Se realizaron primero los pasos descritos en el procedimiento quirúrgico de hipofisectomía hasta exponer la hipófisis y la zona hipotálamica, luego se hicieron inyecciones de 0,05-0,2  $\mu$ l con una microjeringa Hamilton de 1  $\mu$ l con dos tipos diferentes de trazadores: 1) perclorato de 1,1'-Dioctadecyl-3, 3, 3', 3',-tetrametilindocarbocianina (Dil) 0,2% (Molecular Probes, Inc., Eugene) y 2) Fluorogold 0,2% (Fluorochrome, Inc.,

Colorado). Las inyecciones se trataron de realizar en dos áreas específicas: EM y lóbulo neural. Los animales se dejaron sobrevivir entre 2 y 7 días, y luego fueron perfundidos por aorta primero con solución fisiológica y luego con una solución fijadora (ya descrita). Se disecaron los cerebros, que fueron sobrefijados durante otras 24 hs, después de lo cual fueron puestos en una solución de sacarosa al 10% por 48 hs. Luego se obtuvieron secciones de 20  $\mu$ m en un crióstato (Microm Zeiss, Alemania), las que una vez montadas sobre portaobjetos, se dejaron secar durante 1 a 2 hs, se lavaron en PBS 0,01 M y se cubrieron con una mezcla de PBS y glicerol (1:3) conteniendo para-fenilendiamina y cubreobjetos. Los cortes se observaron en un microscopio para epifluorescencia Nikon Microphot FXA. Las fotografías de fluorescencia se realizaron utilizando película Kodak Tri X (Kodak Polaroid, USA). En algunos casos también se utilizó el sistema de imágenes confocales de rayo láser con un equipo Bio Rad MRC 600 equipado con un láser combinado de krypton/argón y un microscopio Nikon Optiflot II. Se utilizó un filtro standard BHS de canal único con un fondo de excitación (568 DF) para detección de la fluorescencia. Las imágenes elegidas fueron impresas utilizando una impresora Sony UP-5200 MD.



## **4. RESULTADOS OBTENIDOS**

#### 4.1. Distribución de GAL en el Cerebro del Sapo

Durante esta investigación hemos corroborado, y principalmente ampliado las observaciones realizadas anteriormente por otros autores en cuanto a la distribución de la inmunorreactividad a GAL en el cerebro de anfibios; siendo este el primer estudio que describe totalmente la expresión de GAL en el cerebro del sapo. Un mapeo completo de células y fibras ir-GAL en el SNC de *Bufo arenarum* se muestra en la fig. 2 (A-N). Para la identificación de las estructuras neuronales fueron usados los atlas de Frontera (1952), Wada y col. (1980) y Neary y Northcutt (1983).

La inmunorreactividad a GAL presenta en el sapo una muy amplia distribución desde el telencéfalo hasta la médula espinal y ninguna estructura inmunoteñida para GAL fue encontrada en los experimentos control de inmuoabsorción.

##### 4.1.1. Telencéfalo

Se observaron tres grupos bien definidos de células ir-GAL en el telencéfalo. Un primer grupo compuesto por neuronas localizadas predominantemente en la parte ventral del estriado (Stv) (Figs. 2A; 3A) presenta células en su mayoría poco teñidas con axones finos (Fig. 3C). En esta región pudieron observarse fibras positivas corriendo en forma paralela al ventrículo lateral (Figs. 2A, B; 3A). Un segundo grupo formado por un número moderado de células pálidas en el núcleo acumbens (NAS) (Figs. 2A; 3B) incluye células muy similares en tamaño y forma a las del Stv, con las que forman un mismo grupo neuronal. Aquí, las fibras ir-GAL se observaron distribuidas espaciadamente a través de todo el septum, haciéndose más densas en dirección caudal y ventromedial. Además,

podían verse escasas fibras invadiendo el palio desde el septum. El tercer grupo de cuerpos celulares con inmunorreactividad a GAL se concentró en la amígdala, siendo su morfología muy heterogénea con formas redondas, fusiformes o piriformes (Figs. 2C, D; 4A). Las células con forma redonda o piriforme se localizaron en las áreas dorsal y ventral del núcleo, mientras que las que presentaban forma fusiforme resultaron ser menos numerosas y se localizaron entre las fibras de la comisura anterior (AC) (Fig. 4B). La amígdala exhibió una densa red de fibras positivas a GAL claramente separada por arriba, del palio lateral y por abajo, del LFB y de la AC (Fig. 2C).

#### *4.1.2. Area preóptica-hipotalámica*

En esta región fueron localizados somas ir-GAL principalmente a lo largo de toda la extensión rostro-caudal del NPO (Figs. 2C, D). Los mismos ocupaban la sustancia gris periventricular y estaban alineados en forma paralela a las paredes del tercer ventrículo (Fig. 4C). La mayoría de las proyecciones de estas neuronas se dirigían hacia el parénquima y no hacia el ventrículo. Sólo en pocas ocasiones penetraron la capa endimaria alcanzando la superficie ventricular. Estos somas neuronales resultaron ser más numerosos en la parte rostral que en la parte caudal del área, donde sólo ocuparon la región dorsal (Figs. 4C, D). A su vez, fibras positivas se distribuyeron densamente en el área preóptica anterior, principalmente en la zona periventricular (Figs. 2B-D), para continuar distribuidas más laxamente en dirección lateral.

Ocasionalmente dentro del hipotálamo, pudieron verse células ir-GAL en la región magnocelular (Fig. 2E). Estas células fueron significativamente más grandes que las células del resto de la región preóptica-hipotalámica y se mostraron muy débilmente

teñidas. Un sistema de gruesas fibras fuertemente inmunoteñidas con antisuero de GAL fue localizado a lo largo del hipotálamo rostral. Estas fibras rodearon al LFB donde sólo pudieron identificarse pocos y muy finos procesos neuronales (Fig. 5). Caudalmente, se detectaron paquetes de fibras ir-GAL dirigiéndose a la región supraquiasmática ventrolateral. A nivel del OC se observó un grupo de cuerpos celulares positivos a GAL en el Sc (Figs. 2F; 6A, B). Las fibras positivas encontradas en esta zona, resultaron moderadamente densas, mientras que sólo escasas fibras pudieron observarse en el OC. La acumulación más densa de somas ir-GAL se encontró en el VH cerca de la superficie del ventrículo (Fig. 6C) extendiéndose caudal y ventralmente hacia la región infundibular (Figs. 2G-I). La mayoría de estas células fueron localizadas en la capa subependimaria del área y presentaron procesos que contactaban con el FCS (Fig. 6C). Dentro del VH rostral, las regiones mediales se encontraron ocupadas por fibras finas galaninérgicas de densidad moderada, que se extendían hacia la región infundibular, donde terminaban. Lateralmente se observó una alta densidad de fibras, probablemente como extensión de las fibras ya descritas en el NPO. Otras dos grandes poblaciones de células ir-GAL fueron localizadas en el NPvO en la región infundibular ventral y en el tubérculo posterior (TP) (Fig. 2I). En el NPvO las células densamente empaquetadas se ubicaron en estrecha asociación con el ventrículo (Figs. 7C, D). Algunas de ellas se disponían en contacto directo con la superficie ventricular y mandaban procesos gruesos al ventrículo, que generalmente terminaban en forma de nódulo dentro de esa cavidad (Fig. 7E). En el TP caudal, se presentó siempre una alta concentración de células de tamaño mediano (Figs. 2I; 7B) y sólo ocasionalmente se vieron células emitiendo fibras hacia el ventrículo. Fibras ir-GAL se localizaron en forma más abundante en la capa externa en comparación con la capa interna del infundíbulo (Figs. 2H, I) y siendo también más numerosas cerca de la línea media de la EM que en sus márgenes laterales. Se reconocieron fibras ir-GAL entrando a la hipófisis desde la EM e

inervando el lóbulo neural (Fig. 7F). En los lóbulos intermedio y anterior de la hipófisis sólo pudieron detectarse fibras escasas y dispersas.

#### *4.1.3. Tálamo*

Se observaron abundantes fibras cruzando a través de toda la extensión rostro-caudal del tálamo. Las mismas se mostraron intensamente teñidas sobre todo en la región anterior del núcleo talámico lateral (Figs. 2G; 8A). En una posición más caudal, una red densa de fibras ir-GAL se detectó principalmente en regiones mediales, mientras que sólo pocas fibras pudieron observarse lateralmente (Figs. 2G-I).

#### *4.1.4. Epitálamo*

Se encontró un número moderado de fibras positivas en la división ventral de la habénula. En la parte dorsal sólo se vieron escasas fibras, excepto por un denso fascículo fuertemente teñido que ocupaba la parte medial y se continuaba hacia la paráfisis y el plexo coroideo, donde además se identificaron fibras gruesas (Figs. 8B-D).

#### *4.1.5. Tectum óptico*

Pocas células grandes y esféricas fueron localizadas en forma adyacente a las paredes del ventrículo óptico (Figs. 2I; 9A). Las fibras positivas estaban organizadas en cinco capas diferentes alrededor de dicha cavidad. Cerca del la luz del ventrículo, una capa de fibras suavemente teñidas estaba rodeada por otra capa fina de fibras ir-GAL densamente empaquetadas. Externamente, podía distinguirse una tercera capa de fibras

dispersas rodeada a su vez por un moderado número de proyecciones inmunoteñidas (Fig. 2I). Finalmente se veían fibras gruesas en baja densidad en ubicación periférica y dorsal pareciendo una extensión de las fibras ya descritas en el tálamo lateral (Fig. 9B).

#### 4.1.6. Tronco encefálico

Algunos grupos celulares fueron detectados en el tronco encefálico. El grupo más rostral se observó en el núcleo del tracto solitario (NS), donde un número moderado de células se disponía cercano a los márgenes mediales del núcleo (Fig. 2L). Además un número menor de células fue visto en forma ventral al piso del cuarto ventrículo. Estas células formaban una columna que se continuaba caudalmente en la médula espinal, a los lados del canal central. En un nivel más caudal se encontró otro grupo celular en el núcleo gracilis (NG), en posición dorsal y lateral con respecto al canal central (Figs. 2M; 9C, D). Se detectaron fibras ir-GAL principalmente densas a lo largo de toda la extensión rostro-caudal. Sin embargo, en los niveles más rostrales sólo se pudo determinar una baja densidad de fibras positivas en forma lateral, continuándose en una localización dorsal a nivel de la sustancia gris periacueductal (Figs. 2J, K).

En la región de la médula oblongada la distribución de fibras inmunoteñidas fue principalmente homogénea y con una intensidad moderada (Figs. 2L, M). Sin embargo, en forma periférica y dorsal se encontró un tracto de fibras fuertemente teñidas que correspondería a la vía espinal del núcleo trigémino-espinal (Fig. 2M).

#### 4.1.7. Médula espinal

En la médula espinal fueron identificadas dos poblaciones bien diferentes de somas positivos a GAL. Una corresponde a las neuronas del asta intermedio lateral localizadas lateralmente al conducto del epéndimo (Figs. 2N; 9E). Estas células eran en su mayoría fusiformes o tenían forma triangular y eran más numerosas en el nivel rostral que en el caudal de la médula espinal (Figs. 2N, E). El otro grupo corresponde a las motoneuronas multipolares grandes del asta ventral, las que usualmente exhibían una moderada inmunotinción (Figs. 2N; 9F). El patrón general de fibras ir-GAL en la médula espinal resultó similar al ya descrito para la médula oblongada, pero en este caso se encontraron fibras fuertemente teñidas en la periferia del asta dorsal, que se continuaban rostralmente con las de la vía espinal del núcleo trigémino-espinal.

#### 4.2. Efectos de la Hipofisectomía Total y Parcial sobre la Distribución de GAL en el Hipotálamo del Sapo.

Luego de haber obtenido un mapeo completo de la distribución de la inmunorreactividad a GAL en el cerebro del sapo *Bufo arenarum*, se intentó determinar los efectos de la hipofisectomía total y parcial sobre la expresión del péptido GAL en las distintas poblaciones neuronales. Para ello se realizaron los siguientes procedimientos quirúrgicos ya descritos en materiales y métodos:

1- extirpación de hipófisis (HPX),

- 2- extirpación de hipófisis y subsecuente autotransplante de la misma en la región femoral (HPX+TRANSP),
- 3- extirpación de adenohipófisis o pars distalis (PDX),
- 4- extirpación de adenohipófisis o pars distalis y subsecuente autotransplante de la misma en la región femoral (PDX+TRANSP),
- 5- extirpación de adenohipófisis o pars distalis y terapia sustitutiva con hormona de crecimiento (PDX+GH),
- 6- extirpación de adenohipófisis o pars distalis y terapia sustitutiva con solución salina (PDX+SL),
- 7- simulación de la operación de hipofisectomía, sin extirpación de hipófisis, ni de pars distalis (CONTROL).

Cuando se realizaron los experimentos control de inmunoabsorción para los diferentes tratamientos no se detectó ninguna estructura positiva a GAL; así como tampoco hubo positividad cuando se omitió la incubación con el primer o con el segundo anticuerpo. En el otro tipo de experimento control se utilizaron diluciones crecientes del primer anticuerpo y se observó una progresiva disminución de la inmunotinción, hasta su total desaparición a una concentración de GAL =1:6000.

#### *4.2.1. Efecto de la HPX en la expresión de GAL en la región magnocelular*

En los animales control, sólo ocasionalmente se observaron células ir-GAL en la región magnocelular (Fig. 10A). Luego de 48 hs a 3 días de realizada la hipofisectomía se encontró un aumento gradual en la intensidad de la tinción en este área (Figs. 10B, C), donde se reconocieron claramente células inmunoteñidas. Después de 7 días de la



operación las neuronas magnocelulares desaparecieron, presentando la zona una inmunotinción comparable a la de los animales control. Cuando los animales hipofisectomizados fueron transplantados con hipófisis en la zona femoral (HPX+TRANSP) y luego sacrificados a los 3 días de la operación, aparecieron las neuronas magnocelulares con una inmunotinción a GAL semejante a la del grupo HPX; por lo que el trasplante no previno la aparición de somas magnocelulares ir-GAL a los 3 días luego de la hipofisectomía (Fig. 10D). También los tiempos de aumento y disminución de ir-GAL se mantuvieron similares a los del grupo HPX.

#### *4.2.2. Efecto de la PDX en la expresión de GAL en la región magnocelular*

No se observó ninguna diferencia en la intensidad de la tinción de GAL en la zona magnocelular luego de la pars distalectomía, en los diferentes tiempos estudiados.

#### *4.2.3. Efecto de la HPX en la expresión de GAL en el NPO*

En los animales control, los cuerpos celulares ir-GAL fueron localizados en toda la extensión del NPO a los lados del tercer ventrículo (Fig. 11A). Luego de 5 a 14 días de la hipofisectomía se observó un aumento gradual en la inmunotinción a GAL en esta zona (Figs. 11B, C). Siete días después de la hipofisectomía se detectó un aumento del doble en el número de células ir-GAL ( $n=7$ ;  $P<0,001$ ) (Fig. 12A), explicado por la aparición de numerosas células intraependimarias con una intensa inmunomarcación (Fig. 11C). Cuando los animales hipofisectomizados fueron transplantados con hipófisis (grupo experimental HPX+TRANSP) y sacrificados a los 7 días de la operación, las células intraependimarias del NPO desaparecieron (Fig. 11D). En todos los tiempos estudiados, los

animales HPX+TRANSP exhibieron una inmunotinción comparable a la de los animales control (Figs. 11D; 12A). En este caso, y a diferencia de lo que ocurre en la región magnocelular, el tranplante sí previno el aumento del número de células ir-GAL.

En las otras áreas estudiadas (Sc, VH y región infundibular) no pudieron observarse diferencias cualitativas o cuantitativas en la inmunotinción a GAL (Figs. 12B-D).

#### *4.2.4. Efecto de la PDX en la expresión de GAL en el NPO*

Luego de la extirpación de la pars distalis (grupo experimental PDX) se observó un aumento en la inmunorreactividad a GAL en neuronas intraependimarias del NPO semejante al encontrado en los animales hipofisectomizados (Fig.13A). Nuevamente en este caso cuando los animales fueron transplantados con pars distalis en la región femoral (grupo experimental PDX+TRANSP) el número de células ir-GAL se mantuvo comparable al del valor control (Fig. 13B); previniendo el transplante el aumento de neuronas inmunoteñidas.

#### *4.2.5. Funcionalidad de los trasplantes*

El estado funcional de los trasplantes de hipófisis es evaluado con facilidad a partir de las condiciones de la piel y del tiempo de sobrevivencia del animal (Houssay, 1949).

Inmediatamente después de la operación de hipofisectomía puede evaluarse el estado funcional del transplante mediante la observación del color de la piel del animal. El cambio de color más típico luego de la hipofisectomía es la palidez marcada, por retracción

de los melanóforos y expansión de los xantóforos. El color pálido es amarillo verdoso y se observa desde los 20 minutos después de la operación, persistiendo indefinidamente mientras el animal vive. Este cambio no se produce con la extirpación de la pars distalis sola. La contraprueba de que la palidez se debe a la falta de pars intermedia la dan los injertos o implantaciones de hipófisis enteras o de pars intermedia y lóbulo neural, bajo la piel o en los músculos, que hacen volver el color verde natural durante 1 a 3 días, mientras el injerto es activo. Puede mantenerse el color natural permanentemente repitiendo los injertos de pars intermedia y lóbulo neural.

La hipofunción o la falta de la pars distalis, resulta en un aumento de la queratinización de la epidermis y en la inhibición, demora o cambio de piel en forma incompleta, con restos de epidermis comificada fácil de extraer en los animales que se dejan sobrevivir por más de una semana. Esto se observa como un oscurecimiento de la piel. En los sapos normales el cambio de la piel se realiza aproximadamente cada semana.

Los sapos que fueron transplantados con hipófisis inmediatamente después de la hipofisectomía presentaron todos los auto y homotransplantes bien vascularizados e intactos. Los mismos conservaron su actividad funcional a juzgar por el color y las condiciones de la piel de los animales pertenecientes al grupo experimental HPX+TRANSP, los cuales fueron comparables al grupo control. Contrariamente, el grupo experimental HPX presentó un color de piel pálido amarillo-verdoso.

Los animales que fueron transplantados con pars distalis luego de la pars distalectomía también presentaron todos los auto y homotransplantes bien vascularizados e intactos. Sin embargo, en este caso la funcionalidad del transplante es más difícil de

evaluar mediante las condiciones de la piel, durante el corto lapso de una semana. Por ello es que en todos los casos se realizaron exámenes histológicos.

El examen microscópico reveló trasplantes de hipófisis y de pars distalis intactos en estrecho contacto con el músculo semimembranoso y con por lo menos dos tipos diferentes de células identificable (Figs. 14A, B; 15A, B). Sin embargo, los citoplasmas aparecían reducidos y no granulados. Normalmente las células de los trasplantes eran más pequeñas y estaban menos diferenciadas que las de la pars distalis de sapos normales adultos y el tejido presentaba en muchos casos células laxamente unidas. Cualitativamente se pudo detectar una mayor tendencia a infiltraciones y hemorragias en los trasplantes de hipófisis completa (Figs. 14A, B), en los que se observaron alta cantidad de vasos con eritrocitos por el tejido conectivo que unía al músculo con el trasplante y en la hipófisis misma. Por el contrario, los trasplantes de pars distalis sola parecían menos hemorrágicos, pero también presentaban gran cantidad de vasos en el tejido conectivo que los unía al músculo (Figs. 15A, B).

#### *4.2.6. Efecto de la PDX y de la terapia sustitutiva con GH en la expresión de GAL en el NPO*

Luego de una terapia sustitutiva con GH en animales pars distalectomizados (grupo experimental PDX+GH) durante siete días, las células preópticas intraependimarias no mostraron inmunotinción a GAL (Fig. 13D) en forma similar a los animales control. Por el contrario, cuando los animales pars distalectomizados fueron tratados con solución salina (animales PDX+SL) se observó un aumento en el número de células preópticas (Fig. 13C),

apareciendo las neuronas intraependimarias inmunoteñidas de forma similar a los grupos experimentales HPX y PDX.

#### 4.2.7. Radioinmunoensayo

Cuando se midieron los niveles plasmáticos de GH en los diferentes grupos experimentales, se obtuvieron los valores de la siguientes tablas. En la tabla 1 se observan niveles de la hormona equivalentes cuando se comparan los grupos CONTROL y HPX+TRANSP y de la misma forma en la tabla 2 figuran niveles de GH semejantes en los grupos CONTROL y PDX+TRANSP; siendo las concentraciones séricas de GH muy bajas o indetectables en los grupos HPX (tabla 1) y PDX (tabla 2).

Tabla 1: concentraciones séricas de GH (ng/ml de suero) medidas durante el experimento de hipofisectomía.	
TRATAMIENTO	GH (ng/ml de suero)
CONTROL	1,7
HPX	no detectable
HPX+TRANSP	2,2

Tabla 2: concentraciones séricas de GH (ng/ml de suero) medidas durante el experimento de pars distalectomía.

TRATAMIENTO	GH (ng/ml de suero)
CONTROL	1,3
PDX	no detectable
PDX+TRANSP	1,5

#### 4.3. Efectos de la Deshidratación y la Sobrecarga Salina sobre Diferentes Péptidos Hipotalámicos

En las células hipotalámicas magnocelulares la respuesta en la expresión peptidérgica a los disturbios en la homeostasis hidromineral depende del tratamiento empleado. Tanto la deshidratación como la sobrecarga salina causaron cambios significativos en el contenido de un número de sustancias neuroactivas en las neuronas magnocelulares. Para facilitar la descripción de los mismos, cada tratamiento será descrito en detalle.

Luego de 3 días de deshidratación, sobrecarga salina o sobrecarga de volumen, no encontramos diferencias aparentes en el patrón de distribución, la intensidad de la tinción y la cantidad de células inmunorreactivas a GAL y CGRP en la región magnocelular comparados con los animales control. En los experimentos control, tanto de

inmunoabsorción como en los que se omitieron las incubaciones con el primer y segundo anticuerpo, no se detectaron estructuras inmunoteñidas en los diferentes casos estudiados.

#### *4.3.1. Efectos provocados por la sobrecarga salina en la expresión de sustancias neuroactivas en la región magnocelular hipotalámica.*

El patrón típico de expresión de VP que se observó en el hipotálamo de los sapos control consistió en una importante inmunotinción sobre toda la región magnocelular dorso-ventral, con un gran número de células intensamente inmunomarcadas (Figs. 16A; 17A). Algunas emitían prolongaciones que contactaban con el FCS (Figs. 16A, B). La exposición a solución salina hipertónica (2% NaCl) como única fuente de líquido resultó en una disminución significativa de la inmunorreactividad a VP en las neuronas magnocelulares hipotalámicas (Fig. 17D). Luego de tres días de tratamiento, el número de neuronas que presentaron inmunotinción a VP cayó al 70% del valor control ( $P < 0,001$ ) (Figs. 17D; 21A) mientras que la intensidad de la marcación de VP en las células que conservaron una tinción positiva no disminuyó, manteniendo los valores observados en los animales control (Figs. 17D; 22A).

Por el contrario la misma exposición a sobrecarga salina resultó en un marcado y significativo aumento en el número de células inmunorreactivas a CCK, TH y NOS en el sistema magnocelular neurosecretor (Figs. 18D; 19D; 20D; 21B-D). Además, como muestran las figuras 22B y D, la densidad de inmunotinción para CCK y NOS también aumentó significativamente con este tratamiento, mientras que no se encontraron cambios en los niveles de intensidad de marcación de TH (Fig. 22C) en la región magnocelular luego de tres días de tratamiento.

#### *4.3.2. Efectos de la deshidratación en la expresión de sustancias neuroactivas en la región magnocelular hipotalámica.*

Los sapos privados de agua durante tres días mostraron un aumento del 1000% ( $P < 0,001$ ) en el número de células ir-NOS en la región magnocelular (Figs. 20B; 21D). En forma similar, hubo un aumento del 100% ( $P < 0,001$ ) en el número de somas CCK positivos (Figs. 18B; 21B). Sin embargo, la cantidad de células teñidas para VP y TH cambió en la dirección opuesta, observándose una disminución cercana al 80% en ambos casos (Figs. 17B; 19B; 21A, C).

Los niveles detectados en la intensidad de la tinción para VP y NOS por inmunohistoquímica variaron en forma paralela a los cambios detectados en el número de neuronas magnocelulares inmunorreactivas a VP y NOS respectivamente (Figs. 22A, D). Por otro lado, el tratamiento de deshidratación durante tres días no tuvo aparentemente efecto alguno en los niveles de intensidad de marcación de CCK ni en los de TH (Figs. 22B, C).

#### *4.3.3. Efectos de la sobrecarga de volumen en la expresión de sustancias neuroactivas en la región magnocelular hipotalámica.*

El efecto predominante observado en este experimento fue un aumento pronunciado y estadísticamente significativo en el número de células teñidas para la NOS (Figs. 20C; 21D); mientras que se observó una disminución en el número de células inmunoteñidas para VP y TH (Figs. 17C; 19C; 21A, C) y no se registraron cambios en la



cantidad de células ir-CCK siempre en comparación con los datos hallados en los animales control (Figs. 18C; 21B).

Los animales expuestos a condiciones de hipo-osmolaridad inducida no presentaron alteraciones significativas en la intensidad de la tinción de VP, CCK y TH en las neuronas magnocelulares (Figs. 22A-C). Sin embargo, luego de tres días de hipo-osmolaridad inducida se encontró un marcado aumento en los niveles de intensidad de la inmunorreactividad para la NOS en este área (Fig. 22D).

#### **4.4. Efectos de la Hibernación Inducida sobre la Expresión de GAL y NOS en el Hipotálamo del Sapo.**

Se observaron variaciones estacionales en la inmunorreactividad tanto para GAL en el NPO como para NOS en el área magnocelular. Al igual que en los experimentos anteriores, los distintos controles para determinar la especificidad de los antisueros llevaron a la desaparición total de la inmunomarcación.

En los animales control los cuerpos celulares ir-GAL se localizaron en toda la extensión del NPO a los lados del tercer ventrículo (Figs. 23A, C). Cuando se examinaron los efectos de la hibernación sobre la expresión de la inmunorreactividad a GAL en esta región, se encontró que el número de neuronas inmunoteñidas aumenta en los animales hibernantes ( $P < 0,001$ ) (Figs. 23B, D; 25A).

Con respecto a la expresión de NOS, encontramos una marcada variación estacional. De hecho, la inmunotinción para la NOS es apenas detectable en los animales capturados en primavera (Fig. 24A). Por el contrario en los animales con hibernación inducida, las neuronas ir-NOS y sus fibras de proyección estaban fuertemente teñidas y aumentaban significativamente en número al compararlas con las de los animales control (Figs. 24B-D; 25B).

En síntesis, la hibernación artificialmente inducida, mediante la exposición a un ambiente frío y de oscuridad constante, aumentó la inmunorreactividad a GAL y NOS en los sistemas neuronales del NPO y de la región magnocelular del hipotálamo del sapo respectivamente.

#### **4.5. Experimentos de Transporte Axonal Retrógrado**

En todos los cerebros estudiados no se encontró un patrón de marcación consistente con los trazadores Dil y Fluorogold. Sin embargo, en forma general y en los diferentes tiempos estudiados, los cerebros analizados que si mostraron fluorescencia (60 % del total aproximadamente) tuvieron el siguiente esquema de distribución.

Cuando se inyectó el trazador en la EM y en el lóbulo neural, la mayoría de las fibras marcadas en forma retrógrada cursaban por el tracto preóptico-hipofisario, tanto en su porción ventral como lateral, hasta alcanzar un gran número de neuronas fluorescentes, con claras diferencias en cuanto a su tamaño, en todas las divisiones del núcleo magnocelular.

Cuando el trazador fue inyectado exclusivamente en el lóbulo neural, se localizó una población distintiva y predominante de neuronas grandes magnocelulares positivas para Dil en la porción dorsal del núcleo magnocelular (Figs. 26A, B) y un menor número de células dispersas pudo observarse en el Mgv (Fig. 26C). Las fibras que se proyectaban desde estas células se localizaron cursando el hipotálamo ventral y continuándose por la región infundibular en dirección ventral e interna para finalmente entrar a la zona de inyección (lóbulo neural), atravesando la capa interna de la EM.

Cuando la inyección del trazador se extendió no solo al lóbulo neural sino que también abarcó la EM, un número mayor de células fluorescentes pudo observarse, sobre todo en la zona ventral del núcleo magnocelular (Figs. 27A-D; 28A, B). Un plexo más denso de axones emitido por estas neuronas ocupó regiones más laterales en el tracto hipotálamo-hipofisario abarcando también la zona externa de la EM. Las proyecciones dentro de las diferentes partes de la hipófisis no pudieron ser distinguidas debido a la fuerte fluorescencia que queda en el sitio de aplicación del trazador. También pudieron visualizarse neuritas marcadas con Dil en el NPO (Figs. 28C, D). Los cuerpos celulares que originan estos axones no pudieron identificarse.

## 5. DISCUSSION

### 5.1. Consideraciones Técnicas

Debido a que la reacción antígeno-anticuerpo es absolutamente específica, se puede lograr la identificación positiva de aquellos constituyentes de los tejidos contra los que se pueden generar anticuerpos. Sin embargo existen algunas dificultades al respecto. Los anticuerpos, que son predominantemente  $\gamma$ -globulinas, se obtienen mediante la inmunización de conejos (o cabras o chanchitos de la india, etc.) con el antígeno. El antígeno debe estar completamente puro o ser preferentemente sintético para asegurarse un anticuerpo lo más específico posible. A pesar de eso, el antisuero resultante no será específico y exclusivamente dirigido contra el antígeno inyectado. Los anticuerpos producidos serán dirigidos contra distintas porciones de la molécula antigénica (determinantes antigénicos) y de la proteína transportadora o "carrier" o contra regiones de la misma. El suero del animal donante también tendrá muchos anticuerpos naturales, que podrían reaccionar contra componentes propios de los tejidos de las muestras en estudio. Por lo tanto una inmunorreacción aparentemente positiva no debe ser considerada como tal debido a la interacción del antígeno-anticuerpo deseada, a menos que se realicen los controles estrictos y necesarios, que resten la posibilidad de obtener resultados falsos-positivos.

La inespecificidad de los antisueros no sólo se debe a la población heterogénea de anticuerpos del suero del donante, la que puede reaccionar con componentes del tejido diferentes del antígeno específico buscado, sino también a la existencia de secuencias aminoacídicas compartidas por sustancias relacionadas, particularmente péptidos, lo cual lleva a que un determinado anticuerpo reaccione con varias sustancias. La mayoría de los anticuerpos solo reconocerán secuencias de 4 a 8 aminoácidos. Usualmente es poco

probable que un suero contenga anticuerpos contra la parte de la molécula deseada. Intentos para caracterizar un anticuerpo mediante la absorción contra fragmentos del antígeno no siempre son confiables, ya que existe el peligro de que un pequeño fragmento de una molécula antigénica pierda su configuración molecular particular en solución, la que le otorgaba su antigenicidad cuando formaba parte de la molécula entera. Los sitios antigénicos no necesitan ser secuencias lineales de aminoácidos, pueden ser simplemente secuencias espacialmente adyacentes, creadas por el plegamiento de la cadena de aminoácidos. Ocasionalmente es posible usar fragmentos sintéticos seleccionados de la molécula para la inmunización, de modo que el antígeno resultante inducirá la síntesis de anticuerpos probablemente más específicos. Desafortunadamente, cuanto más pequeña sea la molécula aminoacídica usada menos inmunogénica resulta y deberá ser tratada como un hapteno uniéndola a una molécula transportadora para poder realizar la inmunización. Otro problema a considerar es que una secuencia pequeña puede ser común a varios péptidos diferentes. Por lo que estas dos últimas situaciones nuevamente inducirán la aparición de anticuerpos inespecíficos.

Como ya se mencionó, el suero del animal donante tendrá una mezcla de anticuerpos, que reaccionarán con diferentes secuencias aminoacídicas del hapteno y de la molécula transportadora, pero los anticuerpos contra la molécula carrier pueden ser adsorbidos mediante el agregado de la proteína transportadora, por ej. albúmina bovina al antisuero, antes de ser usado. En forma alternativa el tejido que va a ser inmunoteñido puede ser preincubado con albúmina o suero no inmune de la especie donante (en caso que se utilice un segundo anticuerpo conjugado a la molécula reveladora, el suero preinmune deberá pertenecer al donante del segundo antisuero) para bloquear los sitios de unión inespecíficos. El problema de la reactividad cruzada inespecífica es difícil de eliminar,

pero puede chequearse con el uso de una variedad de anticuerpos contra diferentes porciones de la molécula buscada, si éstos están disponibles.

Un anticuerpo útil para inmunocitoquímica debe combinarse fuertemente con su antígeno de manera tal que no se despegue en los lavados del tejido, durante el procedimiento de la tinción. Esta fuerza de unión representa la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Cuando un antígeno, que contiene muchos sitios repetidos del mismo determinante antigénico, se combina con un antisuero polivalente, la fuerza de unión se incrementa ya que todos los sitios posibles de unión (uniones no covalentes) deberán ser rotos simultáneamente antes de que el antígeno y el anticuerpo puedan disociarse. En inmunohistoquímica un resultado aparentemente positivo puede ser genuino, pero como vimos existen riesgos de reacciones no específicas, las cuales deben ser eliminadas antes de considerar los resultados aceptables. Los controles esenciales pueden clasificarse en controles del método y controles de especificidad del antisuero.

<b>CONTROLES DEL METODO</b>	<b>CONTROLES DE ESPECIFICIDAD DEL ANTISUERO</b>
- Incluir cortes de tejido que presenten el antígeno con seguridad. Deben dar positivos siempre. Controlan que la técnica se realiza correctamente.	- Preincubar al anticuerpo con el antígeno específico. Debe dar negativo.

<p>- Colocar suero no inmune en la primera incubación. Reduce la marcación inespecífica.</p>	<p>- Preincubar al anticuerpo con antígenos inespecíficos. Debe dar positivo. El antisuero no debe reaccionar inespecíficamente con antígenos relacionados.</p>
<p>- Omitir la incubación con el primer anticuerpo. Debe dar negativo. Da una idea de la inespecificidad que presenta el segundo anticuerpo.</p>	<p>- Realizar diluciones crecientes del primer anticuerpo. Da una idea de la especificidad, pero más que nada de la afinidad del primer anticuerpo por el antígeno buscado.</p>

Nosotros realizamos varias pruebas inmunohistoquímicas (donde se probaron diferentes tiempos de incubación, diferentes concentraciones de antisueros y diferentes mezclas reveladoras, además de bloqueos alternativos de la peroxidasa endógena y uso de suero normal en una preincubación) hasta obtener las mejores imágenes con la mayor sensibilidad posible. La técnica de inmunocitoquímica de Avidina/Biotina, es una técnica sencilla que da buenas imágenes de células inmunoteñidas pero muy pobres imágenes de fibras; en cambio tanto la técnica de Avidina/Biotina con intensificación con níquel, como la de fluorescencia dan un tipo de imagen mucho más nítida tanto de fibras como de células positivas, lo que es una gran ventaja para la obtención de fotografías. Además, con la amplificación con níquel se aumenta mucho la sensibilidad del método. Por ello, todos los experimentos fueron hechos utilizando estas dos últimas técnicas. Por otro lado, como ya se mencionó en el capítulo anterior, se realizaron todos los controles necesarios para poder considerar valederos los resultados obtenidos.



Es importante destacar que en ninguno de los experimentos realizados se utilizaron anticuerpos específicos contra péptidos aislados de anfibios, sino que siempre se usaron antisueros contra antígenos de mamíferos. Aunque la mayoría de los péptidos que se aislaron de los anfibios [por ejemplo: TRH (Kuchler y col., 1990), CRH (Tonon y col., 1985), somatostatina (Takami y col., 1985), NPY (McKay y col., 1990; Chartrel y col., 1991a), ANP (Lazure y col., 1988),  $\alpha$ -MSH (Pan y Chang, 1989; Tonon y col., 1989; Tranchand Bunel y col., 1992) y VIP (Chartrel y col., 1991b)] guardan mucha homología (algunos son idénticos) con los encontrados en mamíferos (Chang y col., 1980; Tatemoto y col., 1982; Grammer y col., 1983; Minth y col., 1984; Allen y col., 1987; Sudoh y col., 1988; Miyata y col., 1989; Kimura y col., 1990; Ogi y col., 1990) es discutible la validez de la inmunotinción, ya que en los anfibios existe escasa o ninguna información sobre la secuencia de los péptidos analizados en este trabajo de tesis, exceptuando a la VP. La estructura primaria de los precursores de VT y MT ha sido deducida de la secuencia de nucleótidos del ADN "copy" del diencéfalo del sapo *Bufo japonicus* (Nojiri y col., 1987). Los precursores de VT y MT son estructuralmente similares a los precursores de sus contrapartidas VP y OXY en mamíferos. Los estudios que describen la distribución de VP en el cerebro de varios anfibios (Jokura y Urano, 1985; Zooller y Moore, 1986; Carr y Norris, 1990) utilizando anticuerpos generados contra antígenos de mamíferos reflejan fielmente las distribuciones descritas para reptiles, aves y mamíferos (Stoll y Voorn, 1985; Panzica y col., 1986; Buijs, 1987) y la encontrada por nosotros en el sapo *Bufo arenarum*. Además cuando consideramos a los otros péptidos aquí estudiados, nuestros resultados están fuertemente avalados por diferentes trabajos que, con el uso de distintos antisueros estudian las distribuciones de estas moléculas neuroactivas en el SNC de otras especies de anfibios (Andersen y col., 1993).

Se conoce la estructura primaria de GAL en algunos vertebrados no mamíferos como el pollo (Norberg y col., 1991), el caimán (Wang y Conlon, 1994b), la salamandra (Anglade y col., 1994) y en peces (Wang y Conlon, 1994a). Recientemente se ha secuenciado la GAL en la *Rana ridibunda* (Chartrel y col., 1995). Los datos muestran que la secuencia aminoacídica completa de la GAL ha sido altamente conservada. En el cuadro siguiente se puede observar que la GAL de rana sólo difiere de la porcina en dos aminoácidos en la región C-terminal de la molécula. Los anticuerpos anti GAL utilizados en este trabajo de tesis fueron generados contra GAL porcina, específicamente contra la región NH<sub>2</sub> terminal, que es idéntica en todas las especies estudiadas hasta el momento.

Estructura primaria de la GAL	
Porcina	GWTLN-SAGYL-LGPHA-IDNHR-SFHDK-YGLA
Pollo	_____V_____N—H—FT
Caimán	_____NE—H—I—
Rana	_____N—H—
Salamandra	_____G—G—TLS—H—
Pez	_____V—LN—H—
Rata	_____S—H—T
Bovina	_____L—S—Q—H—

Con respecto a los experimentos de transporte axonal retrógrado es preciso señalar que se utilizaron dos trazadores diferentes con los que se hicieron pruebas a distintas concentraciones y en distintos períodos de sobrevida, no obteniéndose en ningún caso resultados óptimos. Esto podría deberse a problemas técnicos, sin embargo existen

estudios que postulan que el mecanismo intracelular involucrado en el transporte de sustancias sería diferente en anfibios comparado con el de los mamíferos (Antal y Petkó, 1990).

## **5.2. Sistema Galaninérgico en el Sapo**

El presente estudio muestra la amplia distribución de sistemas neuronales y de fibras inmunorreactivos a GAL en el SNC del sapo. Nuestras observaciones confirman estudios previos realizados en otras especies (Lázár y col., 1991; Olivereau y Olivereau, 1992), pero principalmente amplian los datos hacia varias áreas nuevas del cerebro de anfibios donde no se había detectado GAL anteriormente, tales como las células del NAS, Mgv, TP y las neuronas de la sustancia gris intermedia y motoneuronas de la médula espinal, así como fibras ubicadas en la paráfisis y en el plexo coroideo. Además, nosotros observamos que frecuentemente las distribuciones detectadas de inmunoreactividad a GAL conformaban pobremente los límites de núcleos bien establecidos, lo cual fue descrito para otros muchos péptidos en mamíferos (Ljundahl y col., 1978; Johansson y col., 1984; Melander y col., 1985) y anfibios (Andersen y col., 1993).

Contrariamente a nuestros resultados, no se han descrito neuronas ir-GAL en el NAS de otros anfibios. El hecho de que las neuronas inmunoteñidas en el NAS fueran morfológicamente similares y aparecieran como parte de un mismo grupo con las observadas en el estriado, podría ser una razón por la cual otros autores podrían haberlas considerado dentro de esta última área y no como pertenecientes a dos regiones diferentes. Es necesario señalar que las neuronas ir-GAL han sido identificadas en el Stv y

en el estriado dorsal (Std) de *Amblystoma sp.* y *Xenopus sp.* (Olivereau y Olivereau, 1992) así como de *Triturus carnifex* (Mulatero y col., 1991). Sin embargo no fueron detectadas en *Rana sp.* y *Xenopus sp.* en este área (Wolfbauer y Skofitsch, 1989; Lázár y col., 1991), ni en *Bufo sp.*, o en *Pleurodeles sp.* (Olivereau y Olivereau, 1992). Estas discrepancias podrían explicarse por diferencias interespecíficas.

En coincidencia con Lázár y colaboradores (1991), fueron observadas algunas células con morfología heterogénea rodeando la AC, restringidas a la amígdala medial (Am). Caudalmente estas células sobrepasan los límites de la Am y se unen al grupo de células inmunorreactivas del NPO. De hecho, no se observaron diferencias en las neuronas ir-GAL que permitieran distinguir estas dos áreas.

Las mayores densidades de inmunorreacción a GAL fueron detectadas en el NPO, Sc y en el VH lo cual coincide con datos previos en anfibios tales como en la *Rana sp.* (Lázár y col., 1991) y en *Xenopus sp.* (Lázár y col., 1991; Olivereau y Olivereau, 1992).

El NPO es un núcleo secretor, que contiene varios péptidos regulatorios en anfibios (Andersen y col., 1993). En otro estudio (Olivereau y Olivereau, 1992) sólo fueron vistas ocasionalmente neuronas ir-GAL en este área. En cambio, en nuestros experimentos observamos una inmunotinción evidente a través de toda la extensión rostrocaudal del NPO, en forma de neuronas de tamaño pequeño y mediano. Además, caudalmente dentro del área preóptica posterior, algunas neuronas magnocelulares exhibían inmunotinción a GAL. Es interesante señalar que neuronas magnocelulares fueron descritas proyectando hacia la neurohipófisis en esta misma especie por medio de transporte axonal retrógrado de peroxidasa (Pasquier y col., 1980). Esto ha sido corroborado por nosotros mediante los

estudios con trazadores como el Dil y el Fluorogold. Por lo tanto, es posible que estas células constituyan el origen de las fibras ir-GAL observadas en el lóbulo neural de la hipófisis. En experimentos paralelos, en los que se estudiaron cerebros de sapos hipofisectomizados, se vio que las células ir-GAL en la región magnocelular, aumentaban significativamente en intensidad y en número (ver más adelante). Estos resultados son coincidentes con experimentos hechos en la rata (Villar y col., 1990) y muestran que muchas células dentro del núcleo magnocelular poseen la capacidad para sintetizar GAL. Para ampliar más los datos obtenidos por inmunohistoquímica, surge la necesidad de realizar experimentos de hibridación *in situ*, para lo que previamente se precisa que la GAL sea clonada en los anfibios y así esté disponible la sonda de ADN "copy" de este péptido.

En el Sc, en el VH y en el infundíbulo fueron detectadas altas densidades de fibras y células positivas a GAL, la mayoría de las cuales se distribuía uniformemente en la zona periventricular. Algunos estudios señalan que en los anfibios estas neuronas proyectan sus fibras hacia la EM y la hipófisis y son capaces de regular su función, lo que sugiere que el sistema galaninérgico está directa o indirectamente involucrado en funciones hipofisarias. En el VH y en el infundíbulo muchas de ellas emitían prolongaciones que contactaban con el FCS, lo que sugiere que además de estar involucradas en una regulación endócrina también lo estarían en procesos secretores intraventriculares. De hecho la presencia de células positivas a la GAL contactando con el receso infundibular, sugiere firmemente que en los anfibios la GAL podría ser liberada dentro del ventrículo y transportada por el FCS a otras regiones cerebrales. A este respecto, es interesante mencionar que los estudios bioquímicos realizados en humanos muestran datos que indican que existe una concentración substancial de GAL en el líquido cefalorraquídeo (Berrettini y col., 1988) y hay creciente evidencia que sugiere que los efectos endócrinos producidos por la GAL

dependen de su transporte a través del FCS (Shimatsu y col., 1991; Tanoh y col., 1991; Promanik y Ögren, 1992; Bartfai y col., 1993).

El marcado substancial de las neuronas ir-GAL que se observó en el TP es bastante llamativo, ya que no ha sido descrito en otros anfibios, y no presenta correlación alguna con la distribución descrita para la GAL en mamíferos (Rökæus y col., 1984; Ch'ng y col., 1985; Skofitsch y Jacobowitz, 1985; Melander y col., 1985, 1986a, 1986b; Beal y col., 1988; Gentleman y col., 1989; Köhler y col., 1989; Michener y col., 1990; Walker y col., 1991). Neary y Northcutt (1983), en un completo estudio sobre la organización nuclear del diencefalo de la rana sugieren que el TP constituye un área nuclear independiente, que no pertenece al tálamo ni al hipotálamo. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el TP podría estar compuesto por dos divisiones: una dorsal y otra ventral. La parte ventral correspondería al núcleo arcuato de los mamíferos, donde se han identificado neuronas ir-GAL (Eventt y col., 1986) y por lo tanto constituiría parte del hipotálamo. La parte dorsal del TP, que no presenta inmunotinción positiva a la GAL, podría formar una región nuclear por si misma o pertenecer al tálamo, como fue descrito anteriormente (Aronson y Noble, 1945). Para corroborar si esta división del TP es correcta debería realizarse una correlación entre las observaciones histoquímicas y las técnicas de transporte axonal.

La presencia de una importante población de fibras conteniendo GAL en el plexo coroideo y en la paráfisis del sapo, no descritos anteriormente, sugieren que estos procesos podrían estar regulando mecanismos secretores a ese nivel. Otra posibilidad ya discutida podría ser la liberación de GAL en el ventrículo.

La GAL es un modulador central en funciones cerebrales extrahipotalámicas. La observación de neuronas y fibras positivas a GAL en el tronco encefálico, particularmente en el NS y en el NG, guarda concordancia con los datos ya publicados en otros anfibios (Lázár y col., 1991; Olivereau y Olivereau, 1992) y sugiere que la misma podría estar involucrada tanto en el control de la actividad visceral como en funciones somatosensoriales.

En la sustancia intermedia de la médula espinal y coincidentemente con observaciones hechas en la rata (Ju y col., 1987a), hemos observado células ir-GAL en la región que rodea al conducto ependimario. Estas células podrían contribuir al tracto espinotalámico, que es un camino somatosensorial involucrado principalmente en la percepción del dolor. Además de las células del tracto espinotalámico, se encontraron motoneuronas con una inmunotinción pálida dentro del asta ventral de la médula espinal. La GAL fue previamente identificada en motoneuronas de la columna espinal en una gran variedad de especies de mamíferos durante su desarrollo; pero en ningún caso fue encontrada en especímenes adultos (Marti y col., 1987). Por lo tanto, la presencia de motoneuronas con GAL en sapos adultos posibilita el uso de este animal como modelo para el análisis del rol funcional de la GAL en este nivel del SNC.

### **5.3. Comparación con el Sistema Galaninérgico de la Rata**

En el cerebro de la rata, las células ir-GAL son casi indetectables si no se trata previamente al animal con una inyección intraventricular de colchicina (Ch'ng y col., 1984; Rökaeus y col., 1984; Skofitsch y Jacobowitz, 1985; Melander y col., 1986a); mientras que

en el cerebro del sapo las células ir-GAL son perfectamente identificables sin tratamiento previo.

Se encontraron numerosas células positivas a GAL en la amígdala y área preóptica tanto en anuros como en mamíferos. Sin embargo, algunos núcleos telencefálicos que contienen células ir-GAL en mamíferos no parecen contener células marcadas en anuros; por ejemplo, el NMS de la rata contiene células, fibras nerviosas y terminales positivas (Ch'ng y col., 1984; Rökaeus y col., 1984; Skofitsch y Jacobowitz, 1985; Melander y col., 1986a), mientras que sólo se detectaron fibras y terminales marcadas en el NMS de anuros (Wolfbauer y Skofitsch, 1989; Lázár y col., 1991; Olivereau y Olivereau, 1992; González Nicolini y col., 1995).

El mayor número de células ir-GAL se encontró tanto en el hipotálamo de anuros como en el de mamíferos. Numerosas células marcadas fueron detectadas en el hipotálamo, en las regiones periventricular e infundibular en ambos órdenes de vertebrados. Las diferencias más significativas observadas en anuros son: la ausencia de células positivas en el tálamo y la presencia de gran cantidad de células galaninérgicas en el Sc.

Se hallaron numerosas células positivas a GAL en el NS tanto en anuros como en roedores. El NS, la sustancia gris y la médula caudal dorsolateral contienen redes de fibras inmunoteñidas con GAL en ambos órdenes de vertebrados. La similitud en la distribución de células y terminales nerviosas conteniendo GAL entre representantes de dos grupos tan distantes filogenéticamente como mamíferos y anuros sugiere que algunos caminos galaninérgicos han sido conservados por más de 350 millones de años.



#### 5.4. Galanina e Hipofisectomía

Los trabajos previos realizados con técnicas de inmunohistoquímica en rata describen el efecto del aumento de GAL (tanto del péptido como del ARNm) luego de la hipofisectomía (Cortés y col., 1990a; Villar y col., 1990, 1994b; Selvais y col., 1993). El cambio observado fue relacionado con procesos de injuria y subsiguiente recuperación y regeneración de los axones de las neuronas en estudio (Villar y col., 1990, 1994b). Un mecanismo similar podría estar controlando los cambios en los niveles de GAL observados en el cerebro del sapo; sin embargo, nuestros resultados indican que la expresión de GAL en el hipotálamo podría estar regulada por dos mecanismos diferentes considerando dos poblaciones neuronales distintas: las neuronas magnocelulares y las células del NPO.

##### 5.4.1. *Neuronas Magnocelulares.*

Los resultados presentados en este trabajo muestran que en el sapo la expresión de GAL en las neuronas de la región magnocelular hipotalámica varía después de una lesión de las fibras que proyectan hacia el lóbulo neural de la hipófisis. Esta lesión induciría un aumento en el número de células inmunoteñidas con GAL, que alcanza un pico luego de tres días de sobrevida, a partir del cual sigue una disminución progresiva de la expresión de GAL hasta alcanzar los valores normales. Estos resultados se asemejan a los previamente descritos en la rata (Villar y col., 1990). Sin embargo, en el sapo el período de tiempo en que se observó el cambio de expresión de GAL fue más corto, ya que a los siete días el número de células positivas era comparable al de los animales control. Los cambios observados en los sapos, en la expresión de inmunorreactividad a GAL, podrían estar relacionados con procesos de degeneración y subsecuente regeneración que ocurren

luego de la hipofisectomía, como ha sido demostrado anteriormente en la rata (Villar y col., 1990, 1994b). Se sabe que los mismos son muy activos en el sistema neurosecretor (Stutinsky, 1955; Dellmann y col., 1987; Dellmann y Canthers, 1992; Villar y col., 1994b). En el sapo los trasplantes de hipófisis no revierten el aumento en la inmunotinción a GAL, sugiriendo que en este sistema neuronal neurosecretor la expresión de GAL no depende de una regulación hormonal. Esto estaría de acuerdo con estudios previos hechos en ratas (Selvais y col., 1994).

Mediante técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* se ha demostrado que la GAL y su ARNm, así como otros neuropéptidos, son regulados negativamente por el factor de crecimiento nervioso (NGF) en neuronas sensitivas primarias de animales que fueron sometidos al corte de su nervio ciático (Verge y col., 1995). No se sabe si en el sistema magnocelular la GAL está regulada por el NGF o por otros factores tróficos y tampoco es claro el significado de la momentánea acumulación de GAL en las neuronas magnocelulares hipotalámicas cuyos axones fueron seccionados, aunque se presume que podría existir una relación entre estos factores, participando todos ellos en procesos y mecanismos que involucran acciones tróficas. Por otro lado, Ji y colaboradores (1995) mostraron que la inflamación periférica unilateral inducida por una inyección de carragenina en el muslo de la rata produce un aumento en la expresión de GAL y de su ARNm en el asta dorsal ipsilateral. Además, se observaron células del sistema inmune que expresaban GAL infiltrando la dermis y la epidermis. Todo esto sugiere que la GAL estaría involucrada central y periféricamente en la respuesta a la inflamación y a la percepción del dolor. Tal vez la GAL cumple un rol similar en las neuronas magnocelulares lesionadas; lo que requiere una investigación más exhaustiva.

#### 5.4.2. Células del NPO.

Por otro lado, los resultados obtenidos también muestran que luego de la hipofisectomía y de la extirpación de la pars distalis el número de células que expresan GAL en el NPO aumenta al doble cuando se lo compara con el de los animales control; por lo tanto es probable que la falta de hormonas hipofisarias aumente significativamente los niveles de expresión de GAL, así como el número de neuronas conteniendo el péptido en este sistema neuronal. El hecho de que la terapia de reemplazo con GH prevenga ese aumento, sumado a la determinación sérica de GH que señala un paralelismo entre los niveles de esta hormona y la expresión de GAL en las células del NPO, apoyan la idea de que la GAL en el NPO está regulada por hormonas pituitarias, en particular por GH. También existe la posibilidad de que otras hormonas hipofisarias contribuyan en la regulación.

Ha sido bien establecido en estudios previos en ratas (Ottlecz y col., 1988; Hooi y col., 1990) que la GAL actúa como un miembro importante de la familia de hormonas peptídicas hipotalámicas-hipofisarias. Los mismos muestran que terminales galaninérgicos están funcionalmente ligados a los capilares portales en la EM (López y col., 1990; Arai y Callas, 1991; López y col., 1991). Además, hay muchos estudios que muestran que la GAL modula la secreción de hormonas de la pituitaria anterior (Bauer y col., 1986c; Murakami y col., 1987; Gabriel y col., 1988; Ottlecz y col., 1988; Hooi y col., 1990; Koshiyama y col., 1990; López y Negro-Vilar, 1990; Maiter y col., 1990; López y col., 1991; Tanoh y col., 1991; Arvat y col., 1995) apoyando esto la probable existencia de un posible mecanismo de retroalimentación sobre la expresión de GAL por las hormonas pituitarias. Existen algunos ejemplos de hormonas que regulan la expresión de péptidos hipotalámicos; por ejemplo, se

ha demostrado que los esteroides ejercen una regulación positiva sobre el NPY (Sahu y col., 1992), y también se ha demostrado que la corticosterona regula negativamente la expresión de GAL en animales adrenalectomizados (Hedlund y col., 1994). En la rata, la reducción de la inmunotinción de GAL en las capas externas de la EM descrita luego de la hipofisectomía (Selvais y col., 1993) fue revertida por un reemplazo hormonal con una combinación de tiroxina, GH, cortisol y  $\beta$ -estradiol (Selvais y col., 1994); todo esto da más evidencias que apoyan una regulación hormonal sobre la expresión de péptidos en el hipotálamo.

Es interesante señalar que, la GAL causa un aumento en la liberación de GH en el hombre luego de la infusión intravenosa (Bauer y col., 1986c; Davis y col., 1987; Loche y col., 1989; Hulting y col., 1991). Diversas líneas de evidencia como el bloqueo colinérgico de la estimulación de GAL sobre la secreción de GH en el hombre (Maiter y col., 1990), sugieren que la estimulación galaninérgica sobre la liberación de GH involucra a la hormona liberadora de GH (GHRH) y otros mecanismos hipotalámicos indirectos (Murakami y col., 1987). En forma alternativa y como existe una densidad importante de terminales nerviosos galaninérgicos en la EM (Melander y col., 1986a; López y col., 1991), la GAL podría ser liberada en la circulación portal (López y col., 1990), actuando directamente a nivel de la hipófisis. Al margen del mecanismo por el cual la GAL controla la liberación de GH, está bien establecido que lo hace estimulando su secreción (Arvat y col., 1995; deGliberti y col., 1995). Asumiendo la posibilidad de que la GAL también controle la secreción de GH en el sapo nuestros resultados indicarían la existencia de un posible control inhibitorio tónico de GH sobre GAL en las neuronas del NPO, como si se tratara de un mecanismo de retroalimentación negativo.

## 5.5. Disturbios en el Balance Hidromineral

Los resultados correspondientes a los experimentos de disturbios en la homeostasis hidromineral demuestran que frente a estímulos osmóticos existe una respuesta de una variedad de sustancias neuroactivas en las neuronas del núcleo magnocelular del sapo. Se puede observar que estas células poseen la capacidad para modificar la expresión de algunas moléculas ante la estimulación osmótica, afectando así potencialmente los componentes neuroendócrino, autonómico y comportamental de la respuesta del animal ante tales disturbios.

Brevemente, observamos que en respuesta al estímulo osmótico, las neuronas magnocelulares neurosecretoras pueden variar la expresión de cuatro moléculas: VP, TH, CCK y NOS. Cuando se comparan los cambios que surgen de los diferentes estímulos, los resultados enfatizan la flexibilidad en la respuesta de estas neuronas a las diversas demandas homeostáticas.

Para facilitar la interpretación de los cambios observados en cada sustancia, estos serán discutidos en detalle.

### 5.5.1. Vasopresina

La estimulación osmótica resulta en una marcada disminución de los niveles de VP así como de los de OXY en el lóbulo neural de la rata (Jones y Pickering, 1969; Dogterom y col., 1977), y en un aumento de las concentraciones plasmáticas de estas hormonas (Balment y col., 1980; Zerbe y Palkovits, 1984). Nuestros resultados muestran que también

disminuyen los niveles de VP dentro del núcleo magnocelular del sapo, confirmando estudios previos en otros anfibios (Zoeller y Moore, 1988) y también en la rata, en la que prácticamente desaparece la inmunomarcación de VP y OXY en los núcleos supraóptico y paraventricular (Meister y col., 1990b). Estos cambios mencionados son consistentes con la necesidad de una tasa de secreción de VP aumentada bajo condiciones de stress hídrico y poseen importantes implicaciones fisiológicas para mantener el balance de los líquidos del organismo.

Es interesante que algunas células del Mgv exhiben una fuerte inmunotinción para VP luego de la sobrecarga salina y de la deshidratación; probablemente pertenezcan al grupo de neuronas vasopresinérgicas que proyectan exclusivamente al tronco encefálico y a la médula espinal, que han sido descritas tanto en mamíferos (Swanson, 1977; Buijs y col., 1978; Nilaver y col., 1980; Swanson y Hartman, 1980; Sofroniew y Schrell, 1981), como en anfibios (Zoeller y Moore, 1986). Esta hipótesis podría confirmarse mediante experimentos combinados de inmunohistoquímica y transporte axonal retrógrado.

#### *5.5.2. Tirosina Hidroxilasa*

Nuestros resultados confirman la presencia de TH en neuronas magnocelulares (Schimchowitsch y col., 1981; Swanson y col., 1981; Chan-Palay y col., 1984; Hökfelt y col., 1984b; Van den Pol y col., 1984; Spencer y col., 1985; Hornby y Piekut, 1987; Kitahama y col., 1987). El aumento en la expresión de TH observado en el hipotálamo del sapo luego de la sobrecarga salina parece corresponder a las neuronas magnocelulares vasopresinérgicas. Estos datos coinciden con resultados anteriores que muestran un aumento en las cantidades de TH y de mRNA de TH en los núcleos paraventricular y

supraóptico de la rata luego de una estimulación osmótica (Young y col., 1987b; Meister y col., 1990a). Cuando estos datos se consideran junto con la disminución observada en la expresión de TH en los animales con sobrecarga de volumen (VL), estos cambios opuestos podrían representar un mecanismo por medio del cual el núcleo magnocelular adapta su respuesta a una estimulación osmótica variable.

A pesar de que la inmunorreactividad para TH está presente en grandes cantidades en las neuronas magnocelulares luego de la sobrecarga salina es posible que la enzima nunca sea transportada hasta los terminales nerviosos del lóbulo neural, por lo menos no en niveles detectables. Esto está apoyado por el descubrimiento de que las ratas con sobrecarga salina, presentan un aumento de la inmunorreactividad a TH en los cuerpos celulares de los núcleos supraóptico y paraventricular, sin un correspondiente aumento de la inmunotinción para TH en los terminales nerviosos del lóbulo neural (Meister y col., 1990a).

Por medio de técnicas de histofluorescencia con formaldehído ha sido establecido que existen fibras que contienen dopamina en el lóbulo intermedio de la hipófisis (Baumgarten y col., 1972). También se han encontrado niveles altos de dopamina en el lóbulo neural de ratas normales (Saavedra y col., 1975). En el sapo la inmunorreactividad para dopamina presenta una distribución casi idéntica a la descrita para la TH (González y col., 1993). Se vio que la deshidratación aumenta selectivamente la concentración de dopamina en el lóbulo neural de la rata (Alper y col., 1980; Racke y col., 1986). El rol de la dopamina en relación a VP no ha sido ampliamente analizado. Algunas observaciones indican que los pituicitos de la neurohipófisis serían el blanco de la dopamina (Meister y col., 1989b). Se ha demostrado que existen niveles detectables de dopamina y de una

fosfoproteína regulada por AMP cíclico (DARF-32, mensajero intracelular de dopamina) en los pituicitos del lóbulo neural y también se encontró una variación en la expresión de esta fosfoproteína luego de la sobrecarga salina (Meister y col., 1989b). También se involucra a los pituicitos en la regulación de la liberación de VP y OXY (Hatton y col., 1984).

Por otro lado, la disminución en la expresión de TH que se ve en los sapos deshidratados por tres días no concuerda con las reacciones descritas para los animales con sobrecarga salina y su significado funcional representa para nosotros un gran interrogante. Sin embargo no es posible descartar una regulación diferencial en estos animales. Se ha demostrado que el ARNm de ENK y de VIP/PHI no puede detectarse en ratas deshidratadas, pero si en animales sometidos a sobrecarga salina (Watts, 1992).

### 5.5.3. Colecistoquinina

Varios estudios apoyan la existencia de una función hipofisotropa para CCK, particularmente relacionada con la secreción de ACTH en la rata (Anhut y col., 1983; Mezey y col., 1986). Sherman y colaboradores (1988) usando análisis de "Northern blot" mostraron que la estimulación osmótica aumenta el contenido de ARNm de CCK en el sector parvicelular pero no en el supraóptico. Sin embargo, estudios recientes (Meister y col., 1990a; Watts, 1992) que usaron inmunocitoquímica e hibridación *in situ* demostraron que la sobrecarga salina y la deshidratación aumentan tanto la inmunorreactividad como el ARNm de CCK, tanto en el sector supraóptico como en el parvicelular de la rata. Además, otro trabajo describe un aumento preferencial de inmunorreactividad a CCK en neuronas magnocelulares en el núcleo paraventricular de la rata luego de la sobrecarga salina (Meister y col., 1990a). Nuestros resultados concuerdan con estos trabajos, ya que



observamos un aumento de inmunorreactividad para CCK en neuronas pequeñas y grandes en el núcleo magnocelular hipotalámico del sapo luego de la deshidratación y la sobrecarga salina. Las mismas serían análogas a las parvicelulares y magnocelulares respectivamente de la rata.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, la estimulación osmótica llevaría a un aumento de CCK en ambos tipos de neuronas magnocelulares, las que proyectan al lóbulo neural y las que inervan la EM (ver más adelante transporte axonal retrógrado). Esto sugiere que la CCK juega un rol importante en la modulación de la actividad hipotálamo-hipofisaria durante el desbalance osmótico en el sapo. Estudios en la rata han demostrado que la CCK induce la secreción tanto de VP como de OXY desde el lóbulo neural (Bondy y col., 1989a, b); lo cual está apoyado por la existencia de sitios de unión de alta afinidad para CCK en la neurohipófisis (Bondy y col., 1989b). Por otro lado, la sobrecarga salina induce un aumento del número de sitios de unión para CCK en el núcleo supraóptico y paraventricular de la rata (Day y col., 1989).

#### *5.5.4. Sintetasa de óxido nítrico*

Previamente se describió la existencia de células ir-NOS grandes, débilmente teñidas y en poca cantidad en el Mgd del sapo, siendo todavía más escasas en el Mgv (Suburo y col., 1996). Nuestros resultados indicarían que si bien en la región magnocelular la expresión de inmunorreactividad de NOS es baja, la misma es fuertemente modulada por estímulos relacionados con el desequilibrio hidroelectrolítico.

De acuerdo con resultados previos donde se muestra aumento de la actividad de la NADPH-diaforasa (Pow, 1992) y de la inmunoreactividad de NOS y del ARNm de NOS (Villar y col., 1994a) en el núcleo supraóptico de la rata luego de la deshidratación y la sobrecarga salina, nosotros encontramos que en el núcleo magnocelular del sapo también se produce un aumento del número de células inmunomarcadas para NOS frente a estos estímulos. Sin embargo, en los animales con sobrecarga de volumen, en los que no existe un estímulo hiperosmótico, las células responden de la misma manera. Teniendo esto en consideración y dado que el ARNm de NOS aumenta en neuronas magnocelulares de la rata cuando son sometidas a stress por inmovilización (Calzà y col., 1993), se podría especular que más que una respuesta específica a un estímulo hiperosmótico, el aumento de ir-NOS en el núcleo magnocelular del sapo respondería a un componente de tipo "stress" provocado por los tratamientos que alteran la homeostasis hidromineral. Por otra parte, la expresión de la NOS varía también en experimentos de lesión, de modo que no se puede descartar que sean los tratamientos traumáticos los que induzcan cambios en la expresión de esta enzima como respuesta a una noxa al sistema.

#### 5.5.5. *Galanina*

La GAL se encuentra en muchas áreas del SNC, incluyendo las neuronas hipotalámicas magnocelulares neurosecretoras en mamíferos (Rökæus y col., 1984; Ch'ng y col., 1985; Skofitsch y Jacobowitz, 1985; Melander y col., 1986a; Palkovits y col., 1987) y anfibios (González Nicolini y col., 1995). En la rata, la inmunoreactividad a GAL se encuentra principalmente en las células vasopresinérgicas (Brownstein y Mezey, 1986; Melander y col., 1986b; Rökæus y col., 1988b; Skofitsch y col., 1989; Planas y col., 1995). Sin embargo, en un número pequeño de cuerpos celulares dentro del núcleo supraóptico y

paraventricular, la GAL fue detectada co-existiendo con OXY (Gaymann y Martin, 1989). Existe una marcada disminución de neuronas magnocelulares ir-GAL luego de la sobrecarga salina; probablemente relacionada a una rápida exportación del péptido desde los somas celulares y a un aumento en la liberación de GAL desde el lóbulo neural. De acuerdo con ésto se observa un aumento del ARNm de GAL en los cuerpos celulares del núcleo supraóptico y paraventricular en la rata (Meister y col., 1989a). Sin embargo, en otro estudio Skofitsch y colaboradores (1989) no detectaron cambios en los niveles de GAL hipotalámica luego de la sobrecarga salina; en este caso se utilizó un protocolo diferente que incluía privación de agua por cuatro días antes de la sobrecarga salina.

Nosotros no detectamos cambios en la inmunorreactividad a GAL en los animales experimentales estudiados. Esto puede deberse a que: i) realmente los tratamientos no influyen en la expresión del péptido y la GAL no participa en la homeostasis hidromineral en el sapo, ii) el protocolo considerado como estímulo específico no sea el adecuado para provocar cambios visualizables por inmunohistoquímica (lo cual no sería tan probable, ya que los mismos estímulos son capaces de afectar la expresión de otros péptidos) y/o iii) que debido a las condiciones experimentales utilizadas, el procesamiento del precursor del péptido cambie marcadamente y por lo tanto resulte en fragmentos no reconocidos por el antisuero, como ya ha sido descrito previamente para GAL en otro estudio (Gaymann y Martin, 1989).

## 5.6. Efecto de la Hibernación Inducida sobre Sustancias Neuroactivas Hipotalámicas

Los anfibios anuros (poiquilotermos) no pueden termorregular mediante mecanismos metabólicos (Stevens, 1973). Fueron denominados "homeotermos ectotérmicos" (Cowles, 1940; Bogert, 1949) porque logran una temperatura corporal un poco superior a la ambiental sólo por mecanismos comportamentales, ya sea orientaciones posturales o por moverse de un ambiente a otro (Lillywhite, 1970); también algunas variaciones en el flujo sanguíneo cutáneo estarían involucradas en la termorregulación (Spray y May, 1972; Spray y Belkin, 1973).

Como los anuros son ectotérmicos, ellos sufren aclimataciones térmicas estacionales en todo su cuerpo, por ejemplo aclimatan su sistema cardiovascular (Miller y Mizell, 1972) y aclimatan también elementos y circuitos neuronales (Miller y Dehlinger, 1969; Merickel y Kater, 1974). Los receptores de frío de los anuros se localizan en la epidermis (a diferencia de los receptores de dolor que se localizan en la dermis) (Chernetski, 1964; Fuxe y Nilsson, 1965), y responden tanto a la temperatura sostenida como a los cambios bruscos de temperatura con alteraciones características en la frecuencia del impulso nervioso. Las fibras receptoras de frío tienen un diámetro de 2-3  $\mu\text{m}$ . El rango de temperaturas por sobre el cual los receptores de frío son espontáneamente activos en distintas especies de anuros es 16-32° C para animales aclimatados a los 23° C aproximadamente, aunque existen pequeñas diferencias interespecíficas (Brattstrom, 1963; Lillywhite, 1970).

Los receptores de frío se aclimatan a bajas temperaturas (Spray, 1975a) incrementando su respuesta estática (la sensibilidad estática se define como la actividad

espontánea de un receptor de temperatura a una temperatura constante) y su respuesta dinámica (se define como la frecuencia del impulso que se obtiene por un cambio de temperatura). Ambos cambios en la respuesta dinámica y estática son similares a los cambios en la sensibilidad del receptor de frío cuando recibe estimulación simpática o cuando se le aplica agonistas adrenérgicos. Es decir que la sensibilidad térmica está marcadamente aumentada por la estimulación simpática, los agonistas adrenérgicos y la aclimatación al frío. En animales aclimatados al frío, la estimulación simpática no produce un mayor aumento de la respuesta y la aplicación tópica de adrenalina es poco efectiva en cuanto a aumentar la respuesta dinámica máxima. Esto puede explicarse en parte por las diferencias estacionales en los niveles de catecolaminas plasmáticas circulantes en anuros (Segura y D'Agostino, 1964; Donoso y Segura, 1965) y también por la aclimatación de algunos de los estados del proceso de transducción de la información (Spray, 1974, 1975a, b), como por ejemplo la contribución de la bomba electrogénica al potencial de reposo de las células receptoras (Merickel y Kater, 1974). Se sabe que en el mecanismo de transducción se deprime la actividad metabólica de la bomba Na/K ATPasa en las terminales nerviosas libres, lo que fue demostrado por la sensibilidad a la ouabaina y las variaciones que inducen las concentraciones externas de potasio, entre otras.

La temperatura ambiente es un factor externo significativo que afecta las respuestas fisiológicas. En la rata existen cambios rítmicos en las concentraciones de diferentes péptidos hipotalámicos expuestos a cambios estacionales en cuanto al fotoperíodo y a la temperatura (Bisette y col., 1995). Dentro de los climas templados, muchas especies de anuros hibernan bajo el agua, otras especies hibernan en la tierra soportando temperaturas cercanas a los 0° C (Storey, 1990). Además ha sido bien establecido que la mayoría de las ranas no se entierran en el barro, sino simplemente

descansan en la superficie (Cunjak, 1986; Penny, 1987). Esto facilita el intercambio gaseoso a través de su piel, el modo de respiración en el invierno (Holmes, 1934; Merrell, 1977). También se sabe que al margen de los cambios en las actividades endócrinas, la hibernación en los sapos se acompaña de la búsqueda de oscuridad. En el hipotálamo del sapo *Bufo japonicus* se ha encontrado que la hibernación, artificialmente inducida, disminuye la inmunomarcación para la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), la cual estaría relacionada con el control neural del comportamiento sexual (Jokura y Urano, 1985). Además, los títulos de andrógenos y estrógenos en el plasma del sapo se elevan dos veces al año, a fines del otoño cuando los animales entran en hibernación y en la primavera, en la temporada reproductiva (Inoue y col., 1982).

En este estudio nosotros encontramos que en el sapo la inmunorreactividad para GAL en el NPO y para NOS en la región magnocelular presentan una variación estacional. Se discutirán por separado las implicancias de la variación de cada sustancia neuroactiva dentro de su sistema neuronal. A diferencia de los experimentos anteriores de hipofisectomía y desequilibrio en la homeostasis hidromineral, nosotros suponemos que el tratamiento experimental de inducir la hibernación durante dos semanas entre 6-10° C no representa una situación extrema en el sentido de poder considerarla como una noxa que afecte cualquiera de los dos sistemas neuronales en estudio. Las condiciones de baja temperatura (pero no extrema) y de oscuridad impuestas al animal y la quietud adoptada por el mismo representan bastante fielmente la situación de los sapos durante el invierno.

### 5.6.1. Efecto de la hibernación inducida sobre la expresión de GAL en el NPO

La GAL está ampliamente distribuida en el SNC. En la rata, el núcleo paraventricular del hipotálamo tiene una inervación galaninérgica particularmente rica, y es un sitio primario para la acción estimuladora de la GAL sobre el comportamiento alimentario (Kyrkouli y col., 1986; 1990a, b; Tempel y col., 1988; Leibowitz, 1989; Crawley y col., 1990; Koenig y col., 1991; Leibowitz, 1991). Las inyecciones de GAL en el núcleo paraventricular producen un cambio en el metabolismo de las ratas hacia un estado de conservación de la energía caracterizado por una reducción en la termogénesis. Esto hace posible incluir a la GAL en la lista de neurotransmisores anabólicos del núcleo paraventricular, junto a la noradrenalina (NA) (Siviy y col., 1989) y al NPY (Menéndez y col., 1990). Estos agentes pueden ser a su vez subdivididos en agentes antitemogénicos (GAL y NA) e inductores de la deposición de grasa (NPY) (Menéndez y col., 1992). Otro estudio (Akabayashi y col., 1994), sugiere que existirían dos ritmos diurnos distintivos de expresión de GAL en el hipotálamo de la rata. Uno de ellos presenta un solo pico de expresión de GAL cerca de la mitad del ciclo nocturno de alimentación, específicamente entre la tercer y sexta hora. El mismo está inversamente relacionado con los niveles de insulina circulante, sugiriéndose una relación entre ellos, como ya ha sido descrito previamente (McDonald y col., 1985; Manabe y col., 1986; Silvestre y col., 1987; Rökaeus y col., 1988a).

Nuestros resultados indican que la inmunorreactividad a GAL varía estacionalmente. El aumento en el número de neuronas ir-GAL que se observa en los animales hibernantes se debe probablemente a la sensibilidad a los cambios ambientales. Estos resultados sugieren que la GAL estaría relacionada con el control neural del metabolismo energético en los anuros, además del control neuroendócrino de la pituitaria.

### *5.6.2. Efecto de la hibernación inducida sobre la expresión de NOS en la región magnocelular.*

De gran importancia para la función cerebral, es el hecho de que las neuronas que producen NO dentro de una red neuronal bien definida, poseen el potencial para controlar la microcirculación en el área. Este es un mecanismo por medio del cual la actividad cerebral local influencia la dinámica, también local, del flujo sanguíneo. Por lo tanto, regiones cerebrales o partes de las mismas con demandas metabólicas específicas pueden ajustar el suministro de oxígeno y de otros metabolitos esenciales para que satisfagan las demandas específicas de la actividad neural durante la realización de comportamientos bien definidos (Edvinsson y col., 1992; Dimagli y col., 1993; Iadecola, 1993).

El aumento en la densidad de células ir-NOS en el núcleo magnocelular luego de la hibernación inducida nos lleva a hipotetizar que la actividad de NO, dependiente de la hibernación, y su interacción con los efectores blanco conlleva implicancias funcionales relacionadas con el flujo capilar local en una forma necesidad-dependiente. Por otro lado, no es posible descartar que esté actuando a distancia, ya que se conoce su acción como mensajero retrógrado a distancia por su gran poder de difusión. No es probable que un componente de tipo "stress" esté relacionado con este aumento ya que se realizaron controles utilizando sapos que permanecieron dos semanas en frascos cerrados pero a temperatura ambiente en los meses de verano y primavera, no detectándose cambios en la expresión de NOS. Además, como ya se señaló, el tratamiento experimental no representa una situación tan extrema como para considerarlo una noxa que esté afectando al sistema. De hecho el experimento se llevó a cabo porque las diferencias encontradas podían



intuirse cuando se trabajaba con cerebros de animales provenientes de las distintas estaciones (invierno y verano).

### **5.7. Transporte Axonal Retrógrado**

En el presente estudio, el uso de Dil como trazador nos provee de una herramienta importante para investigar la organización del sistema hipofisotrofo del sapo *Bufo arenarum*, principalmente con el fin de determinar las proyecciones del NPO y del área magnocelular. Las desventajas que presenta esta técnica, así como otras técnicas experimentales de transporte axonal, es que uno nunca puede asegurar que todos los elementos neurales buscados sean positivamente marcados. Además, debido a la forma de aplicación del trazador no podemos discriminar entre las diferentes proyecciones a la hipófisis (pars distalis, intermedia y lóbulo neural).

El trazador Dil se transporta en forma retrógrada a los cuerpos celulares de las neuronas que inervan la zona de inyección, y si estas células son altamente ocupadas por el mismo, otras neuritas pueden marcarse transomáticamente; por lo tanto, se pueden detectar conexiones adicionales a las neuronas del sistema en estudio.

La identificación de los núcleos Mgv y Mgd como los mayores grupos celulares que componen el tracto hipotálamo-hipofisario en el cerebro del sapo *Bufo arenarum* concuerda con varios estudios previos en esta especie y en otros anfibios (Mautner, 1964; Zambrano y De Robertis, 1968; Rodríguez y col., 1970).

Ha habido intentos de homologar la región Mgd y Mgv del sapo con los núcleos paraventricular y supraóptico de los mamíferos respectivamente (Llinás y Precht, 1976). Sin embargo, esta comparación no halla sustento en nuestro estudio pues los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, aunque preliminares, indicarían que la región magnocelular proyecta directamente hacia la EM y al lóbulo neural con una distribución particular. Así, en el sapo existiría un predominio de células magnocelulares ventrales que dirigen sus axones hacia la EM, junto a numerosas células de menor tamaño y un predominio de neuronas magnocelulares dorsales que proyectan hacia la neurohipófisis. Estos resultados explicarían los cambios observados en la expresión de GAL en la región Mgd cuando es sometida a una lesión de su área de proyección.

Aún no hemos encontrado una relación anatómica que vincule las variaciones en los niveles de GAL en el NPO con las injurias efectuadas mediante este tipo de experimentos, lo cual corroboraría nuestros resultados sobre un control hormonal de GH sobre la expresión de GAL en este núcleo, descartando la posibilidad de que la variación en la expresión del péptido en las neuronas del área analizada se deba a la lesión de sus proyecciones. Es importante mencionar que aunque en ninguno de los casos estudiados encontramos en forma contundente neuronas del NPO marcadas en forma retrógrada con los trazadores utilizados, sí pudimos observar una marcación transomática substancial de fibras en el área con una disposición similar a las fibras ir-GAL ya descritas. También se observaron escasas células fluorescentes. Esta tinción probablemente esté indicando la existencia de conexiones indirectas entre estas fibras y células del NPO y la EM y/o el lóbulo neural.

## 5.8. Perspectivas

En la década del '70 se comenzó a apreciar la distribución desigual de péptidos en el SNC. Ellos son particularmente abundantes en ciertas áreas, tales como el asta dorsal de la médula espinal, el tronco encefálico y el hipotálamo. En el hipotálamo, los sistemas neurosecretores parvicelulares expresan las hormonas hipotalámicas liberadoras e inhibitoras (TRH, LHRH, somatostatina, CRH, GHRH) y muchos otros péptidos (Swanson y col., 1986; Cecatelli y col., 1989) y los sistemas magnocelulares producen OXY y VP, así como una gran variedad de pequeños péptidos (Brownstein y Mezey, 1986; Meister y col., 1990b). En el sistema nervioso autónomo se pueden encontrar péptidos en todas sus subdivisiones (Schultzberg y Lindh, 1988) y virtualmente todas las neuronas gastrointestinales han sido identificadas en base a su neurotransmisor y su péptido (Costa y col., 1986).

La neuroanatomía química de los péptidos se ha basado principalmente en la inmunohistoquímica, una técnica originalmente diseñada por Albert Coons y colaboradores en la década del '50 (Coons, 1958). Aunque la especificidad de la inmunohistoquímica ha sido cuestionada frecuentemente (Swaab y col., 1977), la validez de las descripciones de los patrones neuroquímicos hechas hasta el momento parece ser sorprendentemente correcta y las mismas coinciden con los estudios modernos que utilizan hibridación *in situ*. Por otro lado, la hibridación *in situ* ha originado un interrogante sobre la localización de la síntesis proteica al demostrar la existencia de ARNm de OXY en terminales nerviosos en el lóbulo neural (Jirikowski y col., 1990).

Las estimaciones aproximadas sobre el número de "péptidos transmisores" presentes en el cerebro se acercan a los cien (Snyder, 1980). En la década del '70 la mayoría de los nuevos péptidos fueron descubiertos extrayendo grandes cantidades de tejido intestinal, cerebral o hipofisario y luego monitoreando los pasos de la purificación mediante bioensayos. En la década del '80 se introdujo la técnica de clonado molecular, la cual llevó al descubrimiento del CGRP (Rosenfeld y col., 1983). En los primeros años de la década del '80 muchos otros péptidos fueron descubiertos con el uso de una nueva estrategia basada en la búsqueda de péptidos con el extremo C-terminal amidado (Tatemoto y Mutt, 1988). Los péptidos encontrados de esta forma fueron NPY, péptido doble tirosina (PYY), PHI y GAL. Dos nuevos péptidos fueron descubiertos en tejidos periféricos, el ANP en el corazón (de Bold y col., 1981) y la endotelina en los vasos sanguíneos (Yanagisawa y col., 1988), ambos presentaron sus equivalentes en el cerebro (Sudoh y col., 1988; Giaid y col., 1989; Shinmi y col., 1989). En 1986, Furchgott y Ignarro propusieron independientemente al NO como el factor de relajación derivado del endotelio, un mediador de la relajación en el músculo liso vascular inducido por alta cantidad de agonistas como la acetilcolina y la bradiquinina. A partir de ahí y durante la década del '90 se descubrieron diferentes roles del NO que lo postularon desde sólo una sustancia tóxica a un regulador fundamental en diferentes tejidos. El NO representa uno de los ejemplos biológicos donde los tejidos evolucionaron alcanzando la capacidad de sintetizar diferentes cantidades de la misma molécula para explotar sus efectos regulatorios o tóxicos derivados de sus propiedades químicas. Las acciones del NO sobre los vasos sanguíneos, las células inmunes y el sistema nervioso no sólo son de gran importancia para las ciencias médicas sino que abren una nueva era en la comunicación celular. Siendo una molécula difusible, el NO puede realizar fácilmente roles fisiológicos que no pueden ser hechos tan rápidamente por otros mensajeros celulares, como el rol de mensajero retrógrado en la neurotransmisión

sináptica. A pesar de todo lo estudiado durante estos años sobre las acciones del NO, aún existen por comprender una gran cantidad de implicancias biológicas sobre la síntesis del NO endógeno.

La existencia de receptores para péptidos en el SNC no fue evidente en un primer momento debido al hecho de que los péptidos normalmente co-existen con neurotransmisores clásicos y que teóricamente los sitios de "binding" de estos péptidos pueden localizarse en las mismas moléculas receptoras para esos transmisores clásicos. Por ejemplo, el ligando endógeno para el sitio de "binding" de la benzodiazepina localizado en el receptor del ácido gama amino butírico (GABA) es un péptido (Costa y col., 1983). Por lo tanto, fue un acontecimiento importante cuando los primeros receptores para péptidos, los receptores para SP y sustancia K (Masu y col., 1987; Yokota y col., 1989; Hershey y Krause, 1990; Kage y col., 1995) y para NT (Tanaka y col., 1990) fueron clonados. Se encontró que los mismos pertenecen a la familia de los receptores con siete dominios transmembrana acoplados a las proteínas G. Esto abrió la posibilidad de estudiar su localización (Elde y col., 1990) y su regulación y poder así correlacionarlas con las descripciones y los estudios funcionales de sus respectivos péptidos.

Las pequeñas moléculas transmisoras clásicas que incluyen acetilcolina, catecolaminas, serotonina y GABA co-existen en muchas áreas con diferentes péptidos (Cuello, 1982; Chan-Palay y Palay, 1984; Hökfelt y col., 1986). Los dos tipos de moléculas mensajeras (neurotransmisores clásicos y péptidos) tienen diferentes localizaciones sub-celulares (Lundberg y col., 1981; Fried y col., 1985; Matteoli y col., 1988). Las vesículas sinápticas pequeñas y claras que tienen aproximadamente 500 Å de diámetro contienen exclusivamente el neurotransmisor clásico. Las vesículas grandes contienen al péptido y

también al neurotransmisor clásico; por lo que los péptidos solo pueden ser liberados cuando se "activan" las vesículas grandes y densas. Existe evidencia que en los sistemas nerviosos central y periférico de vertebrados y también en invertebrados los potenciales de acción individuales descargados a baja frecuencia no liberan péptidos. Su liberación requiere una "explosión" o actividad de alta frecuencia (Edwards y col., 1982; Lundberg y col., 1982; Iverfeldt y col., 1989; Whim y Lloyd, 1989; Bean y Roth, 1991). El hecho de que la liberación de péptidos de los terminales nerviosos dependa de la frecuencia del impulso es importante, ya que como consecuencia de ello puede predecirse que a una frecuencia normal de "disparos" los péptidos no serán liberados en absoluto y por lo tanto los antagonistas no tendrán ningún efecto bajo estas circunstancias. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, donde por ejemplo encontramos aumento tanto en la intensidad de inmunomarcación como en el número de células que expresan distintos péptidos en situaciones extremas como injurias y desequilibrios prolongados en el balance hidromineral, donde es razonable suponer que: i) existe una frecuencia de impulsos nerviosos diferente a la basal (actividad de alta frecuencia) y ii) que los antagonistas respectivos si tendrán eficacia.

Entender la importancia de la co-existencia de péptidos con pequeñas moléculas transmisoras clásicas es una de las claves para comprender la función de los mismos (Iversen y Goodmann, 1986). A pesar de que en la mayoría de los sistemas neuronales los neurotransmisores clásicos parecen ser los mensajeros de mayor importancia, en algunos sistemas, por ejemplo en el sistema neurosecretor hipotalámico, los péptidos son los principales mensajeros. Existen muchos ejemplos en cuanto a la forma de interactuar de transmisores clásicos y neuropéptidos que co-existen, demostrándose efectos sinérgicos y antagónicos, pero principalmente con el péptido como mensajero auxiliar (Lundberg y col.,

1982). Por otro lado, también es posible la co-existencia de péptidos. Se ha demostrado cooperatividad entre los mensajeros CGRP y SP (Wiesenfeld-Hallin y col., 1984). Otro estudio señala que la GAL estimula la liberación de CCK de terminales nerviosos del lóbulo neurointermedio de la hipófisis, la cual co-existiría con otros neuropéptidos (Meister y col., 1993).

Nuevos datos sugieren que algunas neuronas además de contener una amina biógena y un péptido, contienen también un tercer neurotransmisor aminoácido excitatorio como glutamato. La inmunorreactividad para glutamato (Nicholas y col., 1990) y para la enzima que sintetiza glutamato (Kaneko y col., 1990) fue observada en neuronas catecolaminérgicas y serotoninérgicas de la médula espinal. Estas neuronas probablemente liberen de uno a tres neurotransmisores de acuerdo al tipo de señal, lenta moderada o rápida (Iversen y Goodman, 1986). En neuronas simpáticas periféricas existe una situación similar, donde el ATP representa el transmisor rápido que puede ser coliberado con NA y con el péptido NPY (Sneddon y Westfall, 1984; Kasakov y col., 1988). Más aún, en *Aplysia californica* dos péptidos producidos por la misma neurona pueden ser diferencialmente transportados a distintos terminales nerviosos (Sossin y col., 1990). Por otro lado, las neuronas pueden variar los tipos de péptidos que expresan. En la lombriz de tierra se identificó una neurona que expresa ENK durante la primavera y gastrina durante el otoño (Gesser y Larsson, 1985). En algunas neuronas del SNC de mamíferos los péptidos están regulados por hormonas esteroideas y por lo tanto los mismos varían durante el ciclo sexual (Simerly y Swanson, 1987; Micevych y col., 1988; Planas y col., 1994; Funston y col., 1995; Estupina y col., 1996). Todo esto muestra que la plasticidad relacionada con la transmisión peptidérgica no solo involucra la co-liberación de mensajeros a diferentes frecuencias del impulso nervioso; sino también la expresión diferencial de péptidos de

acuerdo a factores endógenos y exógenos variables y al desigual procesamiento y exportación de moléculas a diferentes terminales nerviosos, ocurriendo en grupos tan distantes como anélidos, anfibios y mamíferos.

La coexistencia puede ser de importancia clínica. Por ejemplo, se ha demostrado la existencia de ir-CCK en neuronas mesencefálicas dopaminérgicas en cerebros de pacientes esquizofrénicos con tratamiento neuroléptico (Schalling y col., 1990), pero no en cerebros humanos normales (Palacios y col., 1989; Schalling y col., 1990). Un segundo caso de interés clínico se debe a la existencia de ir-GAL en neuronas colinérgicas del cerebro anterior de varias especies (Melander y col., 1985; Melander y Stains, 1986; Chan-Palay, 1988a, b; Walker y col., 1989; Kordower y Mufson, 1990). Estas neuronas colinérgicas degeneran en la enfermedad de Alzheimer (Whitehouse y col., 1982). Como la enfermedad de Alzheimer involucraría una progresiva degeneración de las neuronas del cerebro anterior galanina/colinérgicas y un aumento compensador en la actividad neural de las neuronas no lesionadas, debería haber un aumento neto en la síntesis de GAL en estas células y en la liberación de GAL en el hipocampo, uno de los sitios donde estas neuronas proyectan. En forma interesante Chan-Palay (1988a, b) propuso que un efecto inhibitorio provocado por el aumento de la síntesis y liberación de la GAL sería el responsable de los síntomas de la enfermedad. Se ha demostrado que la inmunoreactividad a GAL y su ARNm aumentan en estas neuronas colinérgicas del cerebro anterior y en otras neuronas luego de diferentes tipos de lesiones (Cortés y col., 1990a, b). Como la GAL inhibe la liberación de glutamato inducida por anoxia (Ben-Ari, 1990), también serviría para contrarrestar los efectos neurotóxicos provocados por una liberación excesiva de glutamato.



En general, la respuesta originada por los transmisores clásicos es rápida y de corta duración, mientras que los péptidos inducen una respuesta más duradera. También existe evidencia que muestra que los péptidos no son liberados en las zonas activas de las hendiduras sinápticas sino por fuera de la unión sináptica (Golding y Bayraktaroglu, 1984; Thureson-Klein y Klein, 1990), difundiendo desde cortas hasta largas distancias. De hecho, se ha postulado que los péptidos pueden difundir grandes distancias a otras regiones cerebrales actuando como hormonas locales (Duggan y col., 1990; Fuxe y Agnati, 1991); por lo que muchas veces es difícil especular sobre el rol de determinados péptidos (más aún de aquellos que varían su expresión ante situaciones determinadas) en un circuito neuronal dado, ya que los mismos pueden estar actuando sobre otros sistemas neurales. De hecho, el gran aumento de inmunoreactividad a GAL y a NOS en el hipotálamo del sapo demostrado luego de inducida la hibernación podría estar relacionada con este tipo de comunicación a larga distancia.

La mayor parte del conocimiento sobre el rol de los neurotransmisores clásicos está basado en experimentos farmacológicos, especialmente con el uso de antagonistas de alta afinidad. Estudios semejantes pero en el campo de los neurotransmisores peptidérgicos, son en comparación mucho más escasos, por lo que una de las razones principales por las que se conoce tan poco el significado fisiológico de los péptidos ha sido la falta de drogas que puedan influenciar los eventos desencadenados por los péptidos en las sinapsis químicas. Se han tratado de desarrollar drogas con acciones agonistas y antagonistas para péptidos de dos tipos: peptídicas y no peptídicas. Las drogas peptídicas presentan desventajas tales como la alta biodegradabilidad (no pueden administrarse oralmente), el alto peso molecular (que implica una síntesis muy costosa) y la falta de capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Hoy en día existen disponibles cierta cantidad de

antagonistas de naturaleza peptídica que son estables y que pueden atravesar la barrera hematoencefálica, por ejemplo: antagonistas para SP (Folkers y col., 1982), para GAL (Bartfai y col., 1991; Kask y col., 1995) y para CCK (Wang y Schoenfeld, 1987; Hughes y col., 1990) entre otros.

El bloqueo de los receptores para CCK y las taquiquininas con este tipo de antagonistas provoca efectos comportamentales, lo cual sugiere un rol importante para la liberación endógena de estos péptidos. Así, el antagonista L-365,260 para el receptor CCK-B pospone la saciedad (Dourish y col., 1989) y el CI-988 es un potente ansiolítico en varios estudios animales (Hughes y col., 1990). Esto concuerda con observaciones realizadas con la administración de la pequeña molécula CCK-4, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y provocar ataques de pánico, tanto en pacientes con desórdenes mentales como en voluntarios sanos (Bradwejn y col., 1990; de Montigny, 1989). Ambos antagonistas L-365,260 y CI-988 aumentan el efecto analgésico de la morfina y previenen la tolerancia a la misma (Dourish y col., 1990; Wiesenfeld-Hallin y col., 1990; Xu y col., 1992). Por otro lado el antagonista CP-96,345 para el receptor de neuroquinina-1 produce analgesia térmica (Lecci y col., 1991). Estas observaciones nos señalan que los antagonistas que actúan sobre receptores de neuropéptidos surgen como drogas importantes, que actuarían preferentemente en sistemas desregulados, como ya se mencionó anteriormente. Además, el estudio de los receptores para péptidos y sus antagonistas ofrece un gran campo nuevo de desarrollo, en especial para la transferencia génica mediada por receptores que permite una transfección específica para un determinado tipo de célula. Este método utiliza complejos solubles que consisten en un ligando específico (agonista o antagonista) para el receptor buscado conjugado directamente a un poliacetilación (poli-lisina) que se unirá en forma no covalente al ácido

desoxirribonucleico (ADN) (Wu y col., 1989; Wagner y col., 1990). Estos complejos son capaces de producir transferencia génica tanto *in vitro* como *in vivo*.

Luego de varios años el NGF, el primer factor trófico descubierto (Levi-Montalcini, 1987), fue reconocido como miembro de una familia de péptidos que abarca el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) (Barde, 1989; Thoenen, 1991), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y el factor de crecimiento del fibroblasto (FGF). Los factores neurotróficos regulan la formación y el mantenimiento de las conexiones neuronales (Twiss y Shooter, 1995). La neurotrofina 5 (NT-5) es un miembro de la familia del NGF, que actúa activando receptores de la familia tirosin-kinasa (trk) y se vio que promueve la supervivencia de neuronas periféricas y simpáticas (Berkemeier y col., 1991). También se demostró que la NT-5 aumenta la supervivencia y el crecimiento de células de la sustancia nigra en cultivo. Es muy probable que ocurran muchas interacciones entre los factores tróficos y los neuropéptidos como ha sido demostrado con el NGF, que no solo estimula a la SP en el ganglio de la raíz dorsal (Kessler y Black, 1980) sino que también previene la disminución de los niveles de SP en neuronas con sus proyecciones lesionadas (Fitzgerald y col., 1985) y como ya se discutió regula negativamente el aumento de GAL y de su ARNm en neuronas sensitivas primarias también lesionadas (Verge y col., 1995).

En las neuronas sensitivas primarias se observan cambios dramáticos en cuanto a la expresión peptidérgica luego de sufrir injurias producidas experimentalmente. En ratas normales (no lesionadas), en estas neuronas sensitivas primarias pueden visualizarse fácilmente: SP, somatostatina y CGRP, mientras que sólo un bajo número de células expresan VIP/PHI y GAL (Dalsgaard, 1988). Luego de una lesión de sus axones periféricos hay una disminución muy marcada de SP y CGRP (Jessell y col., 1979; Noguchi y col.,

1990). Por el contrario, los niveles de VIP aumentan significativamente en estas neuronas (Shehab y Atkinson, 1986). Como el VIP induce la glucógenolisis (Magistretti y col., 1981), aumenta los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Magistretti y Schorderet, 1984), causa vasodilatación (Said y Mutt, 1970), y aumenta la supervivencia de neuronas en cultivo (Brenneman y Eiden, 1986), parece probable que el VIP sirva para promover la supervivencia y la regeneración de estas células (Shehab y Atkinson, 1986). También como ya ha sido ampliamente discutido la GAL y su ARNm aumentan significativamente luego de lesiones (Hökfelt y col., 1987b; Villar y col., 1989a; Zhang, 1994; Zhang y col., 1994, 1995a, b; Farkas-Szallasi y col., 1995; Persson y col., 1995; Barajon y col., 1996). Sin embargo, aún no existe evidencia que indique que la GAL presenta una acción trófica o promueva la supervivencia. Por otro lado si está demostrado que la GAL suprime el dolor actuando como antagonista endógeno de la SP y del CGRP (Xu y col., 1989, 1990; Ji y col., 1994), ambos implicados como "transmisores del dolor" en el asta dorsal de la médula espinal (Henry y col., 1975; Woolf y Wiesenfeld-Hallin, 1986). Además, la GAL aumenta el efecto de la morfina a nivel de la médula espinal (Wiesenfeld-Hallin y col., 1990). Los antagonistas a GAL no sólo bloquean el efecto de la GAL exógena (Bartfai y col., 1991), sino también de la GAL liberada endógenamente; efecto que se encuentra muy aumentado luego de injurias (Wiesenfeld-Hallin y col., 1992). Por todo esto, la GAL endógena parece ejercer una inhibición tónica sobre la excitabilidad de la médula espinal, especialmente después de las lesiones. Este efecto podría ser una respuesta del organismo a la hiperexcitabilidad de las aferencias lesionadas (Wall y Gutnick, 1974) que subyace al dolor neuropático. Así, una insuficiente inhibición por parte de la GAL en el asta dorsal contribuiría a estados de dolor crónico, mientras que los compuestos con actividad de agonistas de GAL podrían ser drogas analgésicas potenciales. Bajo condiciones normales la GAL tendría sólo un valor funcional menor y la supresión rápida del dolor luego de

injurias estaría mediada por péptidos opioides liberados por neuronas del asta dorsal. Sólo luego de cierto tiempo después de producida la lesión del nervio periférico (y nuevamente nos referiríamos a estados desregulados y/o patológicos), el alto incremento del ARNm de GAL resulta en un aumento de los niveles peptídicos en el asta dorsal y en un efecto analgésico, previniendo que los "mensajeros del dolor" alcancen neuronas de segundo orden en la médula espinal (Hökfelt, 1991). En el sapo hemos observado inmunorreactividad a GAL en células del asta intermedio lateral que podrían pertenecer al tracto espinotalámico relacionado con la percepción del dolor; podemos suponer que en estos animales, al igual que en los mamíferos, la GAL tendría un rol en la analgesia en este sistema neuronal.

Hay una evidencia creciente que apoya un rol para los péptidos en los procesos tróficos (Palkovitz, 1995). Por ejemplo, se ha involucrado a los péptidos opioides en el desarrollo del SNC y en el crecimiento neuronal (Vertes y col., 1982; Zagon y Mc Laughlin, 1983). Además, las taquiquininas estimulan el crecimiento de los fibroblastos y de las células del músculo liso (Nilsson y col., 1985), y estimulan la síntesis de las interleuquinas 1 y 6 y del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  en los monocitos (Lotz y col., 1988). El VIP influencia la mineralización del hueso (Hohmann y col., 1986), estimula el crecimiento de los queratinocitos humanos (Haegerstrand y col., 1989) y promueve la supervivencia de células nerviosas en cultivo (Brenneman y Eiden, 1986; Pincus y col., 1990), efecto que podría ocurrir *in vivo* luego de la liberación de este péptido de los terminales nerviosos de las neuronas sensitivas y/o autonómicas (Hill y col., 1991). Es interesante la observación de que los efectos neurotóxicos inducidos por la proteína  $\beta$  amiloide en el SNC pueden ser revertidos mediante la administración central o periférica de SP (Kowall y col., 1991) y la

ACTH reduce la apoptosis en la corteza adrenal de ratas hipofisectomizadas (Ceccatelli y col., 1995).

Otro ejemplo lo presenta el CGRP, el cual está presente en neuronas motoras (Rosenfeld y col., 1983; Gibson y col., 1984) y tiene sitios de unión en células musculares estriadas (Jennings y Mudge, 1989; Popper y Micevych, 1989; Roa y Changeux, 1991). Además de influenciar directamente la transmisión neuromuscular, el CGRP presenta efectos de naturaleza trófica, ya que aumenta la síntesis de receptores de acetilcolina en células musculares de pollo en cultivo (Fontaine y col., 1986; New y Mudge, 1986). Esto ocurre presumiblemente mediante la estimulación de la adenilato ciclasa y la producción de AMPc (Takami y col., 1986; Laufer y Changeux, 1987). En el pollo, el CGRP tendría entonces una importante función durante la embriogénesis, ya que su expresión alcanza un pico entre los días 11 y 19 antes de la eclosión del huevo (Villar y col., 1989b); un período durante el cual se establecen las placas motoras. De hecho, se ha propuesto al CGRP como un factor neuronal anterógrado liberado por los terminales nerviosos para regular la expresión génica del receptor de acetilcolina en las placas motoras (Fontaine y col., 1987). Finalmente, el CGRP previene la gemación o "sprouting" de las terminales nerviosas motoras inducida por enfermedades (Tsujimoto y Kuno, 1988).

En motoneuronas adultas se encontró una marcada plasticidad para el CGRP. Las lesiones de los nervios periféricos inducen un aumento, tanto del péptido como del ARNm del CGRP (Moore, 1989; Streit y col., 1989; Arvidsson y col., 1990; Haas y col., 1990; Marlier y col., 1990; Noguchi y col., 1990; Piehl y col., 1991). Ya que se asume que las proteínas necesarias para la restitución y supervivencia del axón aumentan luego del daño neuronal (Lieberman, 1971; Kreutzberg, 1982; Barron, 1983; Palkovits, 1995), esto podría

interpretarse como si el CGRP tuviera un rol trófico. Sin embargo, esto es contrario al efecto de la lesión sobre la expresión del CGRP en neuronas sensitivas, en las que como ya se discutió, ocurre una regulación negativa. El supuesto efecto trófico del CGRP no es claro, pero su potente acción vasodilatadora podría ayudar a la regeneración y tal vez esté relacionado con el reciente descubrimiento de que en las células gliales el CGRP estimula la formación de AMPc asociada a la transformación de los astrocitos en células multipolares con muchos y largos procesos (Lazar y col., 1991). Denis-Donini (1989) ha observado que el CGRP en concentraciones nanomolares puede inducir un fenotipo dopaminérgico en neuronas del bulbo olfatorio, mimetizando neuronas epiteliales olfatorias. Por todo esto el CGRP podría ser un factor de diferenciación para algunas neuronas dopaminérgicas.

Otro ejemplo de neuropéptidos con un rol metabólico/trófico ocurre con la NT en el sistema nigroestriado. Cuando se inyecta NT en el estriado de la rata, está es transportada en forma retrógrada sin metabolizar hasta neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (Castel y col., 1990). Allí el péptido conduce a un aumento en la expresión génica de la enzima TH (Burgevin y col., 1992). Como la NT está presente en el estriado (Kobayashi y col., 1977) y las neuronas dopaminérgicas poseen receptores para NT (Palacios y Kuhar, 1981), es posible que este péptido represente una señal retrógrada producida en el estriado, internalizada por los terminales nerviosos dopaminérgicos del estriado, y luego del transporte retrógrado a los cuerpos celulares afecte la síntesis de TH. Este tipo de señalización retrógrada y a larga distancia ya discutida para el NO, pero a diferencia del NO vía una internalización mediada por receptores, podría ser una función novedosa y común a muchos neuropéptidos (Burgevin y col., 1991), similar a los mecanismos que operan para el NGF (Hendry y col., 1974). Esta señalización retrógrada sumada a la

difusión por grandes distancias ya mencionada explicarían la comunicación de zonas distantes adjudicada a los neuropéptidos.

Por último, la localización por inmunofluorescencia de inmunorreactividad a CRH en células transfectadas muestran que el precursor de CRH no sólo está presente dentro del citoplasma, sino que también está presente en una nueva localización subcelular, el núcleo de estas células (Morrison y col., 1993). Esta nueva localización fue confirmada usando técnicas de fraccionamiento subcelular. Previamente se había encontrado inmunorreactividad para CRH en el núcleo de linfocitos T humanos (Ekman y col., 1993). Esto sugiere un rol fisiológico para el CRH nuclear y también apoya una localización intracelular dual de la proteína secretora en células que producen el neuropéptido endógenamente. Esta localización intracelular dual también ha sido demostrada para la oncoproteína int-2 (Acland y col., 1990) y para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Yeh y col., 1994). El proCRH podría ser translocado al núcleo de la célula a través de la interacción con otras proteínas citoplasmáticas destinadas al núcleo y que contienen una señal de localización nuclear para su importación, como ha sido demostrado para otras proteínas (Moreland y col., 1987; Booker y col., 1989). Otra posibilidad que podría explicar la translocación nuclear del proCRH es a través del uso de codones de iniciación alternativos como ya ha sido descrito para el FGF (Bouche y col., 1987), para el producto del gen int-2 (Acland y col., 1990) y para la proteína prostática de la rata (Spence y col., 1989). Existe evidencia que sugiere que la expresión del proCRH y su translocación al núcleo presenta propiedades de proliferación celular (Castro y col., 1995). Se especula que el proCRH actúa en forma intracrina (O'Malley., 1989) con un rol estimulador en la proliferación celular, estimulando la síntesis de ADN. CRH tiene un posible rol mitogénico a nivel de la hipófisis anterior (Gertz y col., 1987; McNicol y col.,



1988) donde ejerce su efecto sobre células corticotropas que específicamente poseen receptores para CRH (Chen y col., 1993). CRH también tiene un rol mitogénico en linfocitos B de rata (McGillis y col., 1989). En células transfectadas el rol mitogénico está mediado vía intracelular por proCRH, como ha sido sugerido para otros péptidos y factores de crecimiento (Radulescu y Wendtner, 1993).

En síntesis, debe considerarse la posibilidad de que las células y fibras hipotalámicas inmunorreactivas a los diferentes péptidos estudiados, en especial a GAL, operen como sistemas funcionales, que una vez activados desencadenan un estado fisiológico con componentes neuroendócrinos, comportamentales y de comunicación. Para estudiar más exhaustivamente los mecanismos involucrados en las relaciones anatómo-funcionales encontradas deberíamos:

- i) acceder a los ADN "copy" de los neuropéptidos de anfibios utilizados en este estudio y así por medio de la técnica de hibridación *in situ* completar la información hasta ahora obtenida sobre la variación en la expresión peptidérgica;
- ii) realizar experimentos de "binding" autorradiográficos para relacionar en forma más exacta las probables funciones peptídicas con las áreas donde estas sustancias neuroactivas endógenas posiblemente actúen;
- iii) desarrollar y utilizar en los distintos modelos experimentales antagonistas y agonistas a los péptidos aquí analizados y con los mismos tratar de inferir más específicamente el rol funcional de los péptidos mencionados;
- iv) investigar las probables funciones tróficas, analgésicas y/o protectoras frente a noxas, de estas moléculas, *in vitro* y en modelos patofisiológicos *in vivo* en anfibios.

## 6. CONCLUSIONES

6.1. La amplia distribución de inmunotinción a GAL encontrada en el SNC del sapo, sugiere que la GAL tendría múltiples funciones en esta especie, como ya ha sido descrito en mamíferos (Nordström y col., 1987; Shimatsu y col., 1991; Tanoh y col., 1991; Promanik y Ögren, 1992; Bartfai y col., 1993). Además, la predominancia de estructuras neurales expresando GAL en el área preóptica-hipotalámica indicaría que este péptido tiene un rol importante en procesos neuroendócrinos.

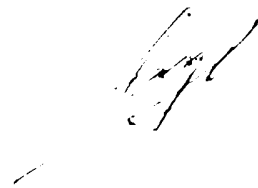
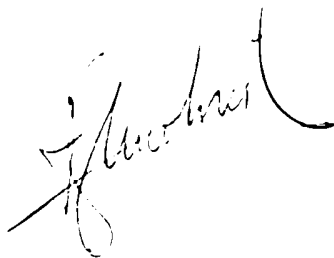
6.2. Nosotros hemos encontrado que en animales que fueron pars distalectomizados, la GAL está significativamente aumentada en el NPO debido a un aumento en el número de células que expresan este péptido. De acuerdo con nuestros resultados es tentador especular que el aumento de GAL en estas células en los animales pars distalectomizados es el resultado de la falta de una retroalimentación fisiológica normal mediada por los niveles circulantes de GH. Esta hipótesis concuerda con la observación de que el reemplazo con GH previene el aumento de GAL en las neuronas del NPO y es reforzada por los resultados obtenidos con las técnicas de transporte axonal y de RIA. Sin embargo, existe un amplio espectro de posibles interacciones entre GAL, GHRH, GH, así como somatostatina y noradrenalina que podrían intervenir en este fenómeno.

6.3. Los datos presentados en relación con los experimentos de variación en la homeostasis hidromineral muestran que el desarrollo de una respuesta neuroendócrina a la estimulación osmótica es un fenómeno complejo que involucra la interacción de varios mecanismos diferentes de control. Es evidente que distintos neuropéptidos funcionales localizados dentro de las neuronas magnocelulares del hipotálamo del sapo poseen la habilidad de responder selectivamente a cambios específicos, esto permitiría al hipotálamo controlar una variedad de circuitos homeostáticos cambiando los niveles de distintas

sustancias neuroactivas en diferentes combinaciones dependiendo de las necesidades fisiológicas.

6.4. Los resultados inmunohistoquímicos presentados muestran que durante la hibernación, el NPO y el núcleo magnocelular se llenan de material inmunorreactivo (GAL y NOS respectivamente). Presumiblemente la acción endógena de estas sustancias neuroactivas sea responsable o requisito para que ocurra la hibernación.

6.5. Nuestro conocimiento sobre la distribución de péptidos, su coexistencia y sus acciones ha aumentado durante las últimas décadas. El desarrollo de nuevos antagonistas ha permitido analizar los roles fisiológicos de los neuropéptidos. Además de sus supuestos roles como mensajeros auxiliares en la señalización sináptica y no sináptica; existe una creciente evidencia que señala que los neuropéptidos ejercen acciones tróficas. El concepto de co-transmisión ha ganado mayor comprensión con el descubrimiento de que la transmisión química está finamente regulada, siendo la liberación del neurotransmisor clásico y del péptido dependiente de la frecuencia de estimulación. Así, generalmente los péptidos no son liberados bajo condiciones basales y sólo se liberan luego de la activación a alta frecuencia o "bursting firing". En algunos casos podrían jugar un rol durante las lesiones u otro tipo de "stress" intenso impuesto a las neuronas. De hecho, algunos péptidos son sintetizados solamente bajo esas condiciones, exhibiendo un alto grado de plasticidad.



## 7. ILUSTRACIONES

*7.1. Distribución de GAL en el Cerebro del Sapo*

Figura 2. Diagramas esquemáticos de cortes frontales de encéfalo (A-M) y médula espinal (N) de sapo, mostrando cuerpos celulares y fibras ir-GAL. El número de células y la densidad de fibras en cada área han sido indicados mediante diferentes símbolos: puntos pequeños (•)= 1-3 neuronas; puntos grandes (●)= 4-7 neuronas; estrellas (★)= 20 neuronas o más; áreas negras= muy alta densidad de fibras inmunorreactivas; áreas sombreadas oscuras= densidad mediana de fibras inmunorreactivas; áreas sombreadas claras= moderada densidad de fibras inmunorreactivas; áreas blancas= áreas con escasas o ninguna fibra inmunorreactiva. La nomenclatura de las regiones cerebrales se hizo utilizando el atlas de Wada y colaboradores (1980) y el trabajo de Neary y Northcutt (1983). Abreviaturas: ver pags. 155-160.

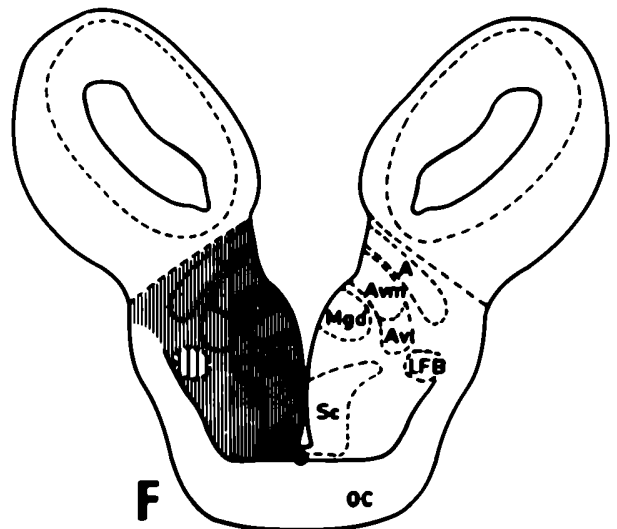
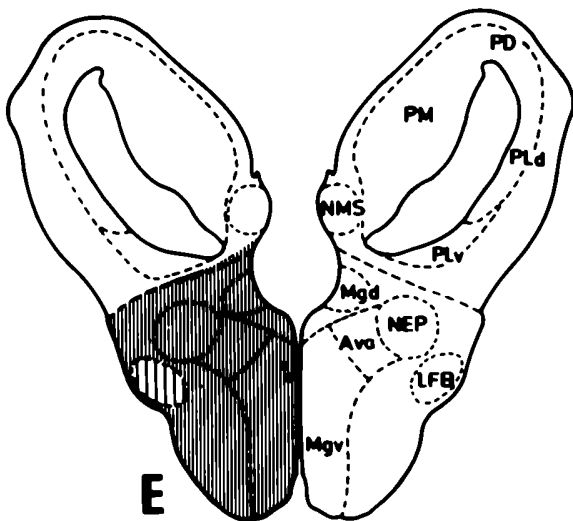
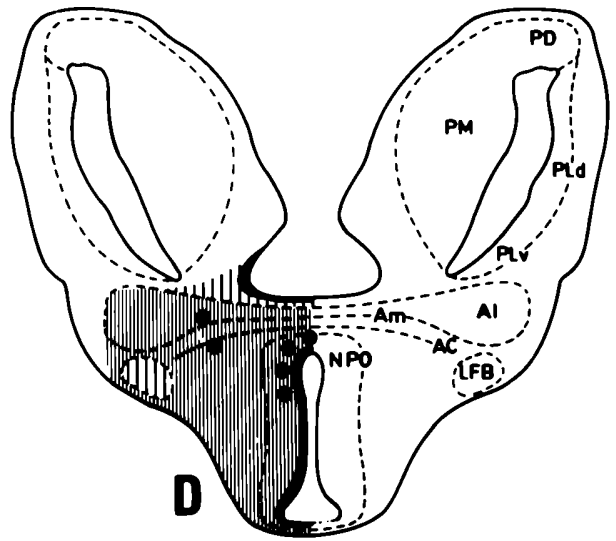
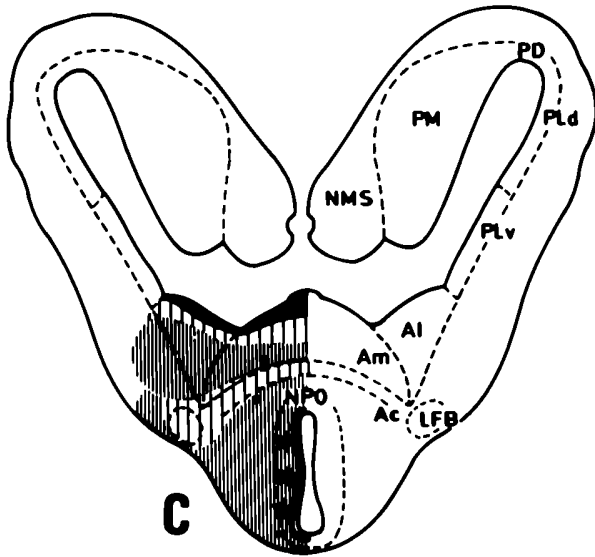
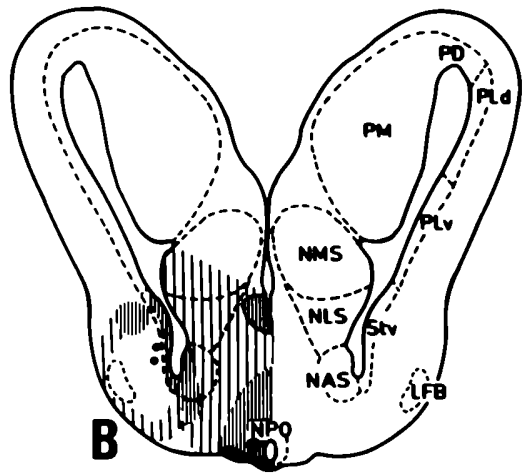
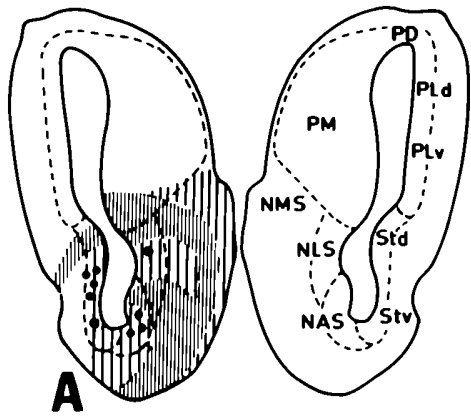




Figura 2. Continuación.

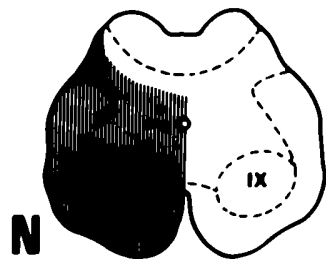
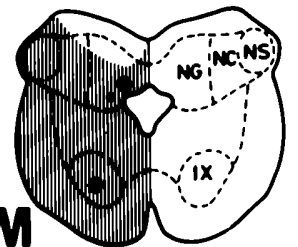
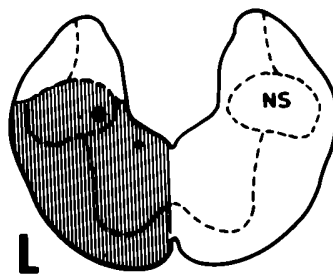
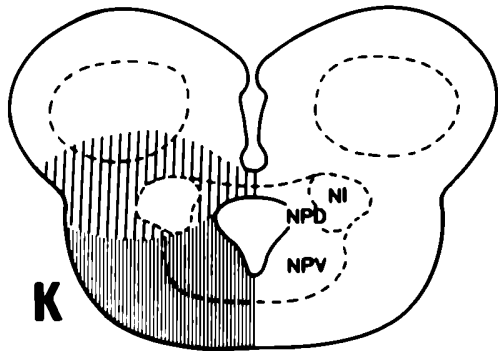
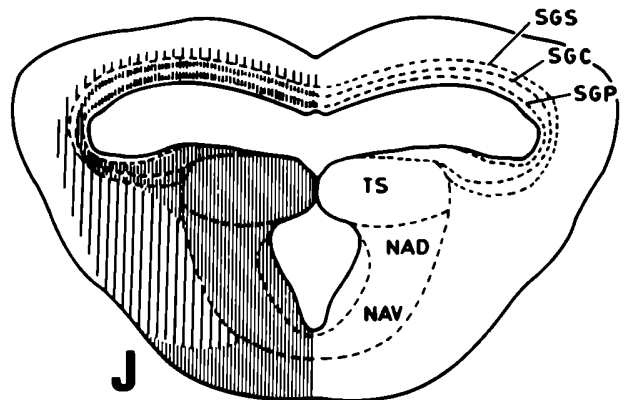
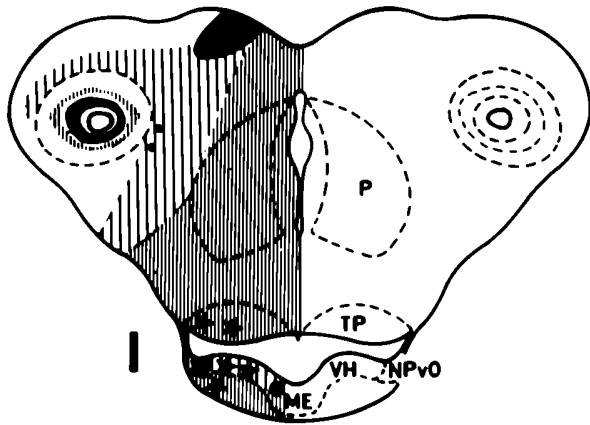
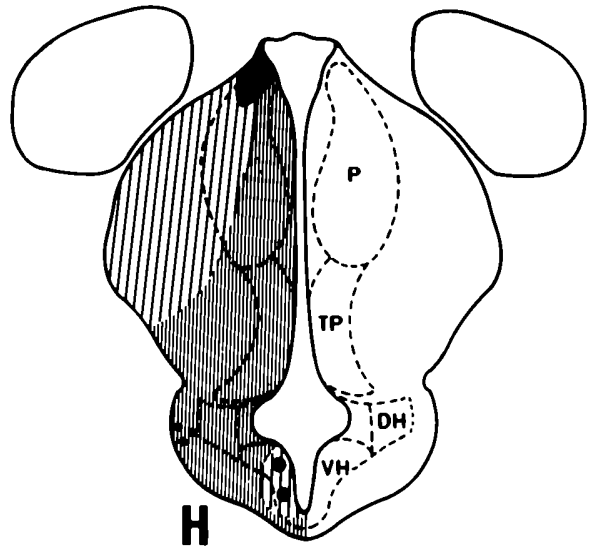
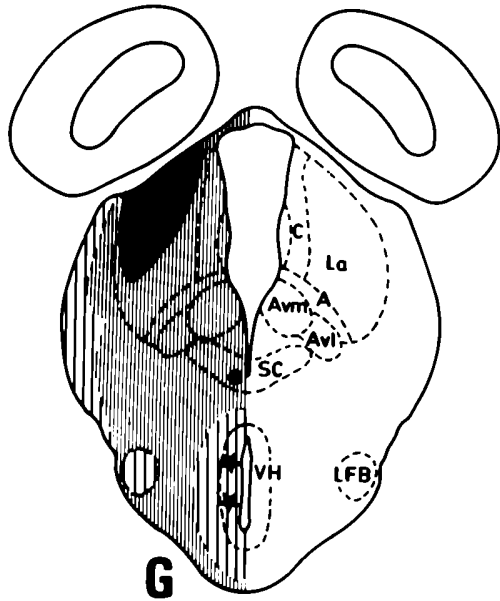


Figura 3. Microfotografías de campo claro (A-C, E) y de inmunofluorescencia (D) mostrando la inmunomarcación con suero anti GAL en el estriado ventral (Stv, A y C), en el núcleo acumbens (NAS, B, D), en la amígdala medial (Am, E) y en el cerebro anterior (D). En A se muestra un grupo de fibras densas en el Stv (flechas grandes) donde también están presentes algunas neuronas positivas (flechas pequeñas). Las flechas en B y en E muestran neuronas inmunoteñidas en el NAS y en la Am respectivamente. Todos son cortes frontales. Las barras de calibración indican: 100  $\mu$ m. Abreviaturas: ver pags. 155-160.

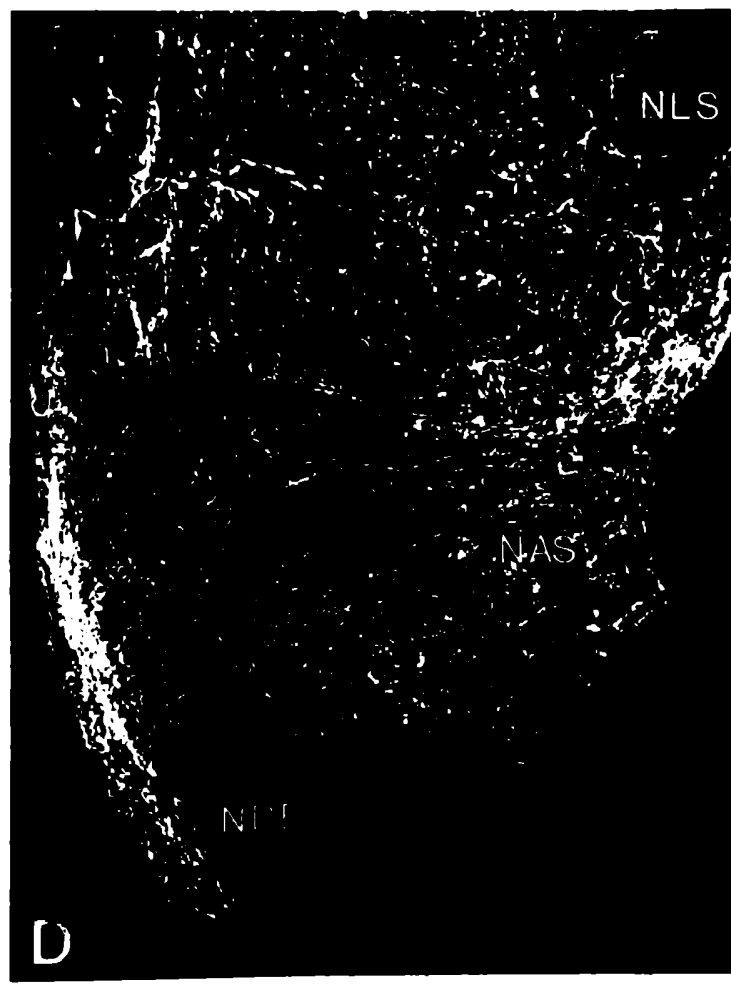
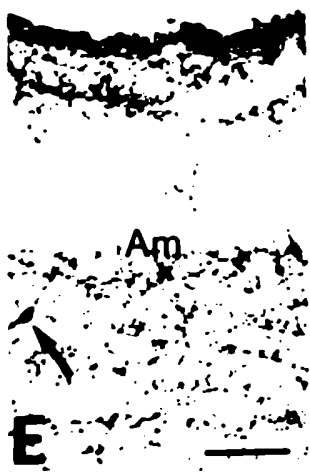


Figura 4. Microfotografías de campo claro (A-C) y de inmunofluorescencia (D) mostrando la inmunotinción con suero anti GAL en la amígdala medial (Am, A), en la comisura anterior (AC, B) y en el núcleo preóptico rostral (NPO, C) y caudal (NPO, D). Nótese la similitud morfológica entre las células de las áreas del NPO y de la Am y la falta de un límite bien definido entre ellas. Las barras de calibración indican: 100  $\mu$ m y todos son cortes frontales.

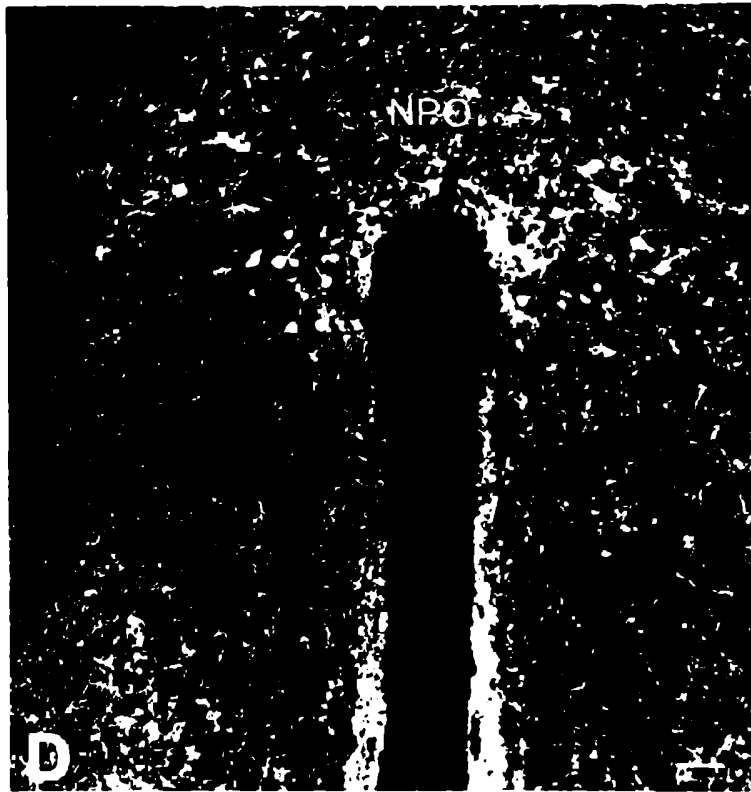
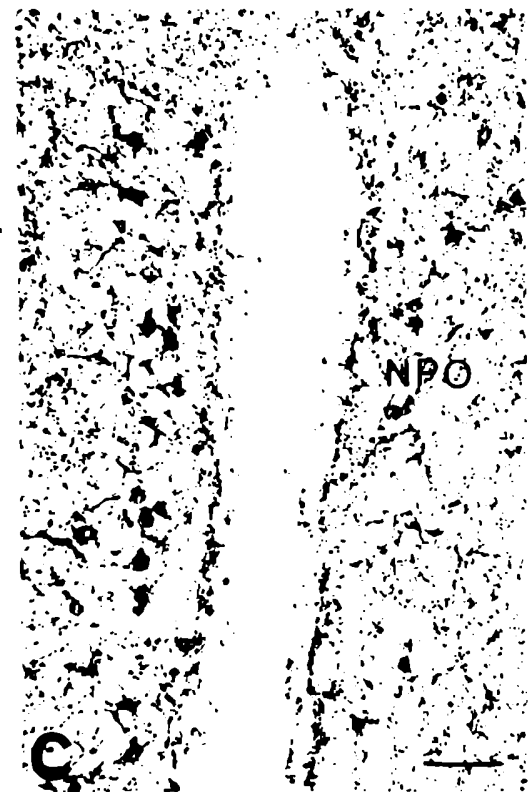
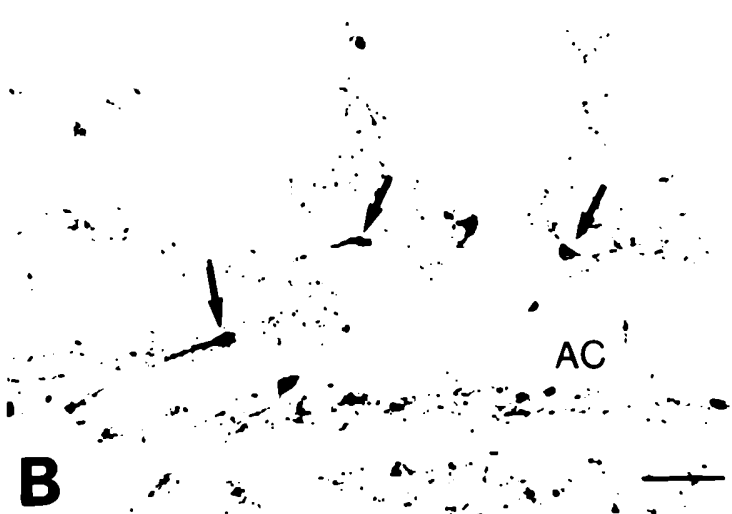
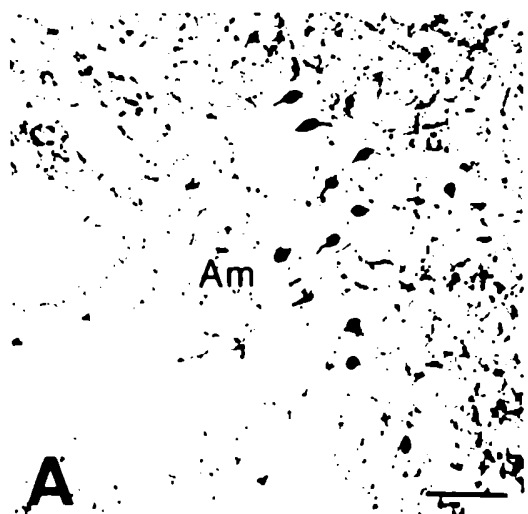


Figura 5. Microfotografía de inmunofluorescencia mostrando fibras inmunoteñidas con suero anti GAL en toda la región magnocelular caudal (Mgd) en un corte frontal. Nótese también la alta densidad de fibras positivas en el núcleo supraquiasmático (Sc, parte rostral). La barra de calibración indica: 100  $\mu$ m. Abreviaturas: ver pags. 155-160.

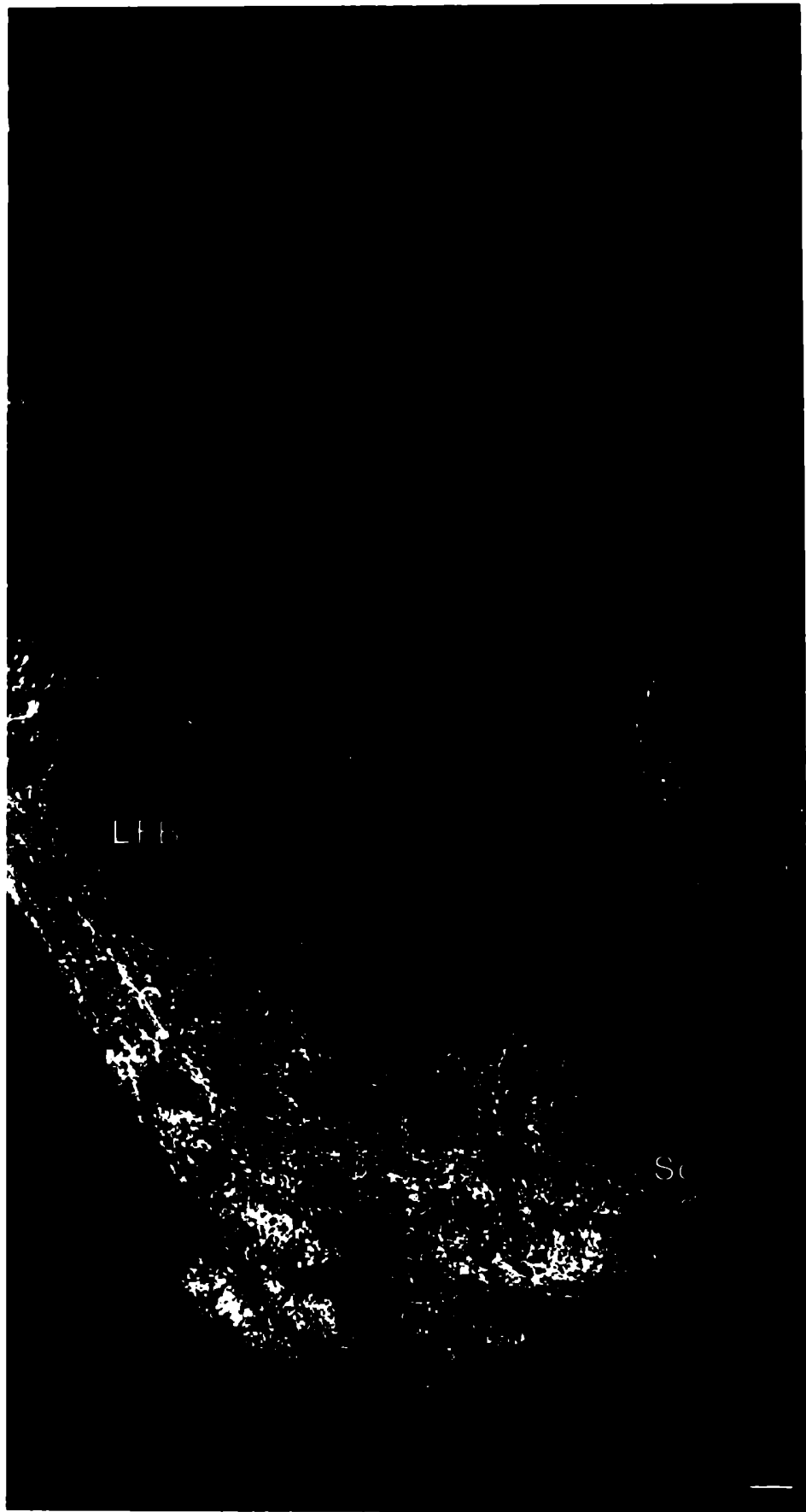




Figura 6. Microfotografías de campo claro (A-C) mostrando la inmunomarcación con suero anti GAL en el núcleo supraquiasmático (Sc, A, B) y en el hipotálamo ventral (VH, C) en cortes frontales. Dentro del Sc las neuronas emiten prolongaciones principalmente hacia el parénquima, a diferencia de lo que ocurre en el VH donde la mayoría de las células envían prolongaciones tanto hacia el parénquima como hacia el III ventrículo. El área encerrada en A se muestra a una magnificación mayor en B. Las barras de calibración indican: A, 200  $\mu\text{m}$ ; B, C, 100  $\mu\text{m}$ .

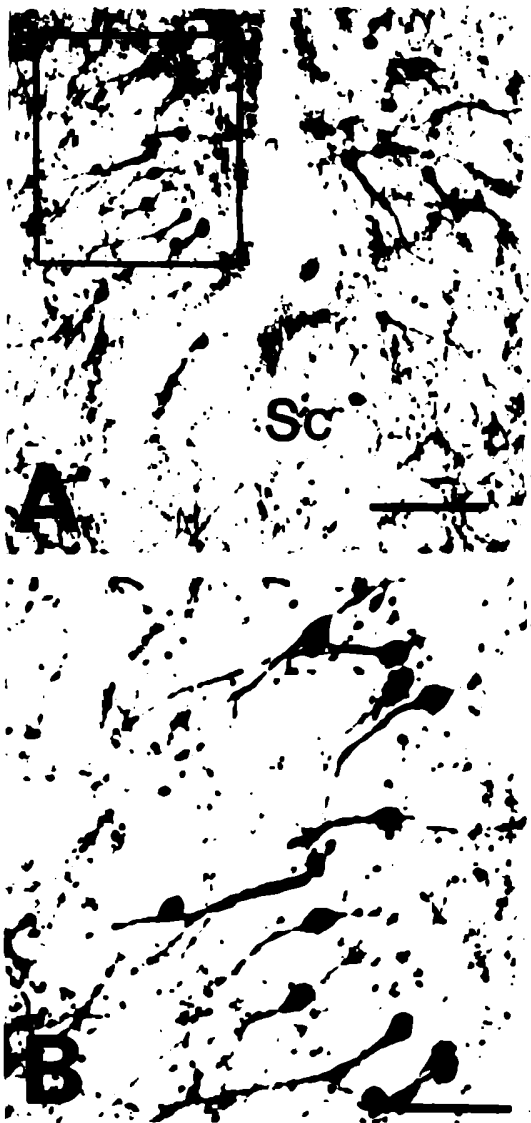


Figura 7. Microfotografías de campo claro mostrando la inmunotinción con suero anti GAL en regiones del hipotálamo basal en cortes sagitales (A, F) y frontales (B-E). En A, las flechas muestran fibras inmunorreactivas en la eminencia media (ME) con la mayor densidad en la capa externa. En B un alto número de neuronas inmunoteñidas pueden verse en el tubérculo posterior (TP). Dentro de la región infundibular (C) un grupo de neuronas inmunomarcadas se observa en el núcleo del órgano paraventricular (NPvO), el mismo se muestra con mayor aumento en D. En esta región pueden identificarse células con prolongaciones dentro del tercer ventrículo (flecha curva en E). En F las flechas muestran fibras inmunopositivas en el lóbulo neural (PN) de la hipófisis, cerca del límite con la pars intermedia (PI). Las barras de calibración indican: A, 200  $\mu\text{m}$ ; B, D, F, 100  $\mu\text{m}$ ; C, 250  $\mu\text{m}$ ; E, 75  $\mu\text{m}$ .

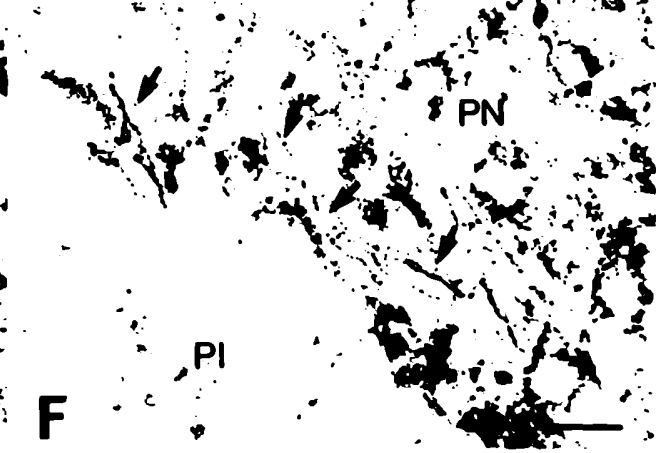
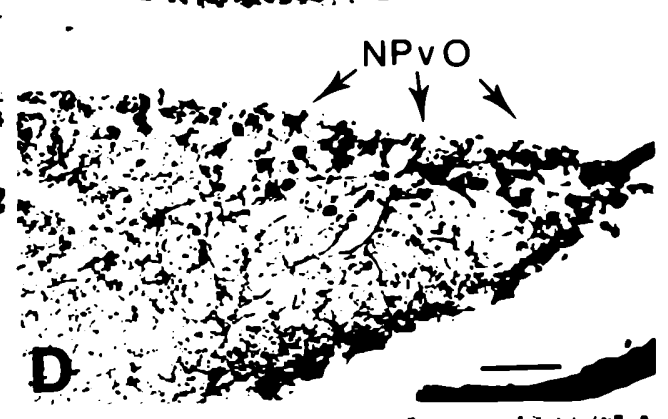
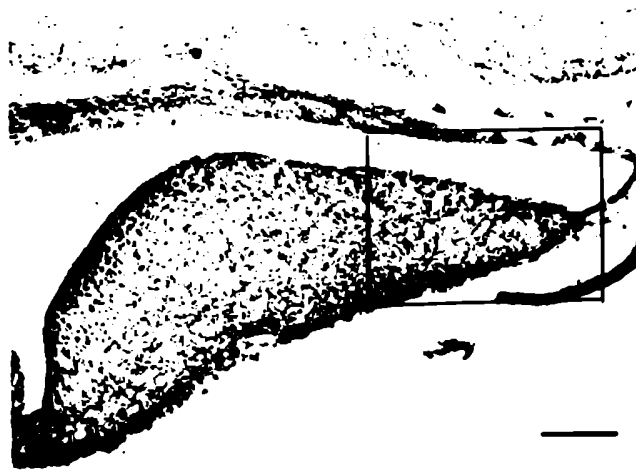
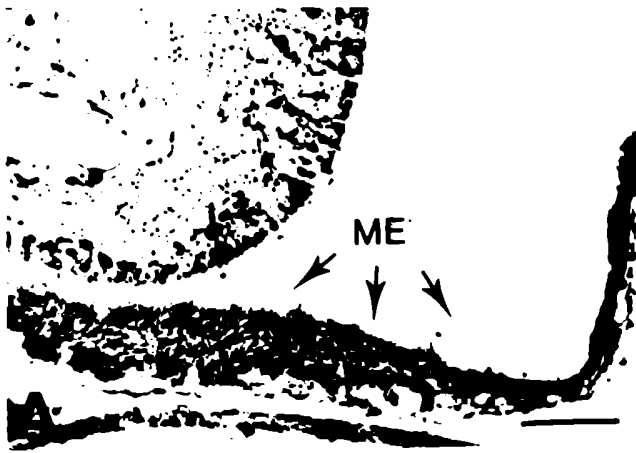


Figura 7. Microfotografías de campo claro mostrando la inmunotinción con suero anti GAL en regiones del hipotálamo basal en cortes sagitales (A, F) y frontales (B-E). En A, las flechas muestran fibras inmunorreactivas en la eminencia media (ME) con la mayor densidad en la capa externa. En B un alto número de neuronas inmunotefñidas pueden verse en el tubérculo posterior (TP). Dentro de la región infundibular (C) un grupo de neuronas inmunomarcadas se observa en el núcleo del órgano paraventricular (NPvO), el mismo se muestra con mayor aumento en D. En esta región pueden identificarse células con prolongaciones dentro del tercer ventrículo (flecha curva en E). En F las flechas muestran fibras inmunopositivas en el lóbulo neural (PN) de la hipófisis, cerca del límite con la pars intermedia (PI). Las barras de calibración indican: A, 200  $\mu\text{m}$ ; B, D, F, 100  $\mu\text{m}$ ; C, 250  $\mu\text{m}$ ; E, 75  $\mu\text{m}$ .

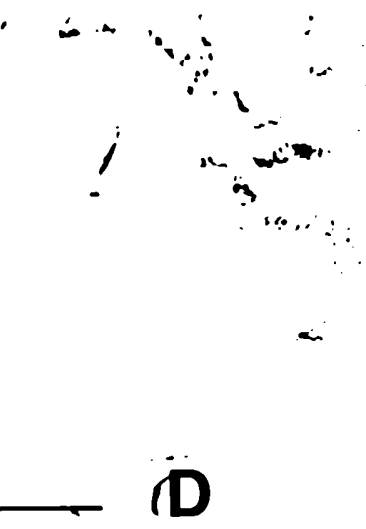
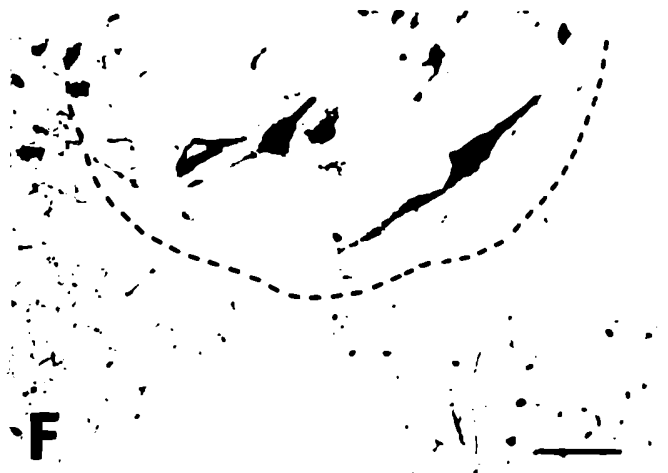
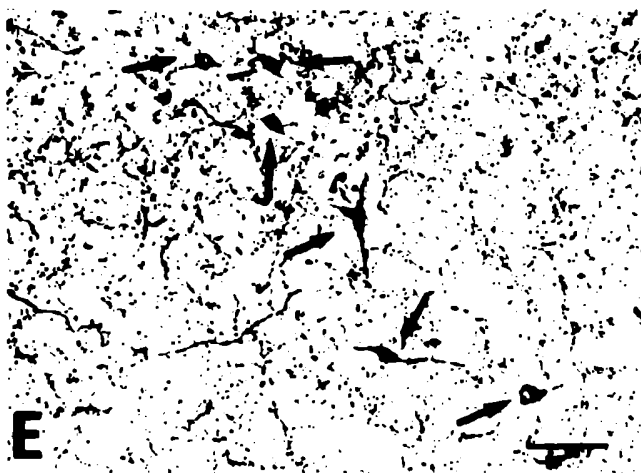
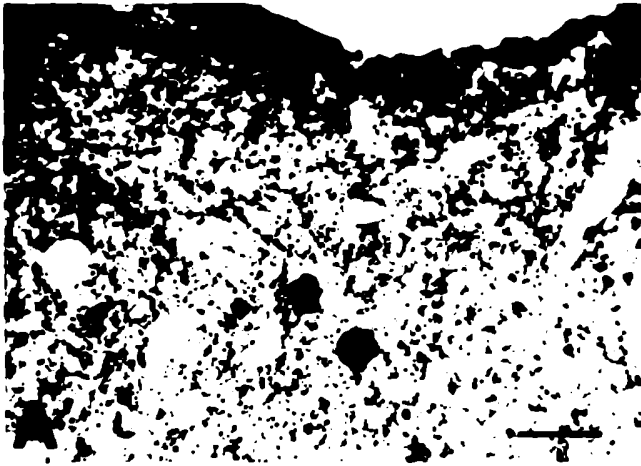


Figura 9. Microfotografías de campo claro mostrando la inmunotinción con suero anti GAL en la sustancia gris pretectal (A), en la lámina gris superficial del tectum (SGS, B), en el núcleo gracilis del tronco encefálico (C, D), en la sustancia gris intermedia (E) y en el asta ventral (F) de la médula espinal. Todos los cortes son frontales. El área recuadrada en C se muestra con mayor aumento en D. Las flechas muestran células inmunoteñidas. La línea punteada en F marca el límite del asta ventral. Las barras de calibración indican: A, D-F, 125  $\mu\text{m}$ ; B, C, 200  $\mu\text{m}$ .





*7.2. Efectos de la Hipofisectomía Total y Parcial sobre la Distribución de GAL en el Hipotálamo del Sapo*

Figura 10. Microfotografías de campo claro mostrando la inmunomarcación con suero anti GAL en la región magnocelular. Se pueden observar las diferencias cualitativas de inmunorreactividad a GAL, comparando el número de células inmunoteñidas en un animal control (A), en animales hipofisectomizados luego de 48 hs (B) y 3 días de sobrevida (C) y en animales hipofisectomizados que fueron inmediatamente transplantados con hipófisis y que se los dejó sobrevivir 3 días (D). Nótese que mientras en el animal control (A) no se ven células positivas, en los animales hipofisectomizados (B-D) se pueden observar numerosas neuronas inmunoteñidas; no existiendo diferencias entre B-C y D. Las barras de calibración indican: 125  $\mu$ m.

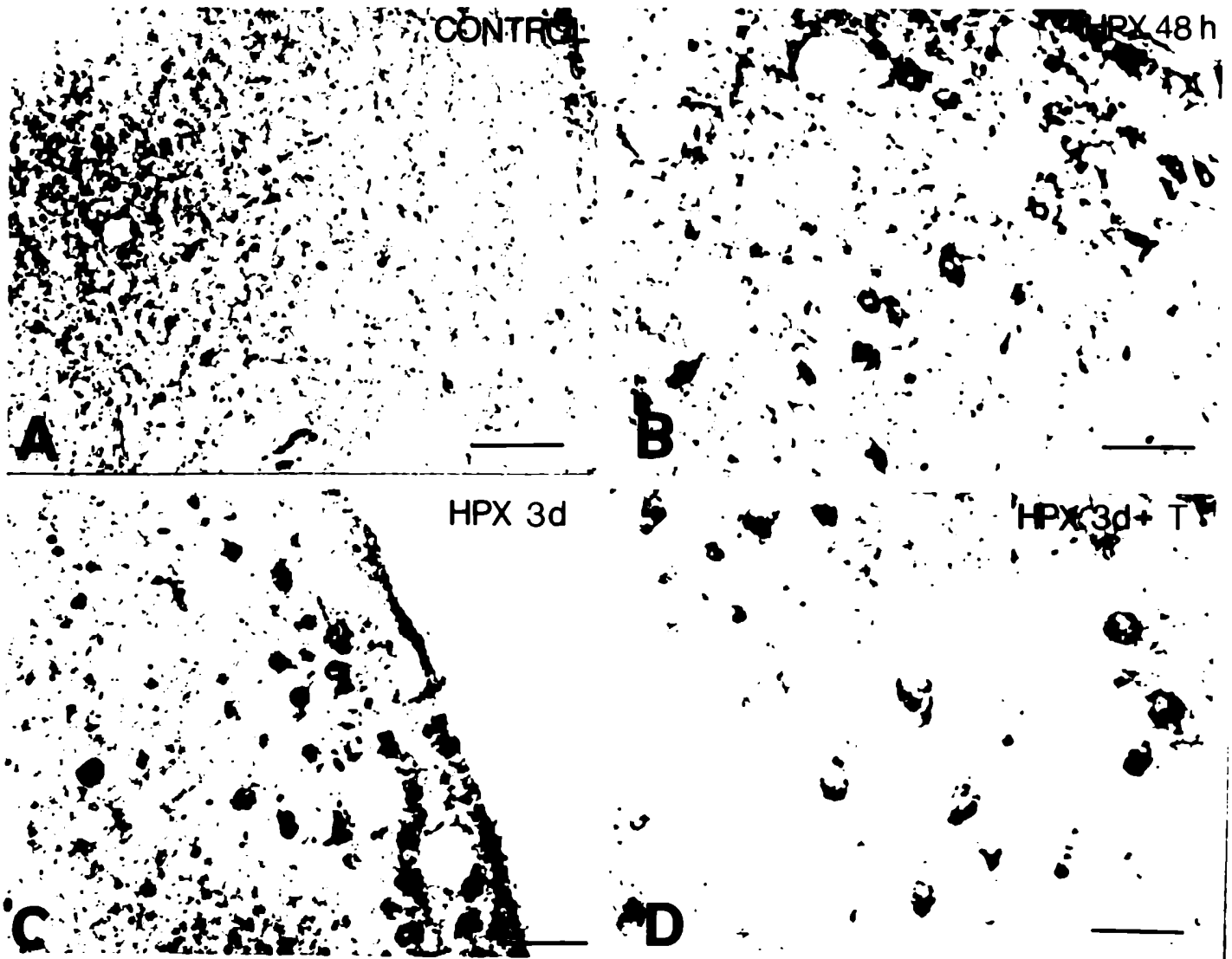
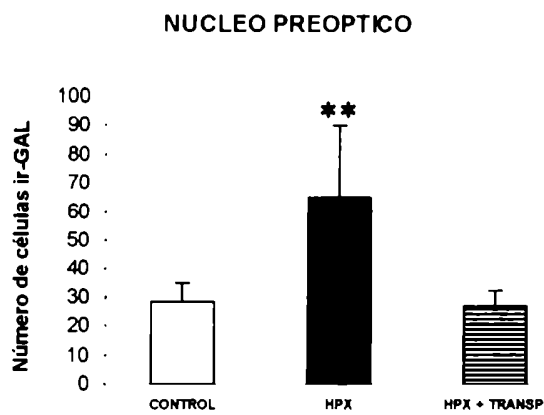


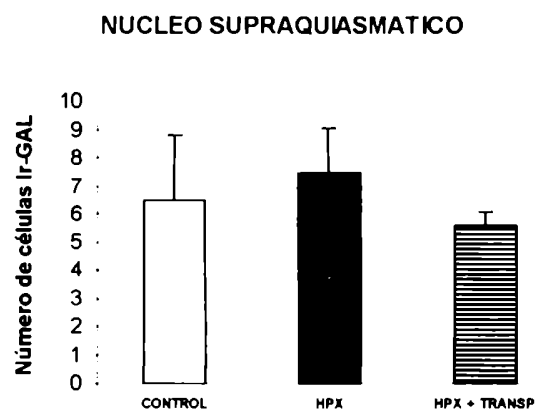
Figura 11. Microfotografías de campo claro mostrando las diferencias cualitativas de inmunorreactividad a GAL en el núcleo preóptico de sapos control (A), de animales hipofisectomizados luego de 7 (B) y 14 días de sobrevivida (C) y de animales que fueron hipofisectomizados e inmediatamente transplantados con hipófisis y que se los dejó sobrevivir 7 días (D). El animal control (A) y el hipofisectomizado que fue transplantado con hipófisis (D) muestran pocas células ir-GAL en forma lateral al III ventrículo cercanas al conducto del epéndimo, mientras que en los animales hipofisectomizados (B, C) se ve una densa población de neuronas inmunoteñidas (flechas) cerca del epitelio endimario. Las barras de calibración indican: A, B, D, 125  $\mu\text{m}$ ; C, 38  $\mu\text{m}$ .



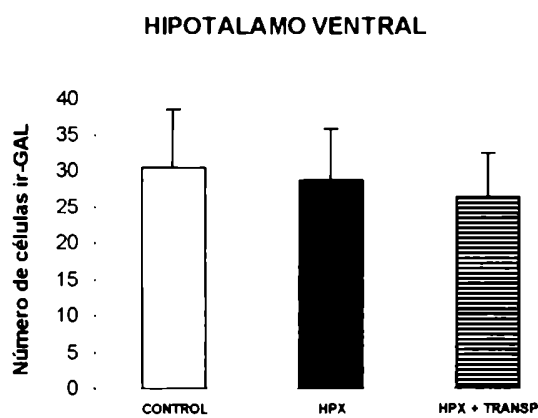
Figura 12. Efectos de la hipofisectomía (barras negras) y de la hipofisectomía seguida de trasplantes de hipófisis (barras rayadas) en la expresión de células ir-GAL comparados con la expresión de células ir-GAL en los animales control (barras blancas) en el núcleo preóptico (A), en el núcleo supraquiasmático (B), en el hipotálamo ventral (C) y en la región infundibular (D) del sapo. El tiempo de sobrevivencia de los animales experimentales fue siete días. El número de neuronas inmunoteñidas se expresa como el promedio  $\pm$  D.E. El análisis estadístico fue hecho usando un ANOVA de un factor con tres niveles de tratamiento y con el estadístico de Student. La significación \*\*:  $P < 0,001$ ;  $N = 7$ .



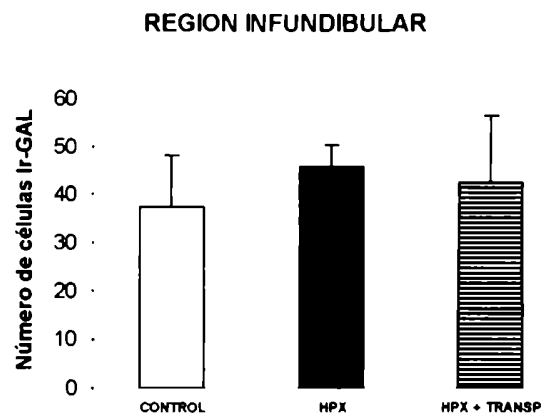
**A**



**B**



**C**



**D**

Figura 13. Microfotografías de campo claro mostrando las diferencias cualitativas de inmunorreactividad a GAL en el núcleo preóptico de sapos a los que se les extirpó la pars distalis (PDX, A), de animales que fueron pars distalectomizados e inmediatamente transplantados con pars distalis (PDX+T, B), de animales pars distalectomizados con terapia de reemplazo con solución salina (PDX+S, C) y con terapia de reemplazo hormonal con GH (PDX+GH, D); todos luego de 7 días de sobrevida. Nótese que la alta población de células ir-GAL cerca del epitelio endimario presente en el núcleo preóptico de los grupos PDX y PDX+S (flechas en A y C) está ausente en los grupos experimentales PDX+T (B) y PDX+GH (D). Las barras de calibración indican: A, B, 60  $\mu$ m; C, D, 125  $\mu$ m.



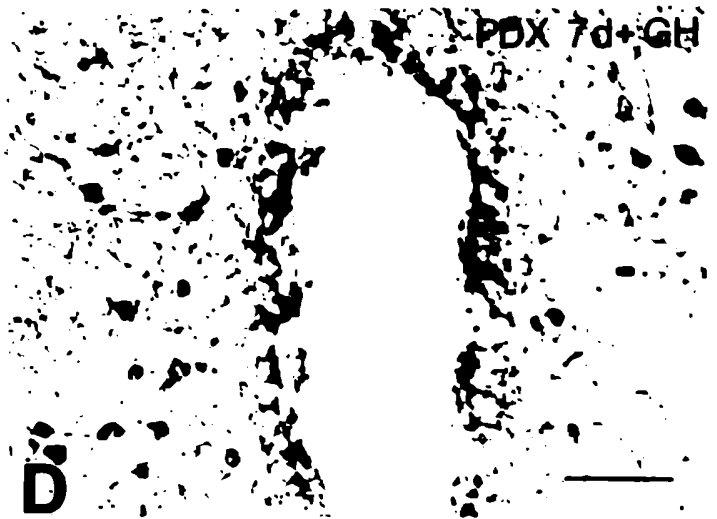
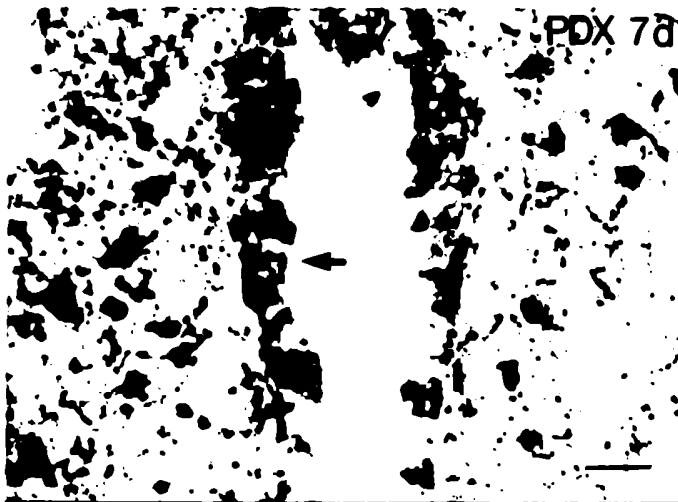


Figura 14. Microfotografías de cortes sagitales de trasplantes de hipófisis teñidos con hematoxilina-eosina. En A se observa una hipófisis completa (H), unida al tejido muscular (M) (al que fue transplantada siete días antes) por abundante tejido conectivo. En B se distinguen con mayor aumento, de izquierda a derecha, las fibras musculares esqueléticas (M), una región de tejido conectivo laxo (C), que se ha capilarizado abundantemente y la hipófisis (H). Esta neovascularización parece dirigirse hacia el trasplante. La hipófisis presenta a su vez una zona periférica con grandes capilares (VS) y formaciones trabeculares de células endócrinas en condiciones aparentemente normales. Las barras de calibración indican: A, 200  $\mu\text{m}$ ; B, 100  $\mu\text{m}$ .

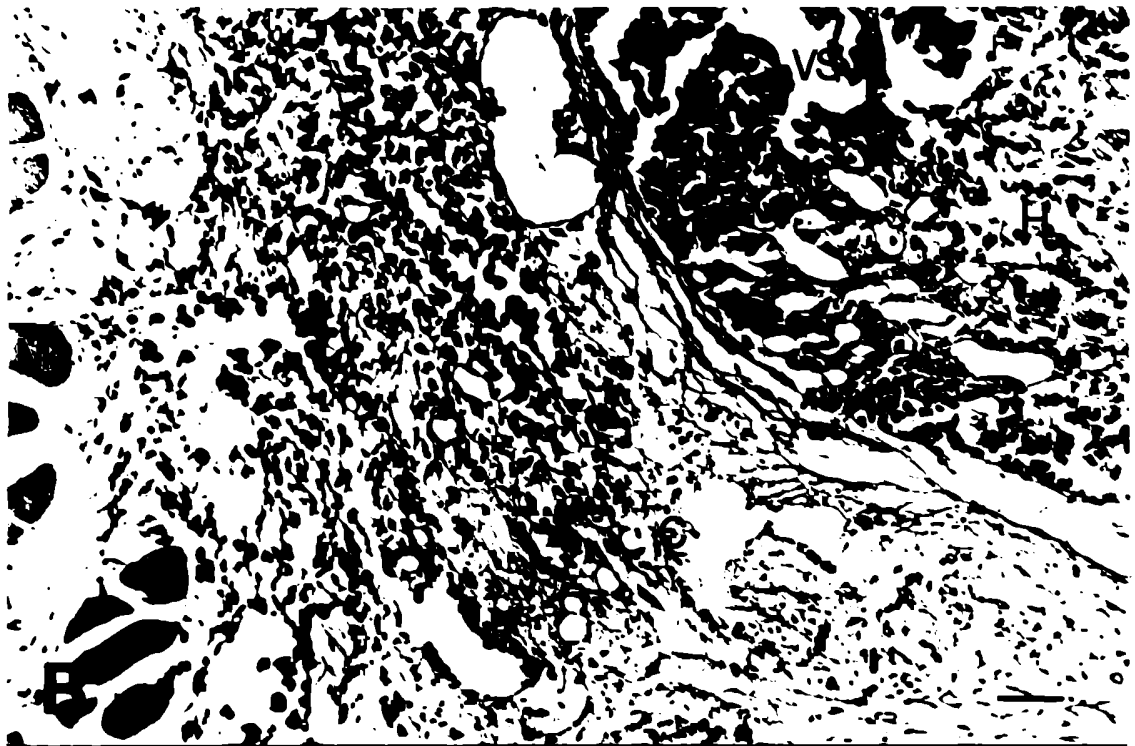
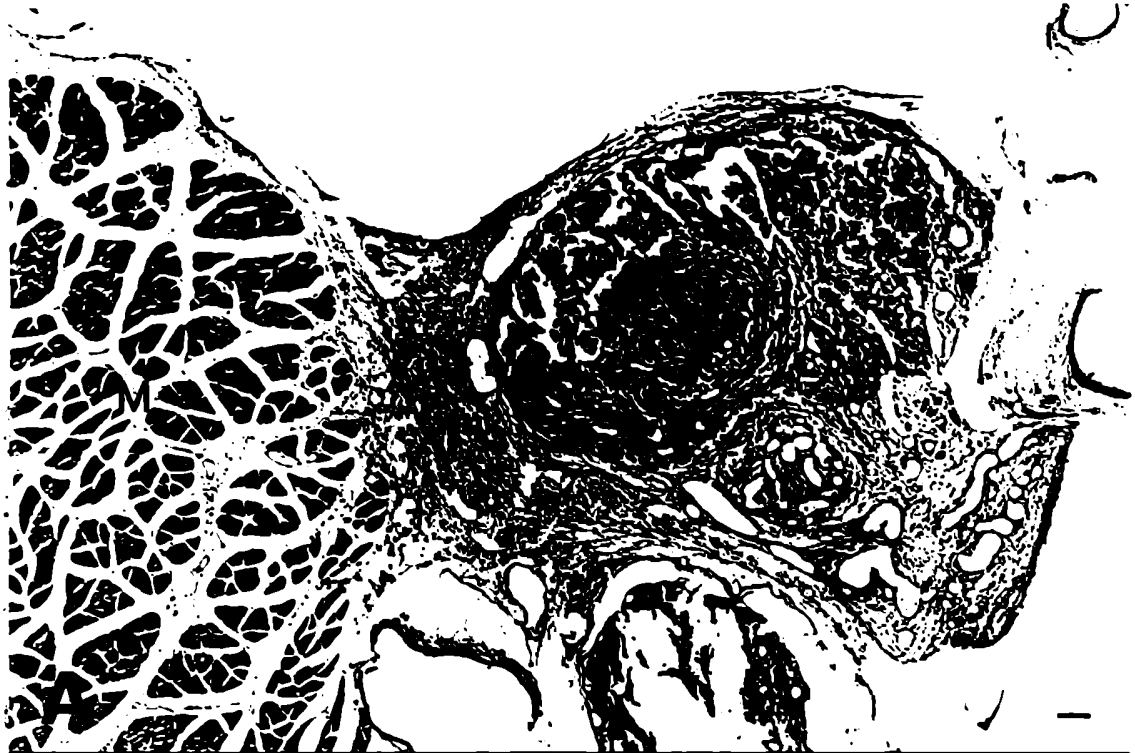
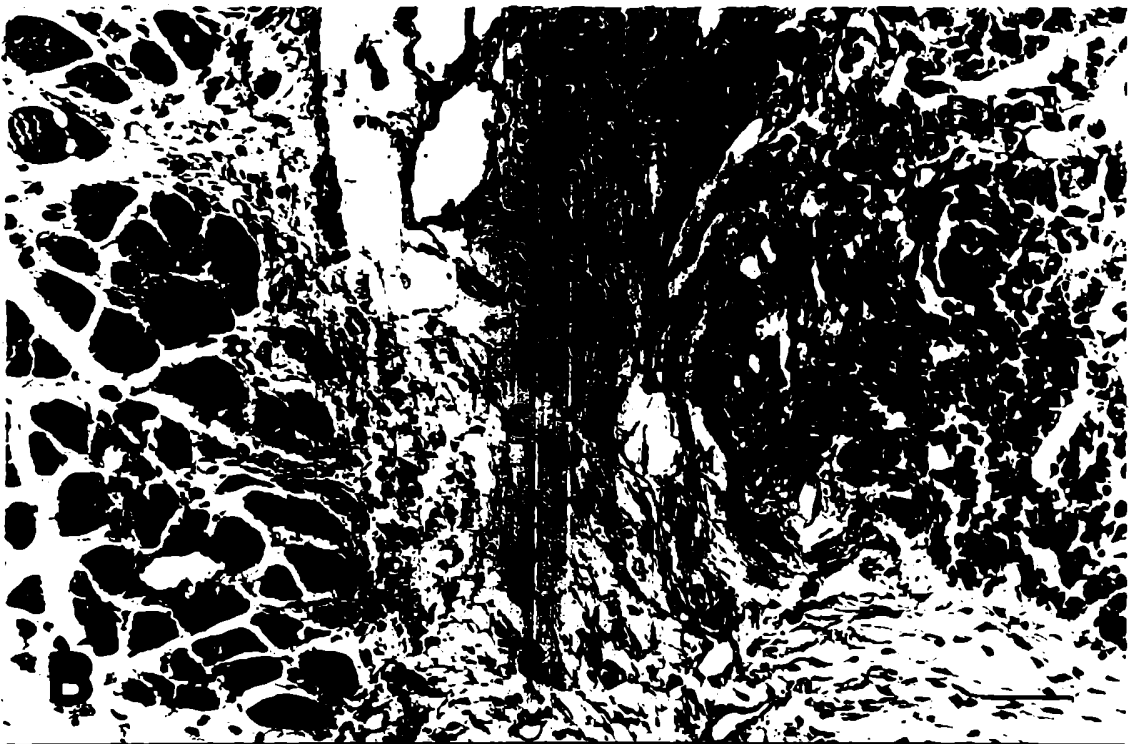
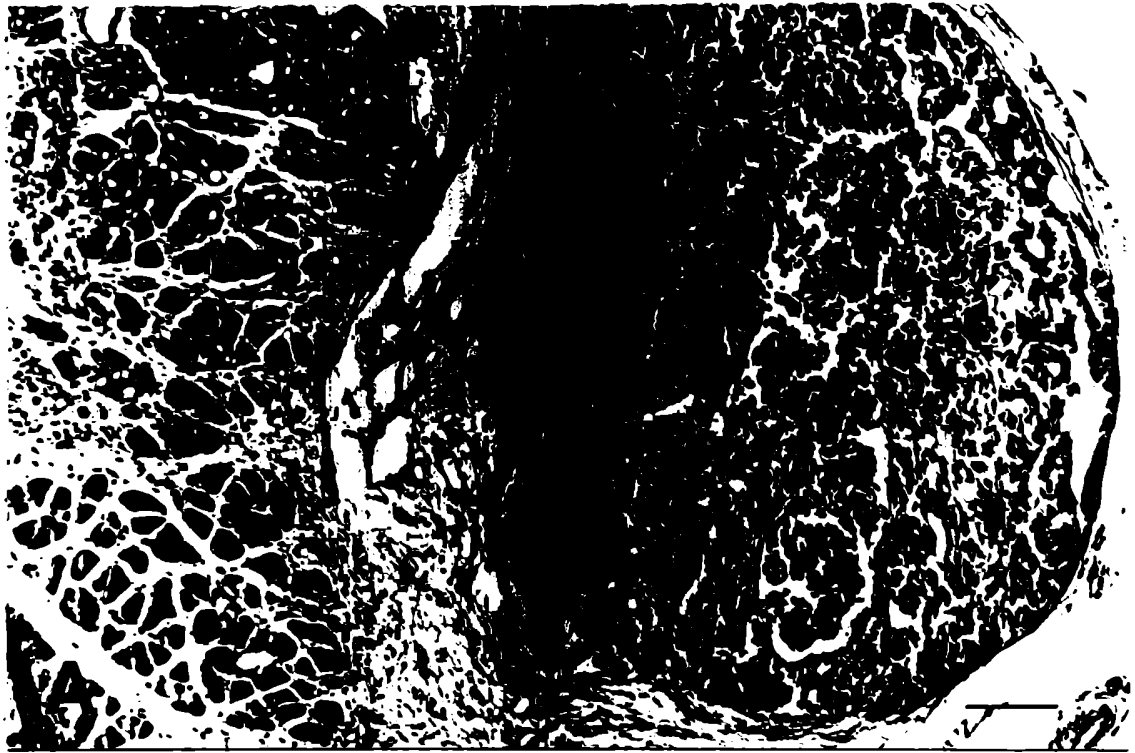


Figura 15. Microfotografías de cortes de trasplantes de pars distalis teñidos con hematoxilina-eosina. En A la pars distalis (Pds) se observa en íntima asociación con el músculo (M) en donde fue transplantada, separada del mismo sólo por una zona de tejido conectivo (C) por donde corren los vasos sanguíneos. La zona de unión al trasplante se muestra a mayor aumento en B. Las barras de calibración indican: A, 200  $\mu\text{m}$ ; B, 100  $\mu\text{m}$ .



*7.3. Efectos de la Deshidratación y la Sobrecarga Salina sobre la  
Expresión de Diferentes Péptidos Hipotalámicos*

Figura 16. Microfotografías obtenidas con microscopía confocada de rayo láser mostrando la inmunotinción con suero anti VP en la región magnocelular (Mgd). En A células inmunorreactivas a VP emiten prolongaciones que contactan con el líquido cefalorraquídeo y presentan una alta cantidad de gránulos secretores. En B se observa una de estas células (flecha en A) a una magnificación mucho mayor. Las barras de calibración indican: A, 100  $\mu\text{m}$ ; B, 9  $\mu\text{m}$ .

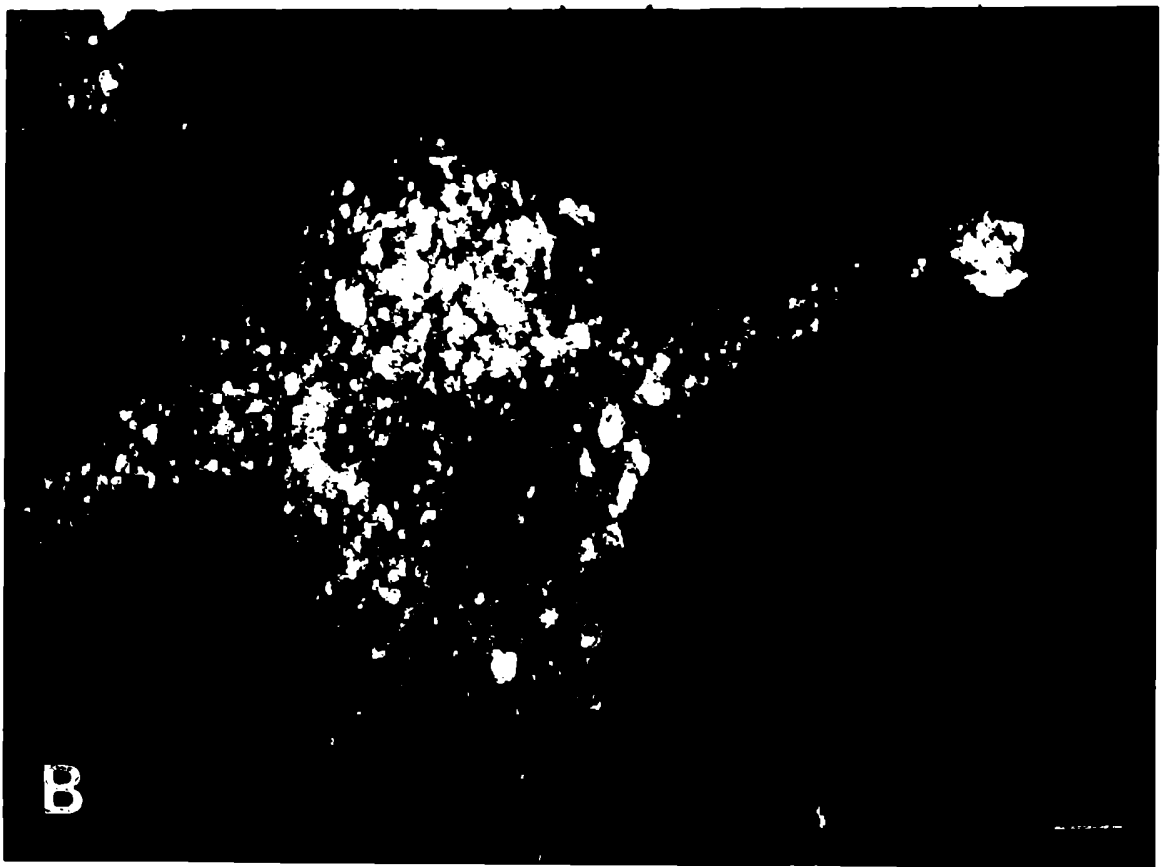
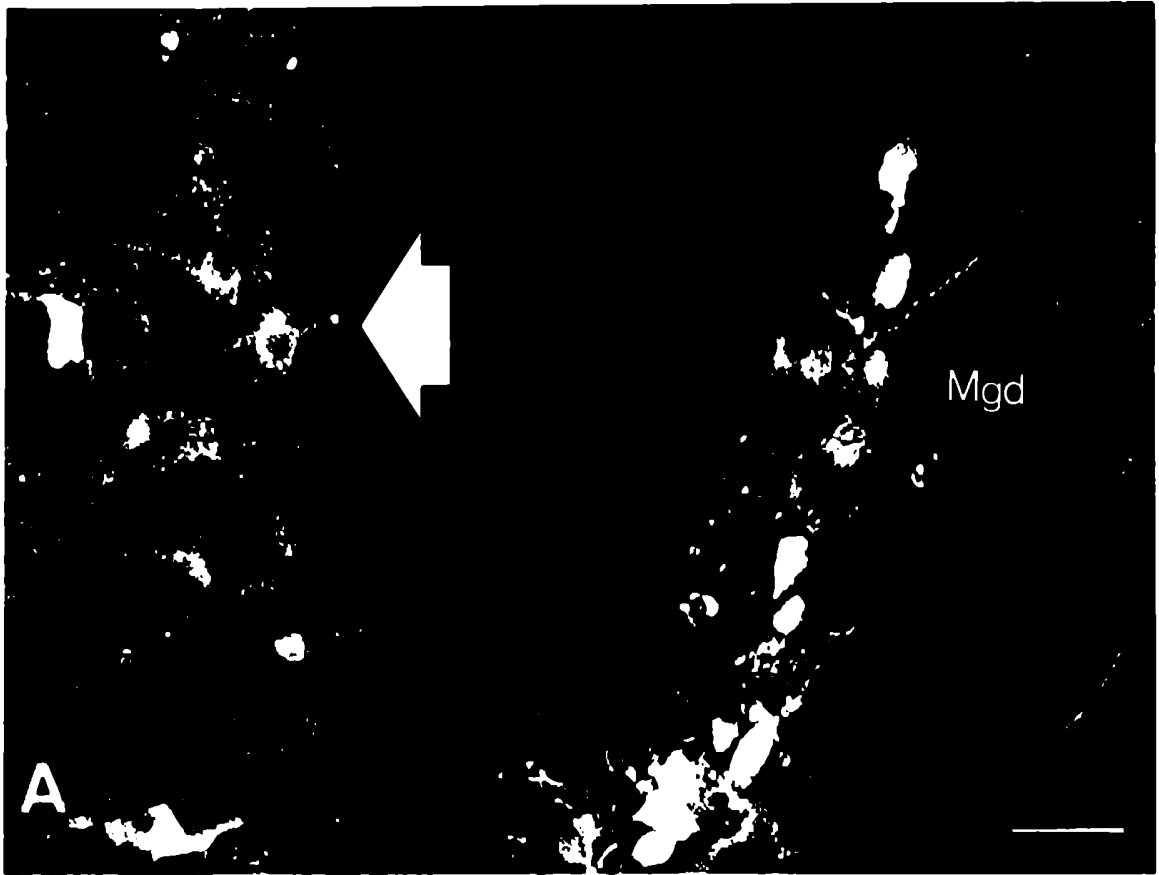




Figura 17. Microfotografías de campo claro mostrando las diferencias cualitativas de inmunorreactividad a la VP en el área magnocelular de sapos normales (CONTROL, A), de animales deshidratados (Des, B), de animales con sobrecarga de volumen (VL, C) y con sobrecarga salina (SL, D); todos luego de 3 días de sobrevida. Nótese que la alta población de células ir-VP en los animales control disminuye significativamente en los otros tres grupos estudiados, siendo principalmente escasa en B. La barra de calibración indica: A-D, 125  $\mu$ m.

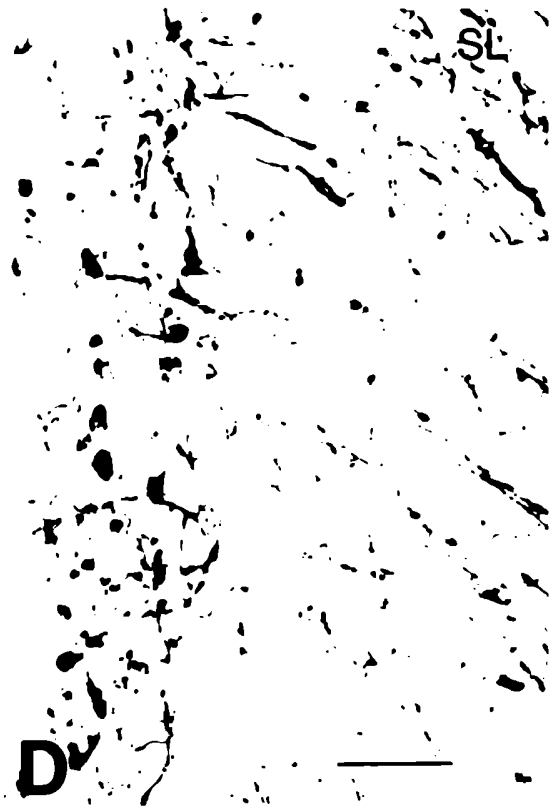


Figura 18. Microfotografías de campo claro mostrando las diferencias cualitativas de inmunorreactividad a la CCK en el área magnocelular de sapos normales (CONTROL, A), de animales deshidratados (Des, B), de animales con sobrecarga de volumen (VL, C) y con sobrecarga salina (SL, D); todos luego de 3 días de sobrevida. Nótese que la población de células ir-CCK encontrada en los animales normales aumenta en el grupo experimental Des (B), pero principalmente en los animales con sobrecarga salina (SL, D); no observándose diferencias en los animales con sobrecarga de volumen (VL, C). La barra de calibración indica: A-D, 125  $\mu$ m.



Figura 19. Microfotografías de campo claro mostrando las diferencias cualitativas de inmunorreactividad a la TH en el área magnocelular de sapos normales (CONTROL, A), de animales deshidratados (Des, B), de animales con sobrecarga de volumen (VL, C) y con sobrecarga salina (SL, D); todos luego de 3 días de sobrevida. Nótese que la población de células ir-TH aumenta en el grupo SL (D) comparada con la de los animales control (A), no muestra casi variación en el grupo VL (C) y es muy escasa en el grupo Des (B). La barra de calibración indica: A-D, 125  $\mu$ m.



Figura 20. Microfotografías de campo claro mostrando las diferencias cualitativas de inmunorreactividad a la NOS en el área magnocelular de sapos normales (CONTROL, A), de animales deshidratados (Des, B), de animales con sobrecarga de volumen (VL, C) y con sobrecarga salina (SL, D); todos luego de 3 días de sobrevida. Nótese que los animales normales casi no presentan inmunotinción a NOS, mientras que los otros grupos experimentales muestran muchas células ir-NOS (B-D); observándose la mayor cantidad de células inmunoteñidas en los animales deshidratados (B). La barra de calibración indica: A-D, 125  $\mu$ m.





Figura 21. Efectos de la deshidratación (D, barras negras), de la sobrecarga salina (SL, barras rayadas) y de la sobrecarga de volumen (VL, barras punteadas) en la expresión de células ir-VP (A), ir-CCK (B), ir-TH (C), ir-NOS (D) comparados con la expresión de estas sustancias neuroactivas en los animales control (barras blancas). Se estudió el área magnocelular del sapo. El tiempo de sobrevida de los animales experimentales fue tres días. El número de neuronas inmunoteñidas se expresa como el promedio  $\pm$  D.E. El análisis estadístico fue hecho usando un ANOVA de un factor con cuatro niveles de tratamiento y con el estadístico de Student. Se realizó un análisis de comparación múltiple con los contrastes de Bonferroni. La significación \*\*:  $P < 0,001$ ;  $N = 6$ .

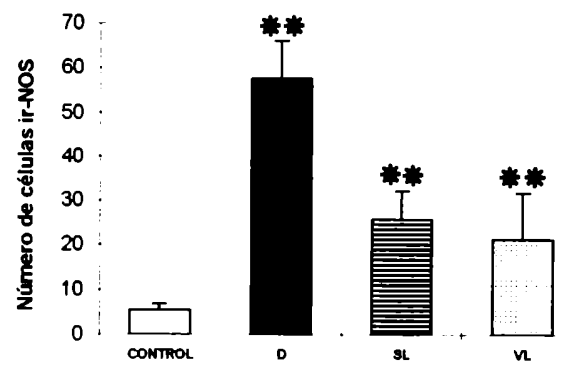
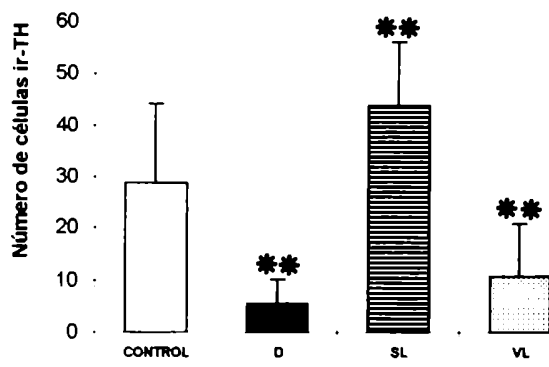
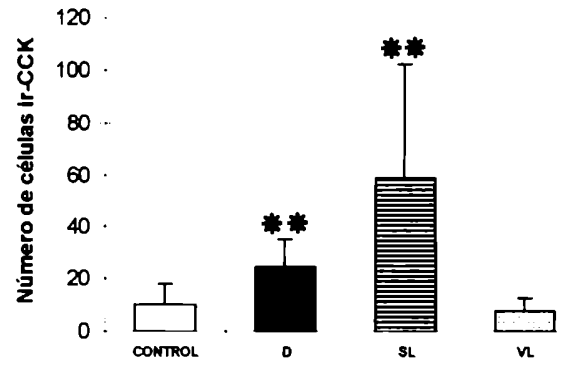
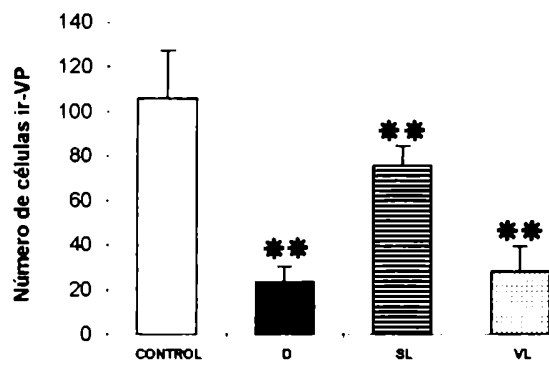
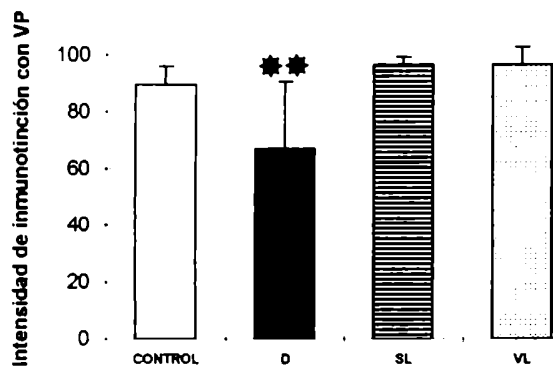
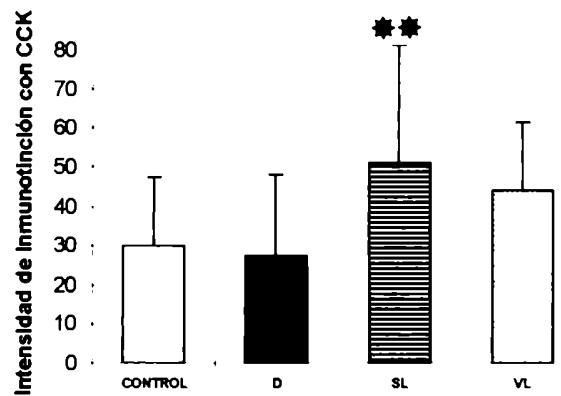


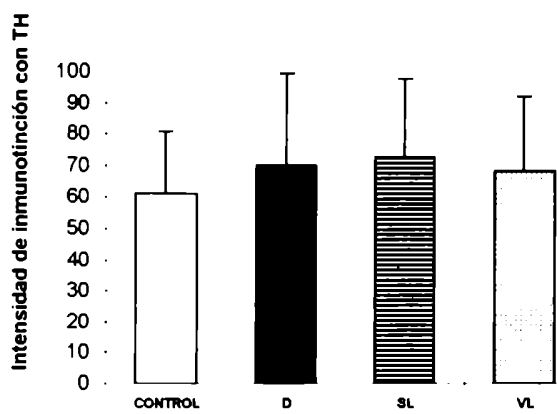
Figura 22. Efectos de la deshidratación (D, barras negras), de la sobrecarga salina (SL, barras rayadas) y de la sobrecarga de volumen (VL, barras punteadas) en la densidad de la inmunotinción de VP (A), de CCK (B), de TH (C), de NOS (D) comparados con la de los animales control (barras blancas) en el área magnocelular del sapo. El tiempo de sobrevida de los animales experimentales fue tres días. La intensidad de la inmunotinción se expresa como el promedio  $\pm$  D.E. El análisis estadístico fue hecho usando un ANOVA con cuatro niveles de tratamiento y con el estadístico de Student. Se realizó un análisis de comparación múltiple con los contrastes de Bonferroni. La significación \*\*:  $P < 0,001$ ;  $N = 6$ .



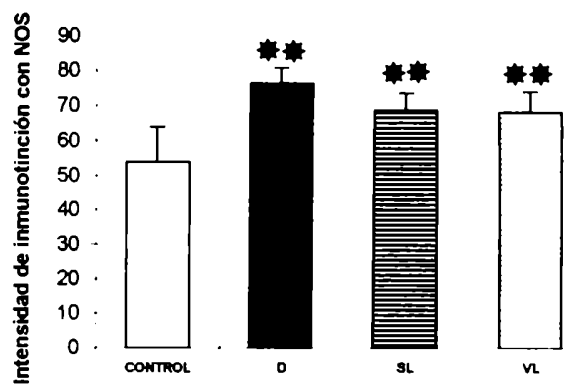
**A**



**B**



**C**



**D**

*7.4. Efectos de la Hibernación Inducida sobre la Expresión de GAL y NOS en el Hipotálamo del Sapo*

Figura 23. Microfotografías de campo claro mostrando las diferencias cualitativas de inmunorreactividad a la GAL en el núcleo preóptico (NPO) de sapos normales (CONTROL, A, C) y de animales con hibernación inducida luego de 2 semanas de tratamiento (Hib, B, D). Nótese que la población de células ir-GAL alrededor del receso preóptico aumenta en los animales experimentales. Los recuadros en A y B se muestran a una magnificación mayor en C y D respectivamente. Las barras de calibración indican: 125  $\mu$ m.

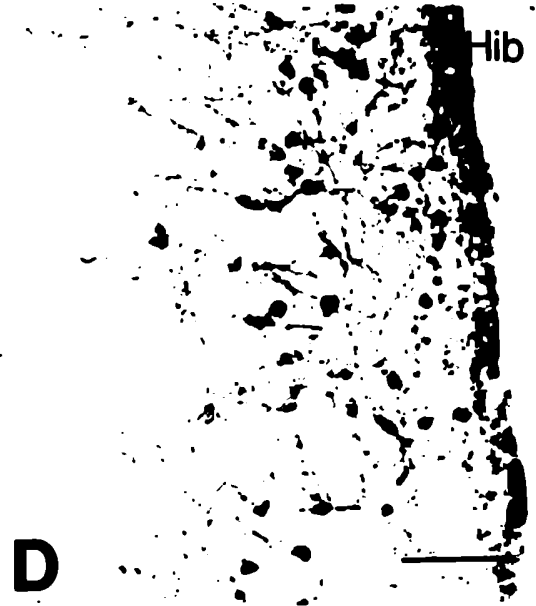
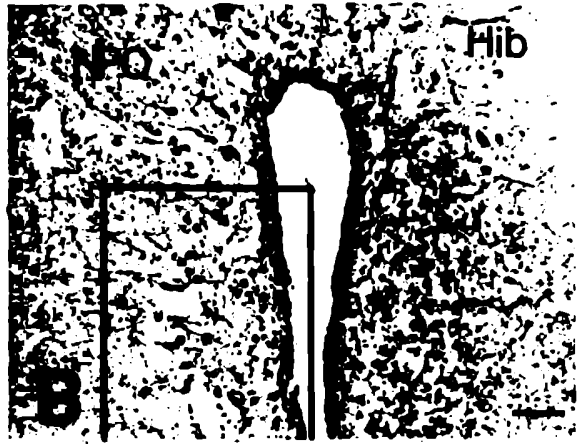
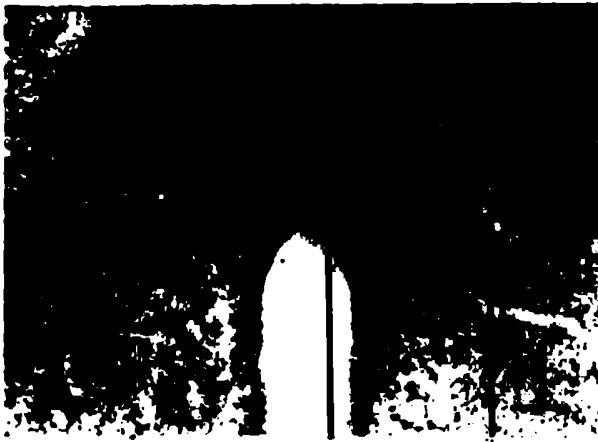


Figura 24. Microfotografías de campo claro mostrando las diferencias cualitativas de inmunorreactividad a la NOS en el área magnocelular de sapos normales (CONTROL, A) y de animales con hibernación inducida luego de 2 semanas de tratamiento (Hib, B-D). Nótese que los animales normales casi no presentan inmunotinción a la NOS, mientras que los animales hibernantes muestran muchas células ir-NOS (B-D). El recuadro en C se muestra a una magnificación mayor en D. Las barras de calibración indican: A-C, 125  $\mu\text{m}$ ; D, 60  $\mu\text{m}$ .



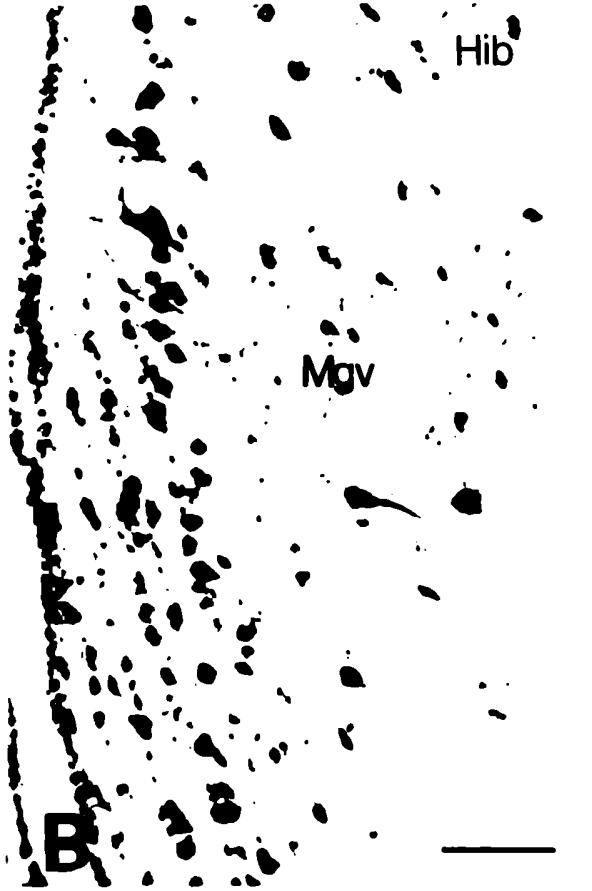
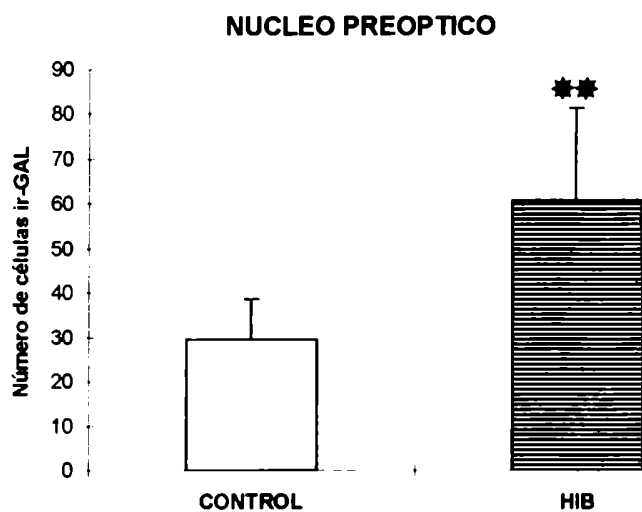
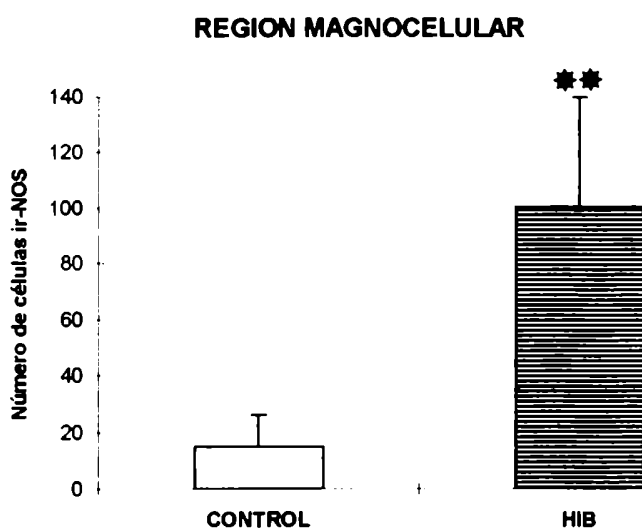


Figura 25. Efecto de la hibernación inducida (barras rayadas) en la expresión de células ir-GAL en el núcleo preóptico (A) y de células ir-NOS en la región magnocelular (B) del sapo, comparado con la expresión de estas mismas sustancias neuroactivas en los animales control (barras blancas). El tiempo de sobrevida en el experimento fue 2 semanas. El número de neuronas inmunoteñidas se expresa como el promedio  $\pm$  D.E. El análisis estadístico fue hecho usando un ANOVA de un factor con dos niveles de tratamiento y con el estadístico de Student. La significación \*\*:  $P < 0,001$ ;  $N = 7$ .



**A**



**B**

*7.5. Experimentos de Transporte Axonal Retrógrado*

Figura 26. Microfotografías que muestran la distribución de fibras y células magnocelulares dorsales (Mgd) teñidas con el trazador Dil, luego de ser transportado en forma retrógrada desde el lóbulo neural. Nótese que en C también se marcan algunas neuronas en el área magnocelular ventral (Mgv). Las barras de calibración indican: A, 20  $\mu\text{m}$ ; B, C, 125  $\mu\text{m}$ .

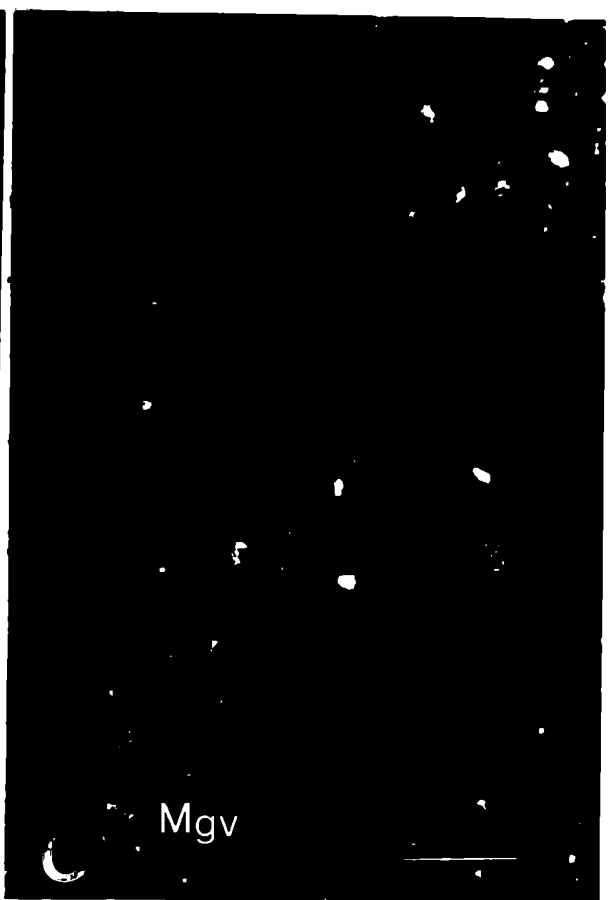
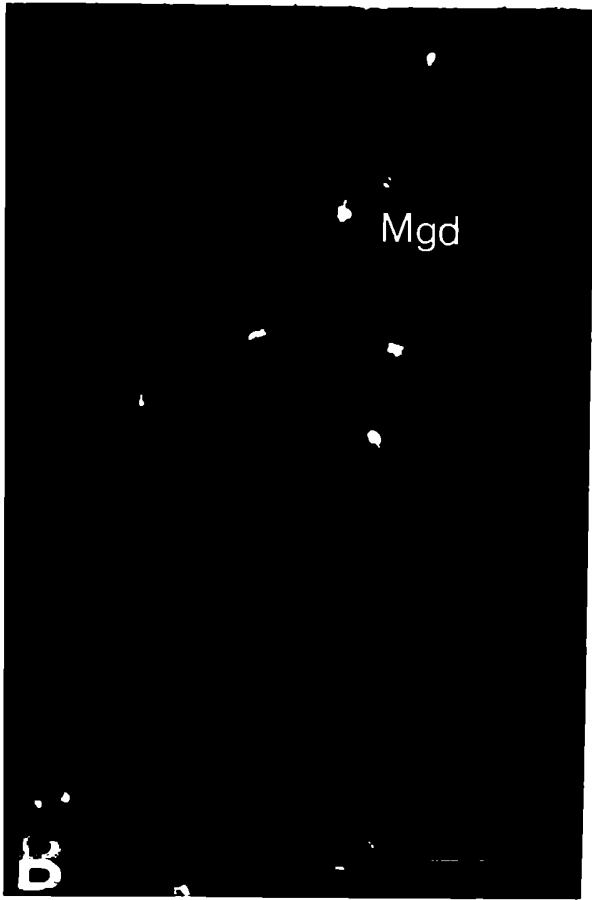
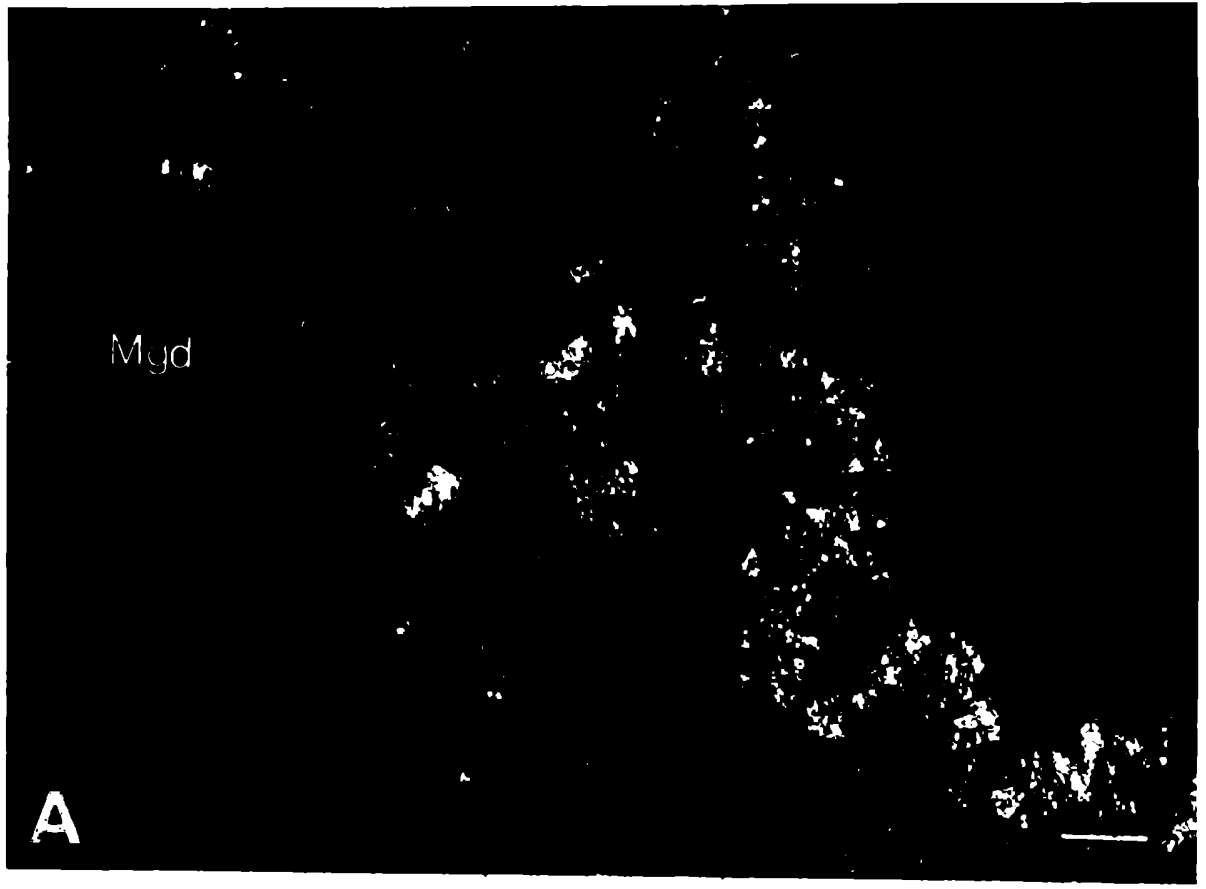


Figura 27. Microfotografías donde se observa una alta cantidad de fibras y células magnocelulares ventrales marcadas con el marcador fluorescente de flujo axonal retrógrado Fluorogold (A-D). La inyección del trazador se realizó en la eminencia media, aunque también abarcó al lóbulo neural. El área encerrada en A se muestra a una magnificación mayor en B. Las barras de calibración indican: A, C, 80  $\mu\text{m}$ ; B, D, 100  $\mu\text{m}$ .

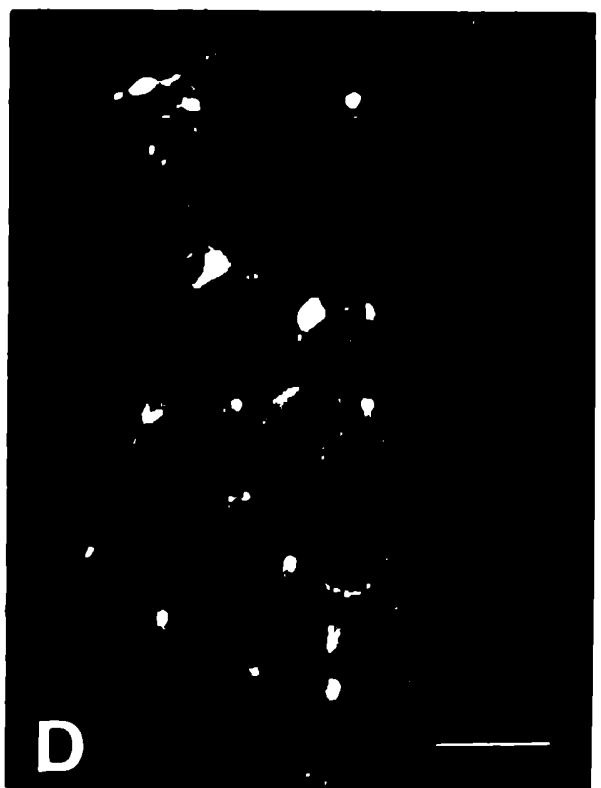
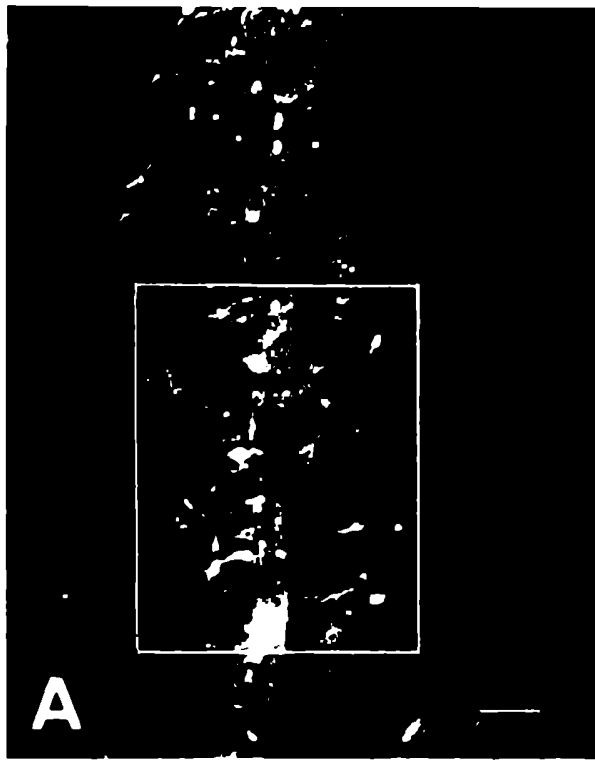
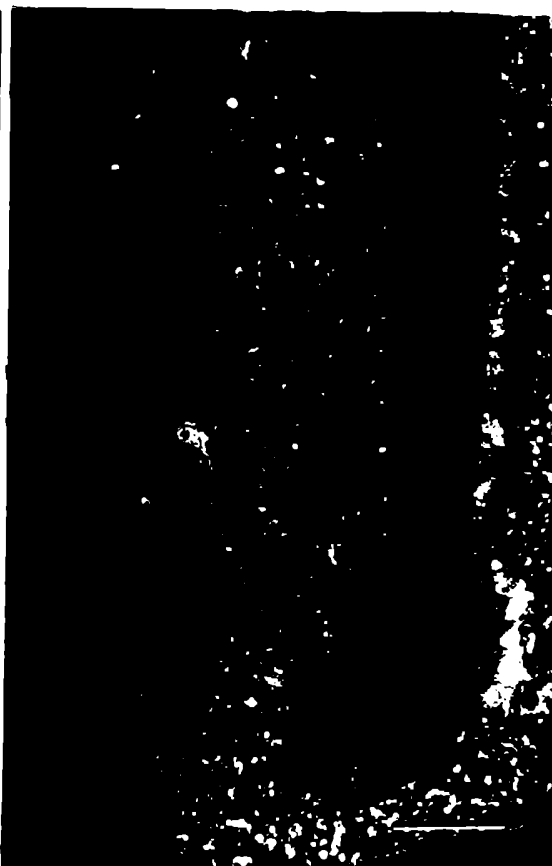
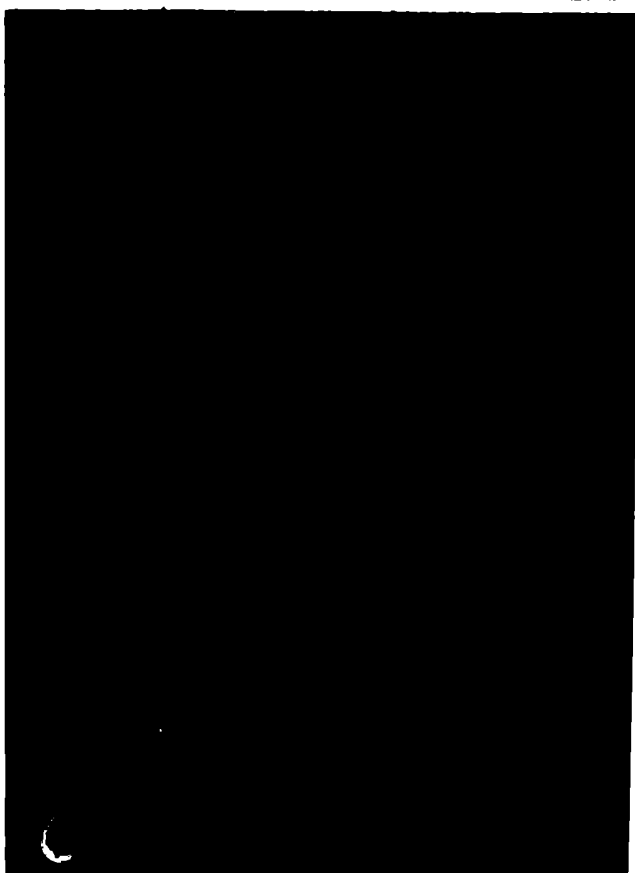
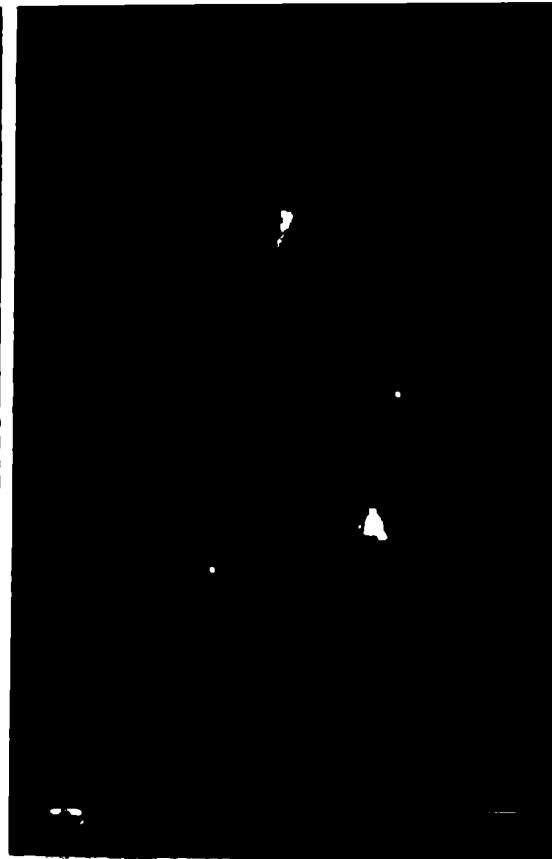




Figura 28. Microfotografías de fluorescencia mostrando la marcación con el trazador Dil. Cuando la inyección se realiza en la eminencia media y el lóbulo neural se observan células teñidas en la región magnocelular (Mg, A, B) y fibras marcadas en forma transomática en el núcleo preóptico (NPO, C, D). Las barras de calibración indican: A, C, 125  $\mu\text{m}$ ; B, D, 60  $\mu\text{m}$ .



## **8. LISTA DE ABREVIATURAS**

A: núcleo talámico anterior  
AC: comisura anterior  
ACTH: hormona adrenocorticotrofina  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
Al: amígdala lateral  
Am: amígdala medial  
AMPC: adenosín monofosfato cíclico  
ANP: péptido atrial natriurético  
ARNm: ácido ribonucleico mensajero  
ATP: adenosín trifosfato  
Ava: área talámica ventral anterior  
Avl: área talámica ventrolateral  
Avm: área talámica ventromedial  
C: núcleo talámico central  
CCK: colecistoquinina  
CGRP: péptido ligado al gen de calcitonina  
CRH: hormona liberadora de corticotrofina  
D: animales deshidratados por tres días  
DH: núcleo hipotalámico dorsal  
Dil: perclorato de 1,1'-Dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetrametilindocarbocianina  
DYN: dinorfina  
EM: eminencia media  
ENK: encefalinas  
FCS: fluido cerebro espinal  
GABA: ácido gama amino butírico

GAL: galanina

GH: hormona de crecimiento

GHRH: hormona liberadora de GH

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

HPX: animales hipofisectomizados

HPX+TRANSP: animales hipofisectomizados e inmediatamente autotransplantados con  
hipófisis

ir-: inmunorreactivas

La: núcleo talámico lateral, división anterior

LFB: fascículo lateral del cerebro anterior

LH: hipotálamo lateral

LHRH: hormona liberadora de la hormona luteinizante

ME: eminencia media

Mgd: núcleo preóptico magnocelular, parte dorsal

Mgv: núcleo preóptico magnocelular, parte ventral

MSH: hormona estimulante de los melanocitos

MT: mesotocina

NA: noradrenalina

NAD: núcleo anterodorsal del tegmentum mesencefálico

NADPH: fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido

NAS: núcleo acumbens

NAV: núcleo anteroventral del tegmentum mesencefálico

NC: núcleo cuneatus

NDB: núcleo de la banda diagonal de Broca

NEP: núcleo entopeduncular

NG: núcleo gracilis

NGF: factor de crecimiento del nervio

NI: núcleo istmi

NID: núcleo infundibular dorsal

NIV: núcleo infundibular ventral

NLS: núcleo septal lateral

NMS: núcleo septal medial

NO: óxido nítrico

NOS: sintetasa de óxido nítrico

NPD: núcleo posterodorsal del tegmentum mesencefálico

NPO: núcleo preóptico

NPV: núcleo posteroventral del tegmentum mesencefálico

NPvO: núcleo del órgano paraventricular

NPY: neuropéptido tirosina

NS: núcleo del tracto solitario

NT: neurotensina

OC: quiasma óptico

OXY: oxitocina

P: núcleo talámico posterior

PBS: buffer fosfato de sodio

PD: palio dorsal

Pds: pars distalis

PDX: animales pars distalectomizados

PDX+GH: animales pars distalectomizados con terapia de reemplazo con GH

PDX+SL: animales pars distalectomizados con terapia de reemplazo con solución salina

**PDX+TRANSP: animales pars distalectomizados e inmediatamente autotransplantados con  
pars distalis**

**PHI: péptido histidina isoleucina**

**PI: lóbulo intermedio de la hipófisis**

**PLd: palio lateral, parte dorsal**

**PLv: palio lateral, parte ventral**

**PM: palio medial**

**PN: lóbulo neural de la hipófisis**

**PRL: prolactina**

**PYY: péptido doble tirosina**

**RIA: radioinmunoanálisis**

**Sc: núcleo supraquiasmático**

**SGC: lámina gris central del tectum**

**SGP: lámina gris periventricular del tectum**

**SGS: lámina gris superficial del tectum**

**SL: animales con sobrecarga salina**

**SNC: sistema nervioso central**

**SP: sustancia P**

**Std: estriado dorsal**

**Stv: estriado ventral**

**TH: tirosina hidroxilasa**

**TP: tubérculo posterior**

**TRH: hormona liberadora de tirotrófina**

**TS: torus semicircularis**

**TSH: hormona tiroestimulante**

VH: hipotálamo ventral

VIP: polipéptido intestinal vasoactivo

VL: animales con sobrecarga de volumen

VP: vasopresina

VT: arginina-vasotocina

IX: lámina nueve del asta ventral de la médula espinal



## **9. REFERENCIAS**

- Acher R., Chauvet J., Chauvet M.T. y Crepy D. (1964) Phylogénie des peptides neurohypophysaires (Ileu8-ocytocine) de la grenouille, intermédiaire entre la Ser3-Ileu8-ocytocine des mammifères. *Biochem. Biophys. Acta* 90: 613-615.
- Acher R., Chauvet J., Lenci M.J., Morel F. y Maetz J. (1960) Présence d'une vasotocine dans la neurohypophyse de la grenouille (*Rana esculenta* L.). *Biochem. Biophys. Acta* 42: 379-380.
- Acland P., Dixon M., Peters G. y Dickson C. (1990) Subcellular fate of the int-2 oncoprotein is determined by choice of initiation codon. *Nature* 343: 662-665.
- Adams J.H., Daniel P.M. y Prichard M.M.L. (1968) Regrowth of nerve fibers in the neurohypophysis: regeneration of a tract of the central nervous system. *J. Physiol.* 198: 4P-5P'.
- Adams J.H., Daniel P.M. y Prichard M.M.L. (1969) Degeneration and regeneration of hypothalamic nerve fibers in the neurohypophysis after pituitary stalk section in the ferret. *J. Comp. Neurol.* 135: 121-144.
- Akabayashi A., Zaia C.T., Koenig J.I., Gabriel S.M., Silva I. y Leibowitz S.F. (1994) Diurnal rhythm of galanin-like immunoreactivity in the paraventricular and suprachiasmatic nuclei and other hypothalamic areas. *Peptides* 15: 1437-1444.
- Allen J.M., Novotny J., Martin J. y Heinrich G. (1987) Molecular structure of mammalian neuropeptide Y: analysis by molecular cloning and computer-aided comparison with crystal structure of avian homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2532-2536.
- Alper R.H., Demarest K.T. y Moore K.E. (1980) Dehydration selectively increases dopamine synthesis in the tuberohypophyseal dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology* 31: 112-115.

- Amara S.J., Jonas V., Rosenfeld M.G., Ong E.S. y Evans R.M. (1982) Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298: 240-244.
- Andersen A.C., Tonon M-C., Pelletier G., Conlon J.M., Fasolo A. y Vaudry H. (1993) Neuropeptides in the amphibian brain. *Int. Rev. Cytol.* 138: 89-210.
- Andersson B. (1977) Regulation of body fluids. *Ann. Rev. Physiol.* 39: 185-200.
- Anglade I., Wang Y., Jensen J., Tramu G., Kah O. y Conlon J.M. (1994) Characterization of trout galanin and its distribution in trout brain and pituitary. *J. Comp. Neurol.* 350: 63-74.
- Anhut H., Meyer D.K. y Knepel W. (1983) Cholecystokinin-like immunoreactivity of the rat medial basal hypothalamus: investigations of a possible hypophysiotropic function. *Neuroendocrinology* 36: 119-124.
- Antal M. y Petkó M. (1990) Retrograde transport of the lectin *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in frog central nervous system. *J. Histoche. Cytoche.* 38: 1913-1917.
- Arai R. y Callas A. (1991) Ultrastructural localization of galanin immunoreactivity in the rat median eminence. *Brain Res.* 562: 339-343.
- Aronson L.R. y Noble G.K. (1945) The sexual behavior of Anura 2. Neural mechanisms controlling mating in the male leopard frog, *Rana pipiens*. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 86: 87-139.
- Arvat E., Gianotti L., Ramunni J., Grottoli S., Brossa P.C., Bertagna A., Camanni F. y Ghigo E. (1995) Effect of galanin on basal and stimulated secretion of prolactin, gonadotropins, thyrotropin, adrenocorticotropin and cortisol in humans. *Eur. J. Endocrinol.* 133: 300-304.
- Arvat E., Ramunni J., Gianotti L., Di Vito L., Maccario M., Camanni F. y Ghigo E. (1995) Interaction of salbutamol and galanin on both basal and growth hormone releasing

hormone-stimulated growth hormone secretion in humans. *J. Endocrinol. Invest.* 18: 324-328.

Arvidsson U., Ulfhake B., Cullheim S., Bergstrand A., Theodorsson E. y Hökfelt T. (1991) Distribution of <sup>125</sup>I-galanin binding sites, immunoreactive galanin, and its coexistence with 5-hydroxytryptamine in the cat spinal cord; biochemical, histochemical, and experimental studies at the light and electron microscopic level. *J. Comp. Neurol.* 308: 115-138.

Arvidsson U., Johnson H., Piehl F., Cullheim S., Hökfelt T., Risling M., Terenius L. y Ulfhake B. (1990) Peripheral nerve section induces increased levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in axotomized motoneurons. *Exp. Brain Res.* 79: 212-216.

Aspesslagh M.R., Vandesande F. y Dierickx K. (1976) Electron microscopic immunocytochemical demonstration of separate neurophysin-vasopressinergic and neurophysin-oxytocinergic nerve fibers in the neural lobe of the rat hypophysis. *Cell Tissue Res.* 171: 31-37.

Balment R.J., Brimble M.J. y Forsling M.L. (1980) Release of oxytocin induced by salt-loading and its influence on renal excretion in the male rat. *J. Physiol.* 308: 439-449.

Barajon I., Bersani M., Quartu M., Del-Fiacco M., Cavaletti G., Holst J.J. y Tredici G. (1996) Neuropeptides and morphological changes in cisplatin-induced dorsal root ganglion neuronopathy. *Exp. Neurol.* 138: 93-104.

Barde Y.-A. (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2: 1525-1534.

Barron K.D. (1983) Comparative observations on the cytologic reactions of central and peripheral nerve cells to axotomy. In: *Spinal cord reconstruction* (Kao C.C., Bunge R.P. y Reier P.J. eds.), pp. 7-40 (Raven Press, New York).

- Bartels W. (1971) Die ontogenese der aminhaltigen neuronensystema im gehirn von *R. temporaria*. Z. Zellforsch. 116: 94-118.
- Bartfai T., Bedecs K., Land T., Langel Ü., Bertorelli R., Girotti P., Consolo S., Xu X., Wiesenfeld-Hallin Z., Nilsson S., Pieribone V. y Hökfelt T. (1991) M-15: High-affinity chimeric peptide that blocks the neuronal actions of galanin in the hippocampus, locus coeruleus, and spinal cord. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10961-10965.
- Bartfai T., Hökfelt T. y Langel Ü. (1993) Galanin - A neuroendocrine peptide. Crit. Rev. Neurobiol. 7: 229-274.
- Batten T.F.C., Moons L., Cambre M. y Vandesande F. (1990) Anatomical distribution of galanin-like immunoreactivity in the brain and pituitary of teleost fishes. Neurosci. Lett. 111: 12-17.
- Bauer F.E., Adrian T.E., Yanaihara N., Polak J.M. y Bloom S.R. (1986a) Chromatografic evidence for high-molecular-mass galanin immunoreactivity in pig and cat adrenal glands. FEBS Lett. 201: 327-331.
- Bauer F.E., Christofides N.D., Hacker G.W., Blank M.A., Polak J.M. y Bloom S.R. (1986b) Distribution of galanin immunoreactivity in the genitourinary tract of man and rat. Peptides 7: 5-10.
- Bauer F.E., Venetikonou M., Burrin J.M., Ginsberg L., MacKay D.J. y Bloom S.R. (1986c) Growth hormone release in man induced by galanin, a new hypothalamic peptide. The Lancet 26: 192-195.
- Bauer F.E., Zintel A., Kenny M.J., Calder D., Ghatei M.A. y Bloom S.R. (1989) Inhibitory effect of galanin on postprandial gastrointestinal motility and gut hormone release in humans. Gastroenterology 97: 260-264.

- Baumgarten H.G., Björklund A., Holstein A.F. y Nobin A. (1972) Organization and ultrastructural identification of the catecholamine nerve terminals in the neural lobe and pars intermedia of the rat pituitary. *Z. Zellforsch.* 126: 483-517.
- Beal M.F., Gabriel S.M., Swartz K.J. y MacGarver U.M. (1988) Distribution of galanin-like immunoreactivity in baboon brain. *Peptides* 9: 847-851.
- Bean A.J. y Roth R.H. (1991) Extracellular dopamine and neurotensin in rat prefrontal cortex in vivo: effects of medial forebrain bundle stimulation frequency, stimulation pattern, and dopamine autoreceptors. *J. Neurosci.* 11: 2694-2702.
- Beck E. y Daniel P.M. (1961) Degeneration and regeneration in the hypothalamus. *Proc. Anat. Soc. London* p. 60.
- Beinfeld M.C., Meyer D.K., Eskay R.L., Jensen R.T. y Brownstein M.J. (1981) The distribution of cholecystinin immunoreactivity in the central nervous system of the rat as determined by radioimmunoassay. *Brain Res.* 212: 51-57.
- Ben-Ari Y. (1990) Galanin and glibenclamide modulate the anoxic release of glutamate in rat CA3 hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2: 62-68.
- Bentley P.J. (1969) Neurohypophysial hormones in amphibia. A comparison of their actions and storage. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13: 39-44.
- Berkemeier L.R., Winslow J.W., Kaplan D.R., Nikolics K., Goeddel D.V. y Resenthal A. (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trk b. *Neuron* 7: 857-866.
- Berrettini W.H., Kaye W.H., Sunderland T., May C., Gwirtsman H.E., Mellou A. y Albright A. (1988) Galanin immunoreactivity in human CSF; studies in eating disorders and Alzheimer's disease. *Neuropsychobiol.* 19: 64-68.

- Billenstien D.C. y Lévèque T.F. (1955) The reorganization of the neurohypophyseal stalk following hypophysectomy in the rat. *Endocrinology* 56: 704-717.
- Bissette G., Griff D., Carnes M., Goodman B., Lavine M. y Levant B. (1995) Apparent seasonal rhythms in hypothalamic neuropeptides in rats without photoperiod changes. *Endocrinology* 136: 622-628.
- Bogert C.M. (1949) Thermoregulation in reptiles, a factor in evolution. *Evolution* 3: 195-211.
- Bondy C.A., Jensen R.T., Brady L.S. y Gainer H. (1989a) Cholecystokinin evokes secretion of oxytocin and vasopressin from rat neural lobe independent of external calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5198-5201.
- Bondy C.A., Whitnall M.H., Brady L.S. y Gainer H. (1989b) Coexisting peptides in hypothalamic neuroendocrine systems: Some functional implications. *Cell. Mol. Neurobiol.* 9: 427-446.
- Booher R.N., Alfa C.E., Hyams J.S. y Beech D. (1989) The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* 58: 485-497.
- Bouche G., Gas N., Prats H., Baldin V., Tauber J.P., Teissie J. y Almeric F. (1987) Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABIAE cells undergoing G0-G1 transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6770-6774.
- Braak H. (1970) Biogene amine im gehirn vom frosch (*R. esculenta*). *Z. Zellforsch.* 106: 269-308.
- Bradwejn J., Koszycki D y Meterissian G. (1990) Cholecystokinin-tetrapeptide induces panic attacks in patients with panic disorder. *Can. J. Psychiatry* 35: 83-85.
- Brattstrom B.H. (1963) A preliminary review of the thermal requirements of amphibians. *Ecology* 44: 238-255.

- Bredt D.S., Hwang P.M. y Snyder S.H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-770.
- Bredt D.S. y Snyder S.H. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8: 3-11.
- Brenneman D.E. y Eiden L.E. (1986) Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1159-1162.
- Brown P.S. y Brown S.C. (1982) Effects of hypophysectomy and prolactin on the water-balance response of the newt, *Taricha torosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 46: 7-12.
- Brownstein M.J. y Mezey E. (1986) Multiple chemical messengers in hypothalamic magnocellular neurons. In: *Progress in Brain Research* (Hökfelt T., Fuxe K. y Pernow B., eds.), Vol. 68, pp. 161-168 (Elsevier, Amsterdam).
- Budtz P. (1970) Effect of transection at different levels of hypothalamus on the hypothalamo-hypophysial system of the toad, *Bufo bufo*, with particular reference to the ultrastructure of the zona externa of the median eminence. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 107: 210-233.
- Buijs R.M. (1987) In: *Vasopressin: "Principles and Properties"* (Gash D.M. y Boer G.J., eds.), pp. 91-115 (Plenum, New York).
- Buijs R., Swaab K.F., Dogterom J. y Van Leeuwen F.W. (1978) Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tiss. Res.* 186: 423-433.
- Burgevin M.-C., Castel M.-C., Quarteronet D., Chevet T. y Laduron P.M. (1992) Neurotensin increases tyrosine hydroxylase mRNA in substantia nigra after axonal transport. *Neuroscience* 49: 627-633.



- Calzà L., Giardino L. y Ceccatelli S. (1993) NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. *NeuroReport* 4: 627-630.
- Card J.P., Brecha N., Karten H.J. y Moore R.Y. (1981) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J. Neurosci.* 1: 1289-1303.
- Carr J.A. y Norris D.O. (1990) Immunohistochemical localization of corticotropin-releasing factor- and arginine vasotocin-like immunoreactivities in the brain and pituitary of the American bullfrog (*Rana Catesbeiana*) during development and metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 180-188.
- Castel M.N., Malgouris C., Blanchard J.C. y Laduron P.M. (1990) Retrograde axonal transport of neurotensin in the dopaminergic nigrostriatal pathway in the rat. *Neuroscience* 36: 425-430.
- Castro M.G., Tomasec P., Morrison E., Murray C.A., Hodge P., Blanning P., Linton E., Lowry P.J. y Lowenstein P.R. (1995) Mitogenic effects and nuclear localisation of procorticotrophin-releasing hormone expressed within stably transfected fibroblast cells (CHO-K1). *Mol. Cell Endocrinol.* 107: 17-27.
- Ceccatelli S., Diana A., Villar M.J. y Nicotera P. (1995) Adrenocortical apoptosis in hypophysectomized rats is selectively reduced by ACTH. *NeuroReport* 6: 342-344.
- Ceccatelli S., Eriksson M. y Hökfelt T. (1989) Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 49: 309-323.
- Chang A.C.Y., Cochet M. y Cohen S.N. (1980) Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4890-4894.

- Chan-Palay V. (1988a) Neurons with galanin innervate cholinergic cells in the human basal forebrain and galanin and acetylcholine coexist. *Brain Res. Bull.* 21: 465-472.
- Chan-Palay V. (1988b) Galanin hyperinnervates surviving neurons of the human basal nucleus of Meynert in dementias of Alzheimer's and Parkinson's disease: a hypothesis for the role of galanin in accentuating cholinergic dysfunction in dementia. *J. Comp. Neurol.* 273: 543-557.
- Chan-Palay V. y Palay S.L. (eds.) (1984) Coexistence of neuroactive substances in neurons. (Wiley, New York).
- Chan-Palay V., Zaborsky L., Köhler C., Goldstein M. y Palay S.L. (1984) Distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the hypothalamus of rats. *J. Comp. Neurol.* 227: 467-486.
- Chartrel N., Conlon J.M., Danger J.M., Fournier A., Tonon M.C. y Vaudry H. (1991a) Characterization of melanotropin-release-inhibiting factor (melanostatin) from frog brain: homology with human neuropeptide Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3862-3866.
- Chartrel N., Tonon M.C., Vaudry H. y Conlon J.M. (1991b) Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. *Endocrinology* 129: 3367-3371.
- Chartrel N., Wang Y., Fournier A., Vaudry H. y Conlon J.M. (1995) Frog vasoactive intestinal polypeptide and galanin: primary structures and effects on pituitary adenylate cyclase. *Endocrinology* 136: 3079-3086.
- Chen R., Lewis K.A., Perrin M.H. y Vale W.W. (1993) Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8967-8971.
- Chemetski K.E. (1964) Sympathetic enhancement of peripheral sensory input in the frog. *J. Neurophysiol.* 27: 493-515.

- Ch'ng J.L., Christofides N.D., Suzuki H., Yiangou Y., Stephanou A., Tatemoto K., Polak J.M. y Bloom S.R. (1984) Distribution of galanin immunoreactivity (GIR) in the central nervous tissue and gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* 29 (suppl.), 175.
- Ch'ng J.L.C., Christofides N.D., Anad P., Gibson P.J., Allen Y.S., Su H.C., Tatemoto K., Morrison J.F.B., Polak J.M. y Bloom S.R. (1985) Distribution of galanin immunoreactivity in the central nervous system and the response of galanin-containing neuronal pathways to injury. *Neuroscience* 16: 343-354.
- Christ J.F. (1962) The early changes in the hypophysial neurosecretory fibers after coagulation. *Mem. Soc. Endocrinol.* 12: 125-147.
- Christ J.F. (1966) In: *The pituitary gland* (Harris W.G. y Donovan B.T., eds.), Vol. III, pp. 62-130 (Univ. of California Press, Berkeley, California).
- Chronwall B.M., DiMaggio D.A., Massari V.J., Pickel V.M., Ruggiero D.A. y O'Donohue T.L. (1985) The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons of the rat brain. *Neuroscience* 15: 1159-1181.
- Coons A.H. (1958) Fluorescent antibody methods. In: *General cytochemical methods* (Danielli J.F. ed.), pp. 399-422 (Academic Press, New York).
- Cortés R., Villar M.J., Verhofstad A. y Hökfelt T. (1990a) Effects of CNS lesions on the expression of galanin: A comparative in situ hybridization and immunohistochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 7742-7746.
- Cortés R., Ceccatelli S., Schalling M. y Hökfelt T (1990b) Differential effects of intracerebroventricular colchicine administration on the expression of mRNAs for neuropeptides and neurotransmitter enzymes, with special emphasis on galanin: an in situ hybridization study. *Synapse* 6: 369-391.

- Costa E., Corda M. y Guidotti A. (1983) On a brain polypeptide functioning as a putative effector for the recognition sites of benzodiazepines and beta-carboline derivatives. *Neuropharmacology* 22: 1481-1492.
- Costa M., Furness J. y Gibbins I. (1986) Chemical coding of enteric neurons. *Prog. Brain Res.* 68: 217-239.
- Cowles R.B. (1940) Additional implications of reptilian sensitivity to high temperatures. *Amer. Nat.* 74: 542-561.
- Crawley J.N., Austin M.C., Fiske S.M., Martin B., Consolo S., Berthold M., Langel U., Fisone G. y Bartfai T. (1990) Activity of centrally administered galanin fragments on stimulation of feeding behavior and on galanin receptor binding in the rat hypothalamus. *J. Neurosci. Res.* 10: 3695-3700.
- Crawley J.N., Robinson J., Langel Ü. y Bartfai T. (1993) Galanin receptor antagonists M 40 and C 7 block galanin-induced feeding. *Brain Res.* 600: 268-272.
- Crawley J.N. y Wenk G. (1989) Co-existence of galanin and acetylcholine: Is galanin involved in memory processes and dementia? *TINS.* 12: 278-282.
- Cree A. (1988) Effects of arginine vasotocin on water balance of three leiopelmatid frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 72: 340-350.
- Crosby E.C. y Woodburne R.T. (1940) The comparative anatomy of the preoptic area and the hypothalamus. *Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 20: 52-169.
- Crowe M.J., Brown T.J., Bresnahan J.C. y Beattie M.S. (1995) Distribution of NADPH-diaphorase reactivity in the spinal cord of metamorphosing and adult *Xenopus laevis*. *Develop. Brain Res.* 86: 155-166.
- Cuello A. (ed.) (1982) *Co-transmission* (Macmillan, London y Basingstoke).

- Cunjak R.A. (1986) Winter habitat of northern leopard frogs, *Rana pipiens* in a southern Ontario stream. *Can. J. Zool.* 64: 255-257.
- Dalsgaard C.-J. (1988) The sensory system. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy. The peripheral nervous system (Björklund A., Hökfelt T. y Owman C. eds.), Vol. 6, pp. 599-636 (Elsevier, Amsterdam).
- Davis T.M.E., Burrin J.M. y Bloom S.R. (1987) Growth hormone (GH) release in response to GH-releasing hormone in man is 3-fold enhanced by galanin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 1248-1252.
- Dawson T.M., Dawson V.L. y Snyder S.H. (1992) A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann. Neurol.* 32: 297-311.
- Day N.C., Hall M.D. y Hughes J. (1989) Modulation of hypothalamic cholecystokinin receptor density with changes in magnocellular activity: a qualitative autoradiographic study. *Neuroscience* 29: 371-383.
- de Bold A., Borenstein H.B., Veress A.T. y Sonnenberg H. (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 28: 89-94.
- degli-Uberti E.C., Salvadori S., Trasforini G., Ambrosio M.R., Margutti A., Bondanelli M., Rossi R. y Valentini A. (1995) Differential effects of deltorphin on arginine and galanin-induced growth hormone secretion in healthy man. *Regul. Pept.* 58: 41-46.
- Dellmann H.D. y Dale H.E. (1966) Morphology, structure and vasotocin content of the neurosecretory hypothalamo-hypophyseal system of the grass frog (*Rana pipiens*) under normal and experimental conditions. *Anat. Rec.* 154: 336-337.
- Dellmann H.D. y Carithers J. (1992) Development of neural lobe-like neurovascular contact regions after intrahypothalamic transection of the hypothalamo-neurohypophysial tract. *Brain Res.* 585: 19-27.

- Dellmann H.D., Lue L.F. y Bellin S.I. (1987) Fine structural characteristic of neurophysin-positive perivascular plexus that develop in the rat hypothalamus following interruption of the hypothalamo-neurohypophysial tract. *Cell Tiss. Res.* 247: 137-143.
- Dellmann H.D. y Owsley P.A. (1969) Investigations on the hypothalamo-neurohypophysial neurosecretory system of the grass frog (*Rana pipiens*) after transection of the proximal neurohypophysis. II: Light- and electron-microscopic findings in the disconnected distal neuro-hypophysis with special emphasis on the pituicytes. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 94: 325-337.
- Dellmann H.D. y Rodríguez E.M. (1970a) In: Aspects of neuroendocrinology (Bargmana W. y Scharrer B., eds.), pp. 123-139 (Springer-Verlag, Berlin y New York).
- Dellmann H.D. y Rodríguez E.M. (1970b) Herring Bodies; an electron microscopic study of local degeneration and regeneration of neurosecretory axons. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 111: 293-315.
- Dellmann H.D. y Rodríguez E.M. (1970c) Comparative study of the ultrastructure and hormonal content of the proximal and distal stumps of the transected neurosecretory hypothalamo-hypophysial system. *Experientia* 26: 414-415.
- de Montigny C. (1989) Cholecystokinin tetrapeptide induces panic-like attacks in healthy volunteers. Preliminary findings. *Arch. Gen. Psychiatry* 46: 511-517.
- Denis-Donini S. (1989) Expression of dopaminergic phenotypes in the mouse olfactory bulb induced by the calcitonin gene-related peptide. *Nature* 339: 701-703.
- de Quidt M.E. y Emson P.C. (1986) Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system. II. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 18: 545-618.

- Deschepper C., Lotstra F., Vandesande F. y Vanderhaeghen J.-J. (1983) Cholecystokinin varies in the posterior pituitary and external median eminence of the rat according to factors affecting vasopressin and oxytocin. *Life Sci.* 32: 2571-2577.
- Diepen R. (1962) In: "Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen" (Bargmann W., ed.), Vol. IV, Pt. 7, pp. 1-525 (Springer-Verlag, Berlin y New York).
- Dierickx K. (1962) The dendrites of the preoptic neurosecretory nucleus of *R. temporaria* and the osmoreceptors. *Naturwissenschaften* 49: 405-406.
- Dierickx K. (1980) Immunocytochemical localization of the vertebrate cyclic nonapeptide neurohypophysial hormones and neurophysins. *Int. Rev. Cytol.* 62: 119-185.
- Dierickx K., Druyts A., Vandenberghe M.P. y Goossens N. (1972) Identification of adenohipophysiotropic neurohormone producing neurosecretory cells in *R. temporaria*. Ultrastructural evidence for the presence of neurosecretory cells in the tuber cinereum. *Z. Zellforsch.* 134: 459-504.
- Dierickx K. y Vandesande F. (1977) Immunocytochemical localization of the vasopressinergic and oxytocinergic neurons in the human hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 184: 15-27.
- Dirnagl U., Lindauer U. y Villringer A. (1993) Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats. *Neurosci. Lett.* 149: 43-46.
- Doerr-Schott J., Garaud J.C. y Clauss R.O. (1979) Immunohistochemical localization of a gastrin-like peptide in the brain of an amphibian, *Xenopus laevis* Daud. *Cell Tissue Res.* 203: 65-78.
- Doerr-Schott J. y Garaud J.C. (1981) Ultrastructural identification of gastrin-like immunoreactive nerve fibres in the brain of *Xenopus laevis* by means of colloidal gold or ferritin immunocytochemical methods. *Cell Tiss. Res.* 216: 581-589.

- Dogterom J., Van Wimersma Greidanus T.J.B. y Swaab D.F. (1977) Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebro-spinal fluid: Measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats. *Neuroendocrinology* 24: 108-118.
- Dohanics J., Kovacs K.J. y Makara G.B. (1990) Oxytocinergic neurons in rat hypothalamus. Dexamethasone-reversible increase in their corticotropin-releasing factor-41-like immunoreactivity in response to osmotic stimulation. *Neuroendocrinology* 51: 515-522.
- Donoso A.O. y Segura E.T. (1965) Seasonal variations of plasma adrenaline and noradrenaline in toads. *Gen. Comp. Endocr.* 5: 440-443.
- Dourish C.T., O'Neill M.F., Coughlan J., Kitchener S.J., Hawley D. y Iversen S.D. (1990) The selective CCK-B receptor antagonist L-365,260 enhances morphine analgesia and prevents morphine tolerance in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 176: 35-44.
- Dourish C.T., Rycroft W. y Iversen S.D. (1989) Postponement of satiety by blockade of brain cholecystokinin (CCK-B) receptors. *Science* 245: 1509-1511.
- Drager G.A. (1950) Neurosecretion following hypophysectomy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 75: 712-713.
- Duggan A.W., Hope P.J., Jarrott B., Schaible H.G. y Fleetwood W.S. (1990) Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. Studies with antibody microprobes. *Neuroscience* 35: 195-202.
- Edvinsson L., MacKenzie E.T. y McCulloch J. (1992) *Cerebral blood flow and metabolism.* (Raven press, New York).
- Edwards A.V., Järhult J., Andersson P.-O. y Bloom S.R. (1982) The importance of the pattern of stimulation in relation to the response of autonomic effectors. In: *Systemic role of regulatory peptides* (Bloom S.R., Polak J.M. y Lindenlaub E. eds.), pp. 145-148 (Schattauer, Stuttgart).



- Ekblad E., Rökaeus A., Håkanson R. y Sundler F. (1985) Galanin nerve fibres in the rat gut: distribution, origin and projection. *Neuroscience* 16: 355-363.
- Ekman R., Serenius B., Castro M.G., Lowry P.J., Cederlung A.S., Bergman O. y Sjogren H.O. (1993) Biosynthesis of corticotropin-releasing hormone in human T-lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 44: 7-14.
- Elde R., Schalling M., Ceccatelli S., Nakanishi S. y Hökfelt T. (1990) Localization of neuropeptide receptor mRNA in rat brain: initial observations using probes for neurotensin and substance P receptors. *Neurosci. Lett.* 120: 134-138.
- Eriksson M., Ceccatelli S., Uvnäs-Moberg K., Iadarola M. y Hökfelt T. (1996) Expression of fos-related antigens, oxytocin, dynorphin and galanin in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats. *Neuroendocrinology* 63: 356-367.
- Estupina C., Pinter A., Belmar J., Astier H. y Arancibia S. (1996) Variations in hypothalamic somatostatin release and content during the estrous cycle in the rat. Effects of ovariectomy and estrogen supplementation. *Neuroendocrinology* 63: 181-187.
- Etkin W. (1962) Neurosecretory control of the pars intermedia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2: 161-169.
- Everitt B.J., Meister B., Hökfelt T., Melander T., Terenius L., Rökaeus Å., Theodorsson-Norheim E., Dockray G., Edwardson J., Cuello C., Elde R., Goldstein M., Hemmings H., Ouimet C., Walas I., Greengard P., Vale W., Weber E., Wu J.W. y Chang K.J. (1986) The hypothalamic arcuate nucleus-median eminence complex: immunohistochemistry of transmitters, peptides and DARPP-32 with special reference to coexistence in dopamine neurons. *Brain Res. Rev.* 11: 97-155.
- Falck B. (1962) Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Citochem.* 10: 348-354.

- Fallon J.H. y Leslie F. (1986) Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 249: 293-336.
- Farkas-Szallasi T., Lundberg J.M., Wiesenfeld-Hallin Z., Hökfelt T. y Szallasi A. (1995) Increased levels of GMAP, VIP and nitric oxide synthase, and their mRNAs, in lumbar dorsal root ganglia of the rat following systemic resiniferatoxin treatment. *Neuroreport* 6: 2230-2234.
- Fisher A. (1964) Chemical stimulation of the brain. *Sci. Amer.* 210: 60.
- Fitzgerald M., Wall P., Goedert M. y Emson P. (1985) Nerve growth factor counteracts the neurophysiological and neurochemical effects of chronic sciatic nerve section. *Brain Res.* 332: 131-141.
- Folkers K., Hörig J., Rampold G., Lane P., Rosell S. y Björkroth U. (1982) Design and synthesis of effective antagonists of substance P. *Acta Chem. Scand.* 36: 389-395.
- Fontaine B., Klarsfeld A. y Changeux J.P. (1987) Calcitonin gene-related peptide and muscle activity regulate acetylcholine receptor alpha-subunit mRNA levels by distinct intracellular pathways. *J. Cell Biol.* 105: 1337-1342.
- Fontaine B., Klarsfeld A., Hökfelt T. y Changeux J.P. (1986) Calcitonin gene-related peptide, a peptide present in spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo myotubes. *Neurosci. Lett.* 71: 59-65.
- Fried G., Terenius L., Hökfelt T. y Goldstein M. (1985) Evidence for differential localization of noradrenaline and neuropeptide Y in neuronal storage vesicles isolated from rat vas deferens. *J. Neurosci.* 5: 450-458.
- Frontera J.G. (1952) A study of the anuran diencephalon. *J. Comp. Neurol.* 96: 1-69.

- Funston R.N., Moss G.E. y Roberts A.J. (1995) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in bovine sera and pituitaries at different stages of the estrous cycle. *Endocrinology* 136: 62-68.
- Furchgott R.F., Desingarao J. y Freay A.D. (1990) Nitric Oxide from L-arginine: a bioregulatory system. (Moncada S. y col. eds.), pp. 5-17 (Excerpta Médica, Amsterdam, New York, Oxford).
- Fuxe K. y Agnati L. (1991) Two principal modes of electrochemical communication in the brain: Volume versus wiring transmission. In: Volume transmission in the brain: Novel mechanisms for neural transmission (Fuxe K. y Agnati L., eds.), pp. 1-9 (Raven, New York).
- Fuxe K., Ganten D., Anderson K., Calzá L., Agnati L.F., Lang R.E., Poulsen K., Hökfelt T. y Bernardi P. (1982) Immunocytochemical demonstration of angiotensin II and renin-like immunoreactive nerve cells in the hypothalamus. Angiotensin peptides as comodulators in vasopressin and oxytocin neurons and their regulation of various types of central catecholamine nerve terminal systems. In: The renin angiotensin system in the brain (Ganten D., Printz M., Phillips M.I. y Schölkens B.A. eds.), vol 4, p. 208 (Exp. Brain Res).
- Fuxe K. y Nilsson B.Y. (1965) Mechanoreceptors and adrenergic nerve endings. *Experientia* 21: 641-642.
- Gabriel S.M., Milbury C.M., Nathanson J.A. y Martin J.B. (1988) Galanin stimulates rat pituitary growth hormone secretion in vitro. *Life Sciences* 42: 1981-1986.
- Gauer O.H. (1978) In: Osmotic and volume regulation (Jørgensen B.C. y Skadhauge E. eds.), pp. 229-242 (Munksgaard, Copenhagen).
- Gaymann W. y Martin R. (1989) Immunoreactive galanin-like material in magnocellular hypothalamo-neurohypophysial neurons of the rat. *Cell Tissue Res.* 255: 139-147.

- Gentleman S.M., Falkai P., Bogerts B., Herrero M.T., Polak J.M. y Roberts G.W. (1989) Distribution of galanin-like immunoreactivity in the human brain. *Brain Res.* 505: 311-315.
- Gertz B.J., Contreras L.N., McComb D.J., Kovacs K., Tyrrell B.J. y Dallman N.F. (1987) Chronic administration of corticotropin-releasing factor increases pituitary corticotroph number. *Endocrinology* 120: 381-388.
- Gesser B.P. y Larsson L.I. (1985) Changes from enkephalin-like to gastrin/cholecystokinin-like immunoreactivity in snail neurons. *J. Neurosci.* 5: 1412-1417.
- Giaid A., Gibson S.J., Ibrahim B.N., Legon S., Bloom S.R., Yanagisawa M., Masaki T., Vamdell I.M. y Polak J.M. (1989) Endothelin 1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7634-7638.
- Gibson S.J., Polak J.M., Bloom S.R., Sabate I.M., Mulderry P.M., Ghatei M.A., McGregor G.P., Morrison J.F., Kelly J.S., Evans R.M. y Rosenfeld M. (1984) Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J. Neurosci.* 4: 3101-3111.
- Gillies G.E. y Lowry P.J. (1979) Corticotrophin releasing factor may be modulated vasopressin. *Nature* 278: 463-464.
- Golding D. y Bayraktaroglu E. (1984) Exocytosis of secretory granules. A probable mechanism for the release of neuromodulators in invertebrates neuropil. *Experientia.* 40: 1277-1280.
- González A., Tuinhof R. y Smeets W.J. (1993) Distribution of tyrosine hydroxylase and dopamine immunoreactivities in the brain of the South African clawed frog *Xenopus laevis*. *Anat. Embryol. Berl.* 187: 193-201.

- González Nicolini M.V., Orezza A.A., Achi M.V., Villar M.J. y Tramezzani J.H. (1995) Galanin-like immunoreactive expression in the central nervous system of the toad. *Biocell* 19: 95-111.
- Grammer R.T., Fukumi H., Inagami T. y Misono K.S. (1983) Rat atrial natriuretic factor. Purification and vasorelaxant activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 696-703.
- Hass C.A., Streit W.J. y Kreutzberg G.W. (1990) Rat facial motoneurons express increased levels of calcitonin gene-related peptide mRNA in response to axotomy. *J. Neurosci. Res.* 27: 270-275.
- Haegerstrand A., Jonzon B., Dalsgaard C.J. y Nilsson J. (1989). Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5993-5996.
- Hall Z.H. (1992) *Introduction à la neurobiologie moléculaire.* (Médecine-Sciences Flammarion).
- Hatton G.I., Perlmutter L.S., Salm A.K. y Tweedle C.D. (1984) Dynamic neuronal-glial interactions in hypothalamus and pituitary: implications for control of hormone synthesis and release. *Peptides* 5: 121-138.
- Hedlund P.B., Koenig J.I. y Fuxe K. (1994) Adrenalectomy alters discrete galanin mRNA levels in the hypothalamus and mesencephalon of the rat. *Neurosci. Lett.* 170: 77-82.
- Hendry I.A., Stöckel K., Thoenen H. y Iversen L.L. (1974) The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res.* 68: 103-121.
- Henry J.L., Kmjevic K. y Morris M.E. (1975) Substance P and spinal neurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 53: 423-432.
- Herrick C.J. (1917) The internal structure of the midbrain and thalamus of *Necturus*. *J. Comp. Neurol.* 28: 215-348.

- Hershey A.D. y Krause J.E. (1990) Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science* 247: 958-962.
- Hess W.R. (1947) In: *Vegetative funktionen und zwischenhirn*. (Basel, Schwabe).
- Hess W.R. (1956) In: *Hypothalamus und thalamus. Experimental-dokumente*. (Stuttgart, Thieme).
- Hibbs J.B. Jr. (1991) Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumor and antimicrobial activity. *Res. Immunol.* 142: 565-569.
- Hild W. (1951) Experimentell morphologische untersuchungen über das verhalten der "neuro-sekretorischen bahn" nach hypophysenstieldurchtrennungen und eingriffen in den wasserhaushalt und belastung der osmoregulation. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.* 319: 526-546.
- Hill E.L., Turner R. y Elde R. (1991) Effects of sympathectomy and capsaicin treatment on bone remodeling in rats. *Neuroscience* 44: 747-756.
- Hohmann E.L., Elde R.P., Rysavy J.A., Einzig S. y Gebhard R.L. (1986) Innervation of periosteum and bone by sympathetic vasoactive intestinal peptide-containing nerve fibers. *Science* 232: 868-871.
- Hökfelt T. (1991) Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron* 7: 867-879.
- Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Terenius L. y Stein L. (1977) The distribution of enkephalin-immunoreactive cells bodies in the rat central nervous system. *Neurosci. Lett.* 5: 25.
- Hökfelt T., Fuxe K. y Pernow B. (eds.) (1986) *Coexistence of neuronal messengers: A new principle in chemical transmission*. (Elsevier, Amsterdam).

- Hökfelt T., Fahrenkrug J., Ju G., Ceccatelli S., Tsuruo Y., Meister B., Mutt V., Rundgren M., Brodin E., Terenius L., Hulting A.-L., Werner S., Björklund A. y Vale W. (1987a) Analysis of peptide histidine-isoleucine/vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the central nervous system with special reference to their relation to corticotropin releasing factor- and enkephalin-like immunoreactivities in the paraventricular hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 23: 827-857.
- Hökfelt T., Herrera-Marschitz M., Seroogy K., Ju G., Staines W.A., Holets V., Schalling M., Ungerstedt U., Post C., Rehfeld J.F., Frey P., Fischer J., Dockray G., Hamaoka T., Walsh J.H. y Goldstein M. (1988) Immunohistochemical studies on cholecystokinin (CCK)-immunoreactive neurons in the rat using sequence specific antisera and with special reference to the caudate nucleus and primary sensory neurons. *J. Chem. Neuroanat.* 1: 11-52.
- Hökfelt T., Johansson O. y Goldstein M. (1984a) Chemical anatomy of the brain. *Science* 225: 1326-1334.
- Hökfelt T., Johansson O., Ljungdahl Å., Lundberg J. y Schultzberg M. (1980) Peptidergic neurons. *Nature* 284: 515-521.
- Hökfelt T., Mårtensson R., Björklund A. y Kleinau S. (1984b) Distributional maps of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the rat brain. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Classical Transmitters in the CNS, Part 1. A.* (Björklund A., Hökfelt T. eds.), Vol 2, pp. 277-379 (Elsevier, Amsterdam).
- Hökfelt T., Meister B., Villar M.J., Ceccatelli S., Cortés R., Schalling M. y Everitt B. (1989) Hypothalamic neurosecretory systems and their messenger molecules. *Acta Physiol. Scand.* 136: 105-111.
- Hökfelt T., Wiesenfeld-Hallin Z., Villar M.J. y Melander T. (1987b) Increase of galanin-like immunoreactivity in dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neurosci. Lett.* 83: 217-220.

- Holgert H., Pequignot J.M., Lagercrantz H. y Hökfelt T. (1995) Birth-related up-regulation mRNA encoding tyrosine hydroxylase, dopamine beta-hydroxylase, neuropeptide tyrosine, and prepro-enkephalin in rat adrenal medulla is dependent on postnatal oxygenation. *Pediatr. Res.* 37: 701-706.
- Holmes S.J. (1934) In: "The biology of the frog". (Macmillan Co., New York).
- Holmqvist B.I. y Ekström P. (1991) Galanin-like immunoreactivity in the brain of teleost: Distribution and relation to substance P, vasotocin, and isotocin in the atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Comp. Neurol.* 306: 361-381.
- Hooi S.C., Maiter D.M., Martin J.B. y Koenig J.I. (1990) Galaninergic mechanisms are involved in the regulation of corticotropin and thyrotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 127: 2281-2289.
- Hooi S.C., Richardson G.S., McDonald J.K., Allen J.M., Martin J.B. y Koenig J.I. (1989) Neuropeptide Y (NPY) and vasopressin (aVP) in the hypothalamo-neurohypophysial axis of salt-loaded or Brattleboro rats. *Brain Res.* 486: 214-220.
- Horn J.P. y Stofer W.D. (1989) Preganglionic and sensory origins of calcitonin gene-related peptide-like and substance P-like immunoreactivities in bullfrog sympathetic ganglia. *J. Neurosci.* 9: 2543-2561.
- Hornby P.J. y Piekut D.T. (1987) Catecholamine distribution and relationship to magnocellular neurons in the paraventricular nucleus of the rat. *Cell Tissue Res.* 248: 239-246.
- Houssay B.A. (1949) Hypophyseal functions in the toad *Bufo arenarum* Hensel. *Quart. Rev. Biol.* 24: 1-27.
- Houssay B.A. y Giusti L. (1929) Las funciones de la hipófisis y la región infundíbulo tuberiana en el sapo *Bufo marinus*. *L. Scheind. Rev. Soc. Arg. Biol.* 5: 47-65.



- Hou-Yu A., Lamme A.T., Zimmerman E.A. y Silverman A.J. (1986) Comparative distribution of vasopressin and oxytocin neurons in the rat brain and spinal cord. *Neuroendocrinology* 44: 235-246.
- Hsu S.-M., Ranid L. y Fanger H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Citochem.* 29: 577-580.
- Hughes J., Boden P., Costall B., Domeney A., Kelly E., Horwell D.C., Hunter J.C., Pinnock R.D. y Woodruff G.N. (1990) Development of a class of selective cholecystinin type B receptor antagonists having potent anxiolytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6728-6732.
- Hulting A.L., Meister B., Carlsson L., Hilding A. y Isaksson O. (1991) On the role of the peptide galanin in regulation of growth hormone secretion. *Acta Endocrinol.* 125: 518-525.
- Iadecola C. (1993) Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci.* 16: 206-214.
- Ignarro L.J. (1990) Haem-dependent activation of guanilate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol. Toxicol.* 67: 1-7.
- Inoue M., Takada K. y Ishii S. (1982) Seasonal changes in plasma androgen concentrations and reproductive behavior in toads. *Zool. Mag.* 91: 568.
- Iverfeldt K., Serfozo P., Diaz A.L. y Bartfai T. (1989) Differential release of coexisting neurotransmitters: frequency dependence of the efflux of substance P, thyrotropin releasing hormone and <sup>3</sup>H-serotonin from tissue slices of rat ventral spinal cord. *Acta Physiol. Scand.* 137: 63-71.

- Iversen L. y Goodman E. (eds.) (1986) Fast and slow chemical signalling in the nervous system. (Oxford University Press, Oxford y New York).
- Jaim-Etchevery G. y Zieher L.M. (1971) Ultrastructural cytochemistry and pharmacology of 5-hydroxytryptamine in adrenergic nerve endings III. Selective increase of norepinephrine in the rat pineal gland consecutive to depletion of neuronal 5-hydroxytryptamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178: 42-48.
- Jaim-Etchevery G. y Zieher L.M. (1982) Coexistence of monoamines in peripheral adrenergic neurons. In: *Co-transmission* (Cuello A.C. ed.), pp. 189-208 (Macmillan, London y Basingstoke).
- Jennes L., Stumpf W.E. y Kalivas P.W. (1982) Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* 210: 211-224.
- Jennings C.G. y Mudge A.W. (1989) Chick myotubes in culture express high-affinity receptors for calcitonin gene-related peptide. *Brain Res.* 504: 199-205.
- Jessell T., Tsunno A., Kanazawa I. y Otsuka M. (1979) Substance P: depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons. *Brain Res.* 168: 247-259.
- Ji R.-R., Zhang Q., Bedecs K., Arvidsson J., Zhang X., Xu X.-J., Wiesenfeld-Hallin Z., Bartfai T. y Hökfelt T. (1994) Galanin antisense oligonucleotides reduce galanin levels in dorsal root ganglia and induce autotomy in rats after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12540-12543.
- Ji R.-R., Zhang X., Zhang Q., Dagerlind A., Nilsson S., Wiesenfeld-Hallin Z. y Hökfelt T. (1995) Central and peripheral expression of galanin in response to inflammation. *Neuroscience* 68: 563-576.

- Jirkowski G.F., Sanna P.P. y Bloom F.E. (1990) mRNA coding for oxytocin is present in axons of the hypothalamo-neurohypophysial tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7400-7404.
- Johansson O., Hökfelt T. y Elde R.P. (1984) Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 13: 265-339.
- Johnson D.G. y de C. Nogueira Araujo G.M. (1981) A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Meth.* 43: 349-350.
- Jokura Y. y Urano A. (1985) An immunohistochemical study of seasonal changes in luteinizing hormone-releasing hormone and vasotocin in the forebrain and the neurohypophysis of the toad, *Bufo japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59: 238-245.
- Jones C.W. y Pickering B.T. (1969) Comparison of the effects of water deprivation and sodium chloride imbibition on the hormone content of the neurohypophysis of the rat. *J. Physiol.* 203: 449-458.
- Ju G., Melander T., Ceccatelli S., Hökfelt T., Frey P. y Elde R.P. (1987) Immunohistochemical evidence for a spinothalamic pathway cocontaining cholecystokinin- and galanin-like immunoreactivities in the rat. *Neuroscience* 20: 439-456.
- Kage R., Hershey A.D., Krause J.E., Boyd N.D. y Leeman S.E. (1995) Characterization of the substance P (NK-1) receptor in tunicamycin-treated transfected cells using a photoaffinity analogue of substance P. *J. Neurochem.* 64: 316-321.
- Kahn D., Abrams G.M., Zimmerman E.A., Carraway R. y Leeman S.E. (1980) Neurotensin neurons in the rat hypothalamus: an immunocytochemical study. *Endocrinology* 107: 47-54.

- Kalimo H. (1975) Ultrastructural studies on the hypothalamic neurons of the rat. III. Paraventricular and supraoptic neurons during lactation and dehydration. *Cell Tissue Res.* 163: 151-168.
- Kaneko T., Akiyama H., Nagatsu I. y Mizuno N. (1990) Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res.* 507: 141-154.
- Kasakov L., Ellis J., Kirkpatrick K., Milner P. y Burnstock G. (1988) Direct evidence for concomitant release of noradrenaline, adenosine 5'-triphosphate and neuropeptide Y from sympathetic nerve supplying the guinea-pig vas deferens. *J. Auton. Nerv. Syst.* 22: 75-82.
- Kask K., Berthold M., Bourne J., Andell S., Langel U. y Bartfai T. (1995) Binding and agonist/antagonist actions of M35. *Regul. Pept.* 59: 341-348.
- Kawashima S., Hirano T., Matsui T. y Takewaki K. (1966) Neurosecretion and neurohypophysial hormones in the rat median eminence after total hypophysectomy with reference to histological and fine structure of the region. *J. Fac. Sci., Univ. Tokyo, Sect. II.* 11: 11-28.
- Kelley D.B., Morrell J.I. y Pfaff D.W. (1975) Autoradiographic localization of hormone-concentrating cells in the brain of an amphibian, *Xenopus laevis*. I. Testosterone. *J. Comp. Neurol.* 164: 47-62.
- Kessler L. y Black I.B. (1980) Nerve growth factor stimulates development of substance P in sensory ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 649-652.
- Khachaturian H., Lewis M. y Watson S.J. (1983) Enkephalin systems in the diencephalon and brainstem of the rat. *J. Comp. Neurol.* 220: 310-320.
- Kieman J.A. (1970) Two types of axonal regeneration in the neurohypophysis of the rat. *J. Anat.* 107: 187.

- Kimura C., Ohkubo S., Ogi K., Hosoya M., Itoh Y., Onda H., Miyata A., Jiang L., Dahl R.R., Stibbs H.H., Arimura A. y Fujimo M. (1990) A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 81-89.
- Kiss J.Z. y Mezey E. (1986) Tyrosine hydroxylase in magnocellular neurosecretory neurons: response to physiological manipulations. *Neuroendocrinology* 43: 519-525.
- Kiss J.Z., Williams T.H. y Palkovits M. (1984) Distribution and projections of cholecystinin-immunoreactive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 277: 173-181.
- Kitahama K., Luppi P.-H., Berod A., Goldstein M. y Jouvett M. (1987) Localization of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the cat hypothalamus, with special reference to fluorescence histochemistry. *J. Comp. Neurol.* 262: 578-593.
- Knowles R.G., Palacios M., Palmer R.M. y Moncada S. (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5159-5162.
- Kobayashi R.M., Brown M. y Vale W. (1977) Regional distribution of neurotensin and somatostatin in rat brain. *Brain Res.* 126: 584-588.
- Koenig J.I., Hooi S.C., Maiter D.M., Martin J.B., Gabriel S.M., Strauss R.M. y Kaplan L.M. (1991) On the interactions of galanin within the hypothalamic-pituitary axis of the rat. In: *Galanin: A new multifunctional peptide in the neuro-endocrine system* (Hökfelt T., Bartfai T., Jacobowitz D. y Ottoson D. eds.), Vol 58, p. 331 (Macmillan Press, London).
- Köhler C., Persson A., Melander T., Theodorsson E., Sedvall G. y Hökfelt T. (1989) Distribution of galanin-binding sites in the monkey and human telencephalon: preliminary observations. *Exp. Brain Res.* 75: 375-380.

- Kordower J.H. y Mufson E.J. (1990) Galanin-like immunoreactivity within the primate basal forebrain: differential staining patterns between humans and monkeys. *J. Comp. Neurol.* 294: 281-292.
- Koshiyama H., Shimatsu A., Kato Y., Assadian H., Hattori N., Ishikawa Y., Tanoh T., Yanaihara N. y Imura H. (1990) Galanin-induced prolactin release in rats: pharmacological evidence for the involvement of  $\alpha$ -adrenergic and opioidergic mechanism. *Brain Res.* 507: 321-324.
- Kowall N., Beal M., Busciglio J., Duffy L. y Yankner B. (1991) An in vivo model for the neurodegenerative effects of  $\beta$  amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7247-7251.
- Kreutzberg G.W. (1982) Acute neuronal reaction to injury. In: *Repair and regeneration of the nervous system* (Nicholls J.G. ed.), pp. 57-69 (Springer, Berlin).
- Krieger D.T. (1983) Brain peptides: what, where, and why? *Science* 222: 975-985.
- Kuchler K., Richter K., Tmovsky J., Egger R. y Kreil G. (1990) Two precursors of thyrotropin-releasing hormone from skin of *Xenopus laevis*. Each contains seven copies of the end product. *J. Biol. Chem.* 265: 11731-11733.
- Kuhlenbeck H. (1927) *Vorlesungen über das Zentralnervensystem der wirbeltiere.* (Jena, Fischer).
- Kuhlenbeck H. (1930) Bemerkungen über den zwischenhirnbauplan bei säugetieren, insbesondere beim menschen. *Anat. Anz.* 70: 122.
- Kuhlenbeck H. (1937) The ontogenetic development of the diencephalic centers in a bird's brain (chick) and comparison with the reptilian and mammalian diencephalon. *J. Comp. Neurol.* 66: 23.

- Kuhlenbeck H. (1954) In: The human diencephalon. A summary of development, structure function and pathology. (Basel, Karger).
- Kuhlenbeck H. y Haymaker W. (1949) The derivatives of the hypothalamus in the human brain; their relation to the extrapyramidal and autonomic systems. *Milit. Surg.* 105: 26.
- Kuljis R.O. y Karten H.J. (1982) Laminar organization of peptide-like immunoreactivity in the anuran optic tectum. *J. Comp. Neurol.* 212: 188-201.
- Kuljis R.O. y Karten H.J. (1983) Modifications in the laminar organization of peptide-like immunoreactivity in the anuran optic tectum following retinal deafferentation. *J. Comp. Neurol.* 217: 239-251.
- Kyrkouli S.E., Stanley B.G., Hutchinson R., Seirafi R.D. y Leibowitz S.F. (1990a) Peptide-amine interactions in the hypothalamic paraventricular nucleus: Analysis of galanin and neuropeptide Y in relation to feeding. *Brain Res.* 521: 185-191.
- Kyrkouli S.E., Stanley B.G. y Leibowitz S.F. (1986) Galanin: Stimulation of feeding induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide. *Eur. J. Pharmacol.* 122: 159-160.
- Kyrkouli S.E., Stanley B.G., Seirafi R.D. y Leibowitz S.F. (1990b) Stimulation of feeding by galanin: Anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain. *Peptides* 11: 995-1001.
- Landis S.C. y Patterson P.H. (1981) Neural crest cell lineages. *TINS* 4: 172-175.
- Larsen P.J., Jessop D.S., Chowdrey H.S. y Lightman L. (1992a) Neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system of the rat is increased during osmotic stimulation. *Neurosci. Lett.* 138: 23-26.
- Larsen P.J., Sheikh S.P. y Mikkelsen J.D. (1992b) Osmotic regulation of neuropeptide Y and its binding sites in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial pathway. *Brain Res.* 573: 181-189.

- Laufer R. y Changeux J.P. (1987) Calcitonin gene-related peptide elevates cyclic AMP levels in chick skeletal muscle: possible neurotrophic role for a coexisting neuronal messenger. *Embo. J.* 6: 901-906.
- Lázár G.Y., Liposits Z.S., Toth P., Trasti S.L., Maderdrut J.L. y Merchenthaler I. (1991) Distribution of galanin-like immunoreactivity in the brain of *Rana esculenta* and *Xenopus laevis*. *J. Comp. Neurol.* 310: 45-67.
- Lazar P., Reddington M., Streit W., Raivich G. y Kreutzberg G.W. (1991) The action of calcitonin gene-related peptide on astrocyte morphology and cyclic AMP accumulation in astrocyte cultures from neonatal rat brain. *Neurosci. Letts.* 130: 99-102.
- Lazure C., Ong H., McNicoll N., Netchitailo P., Chrétien M., De Léan A. y Vaudry H. (1988) The amino acid sequences of frog heart atrial natriuretic-like peptide and mammalian ANF are closely related. *FEBS Lett.* 238: 300-306.
- Lecci A., Giuliani S., Patacchini R., Viti G. y Maggi C.A. (1991) Role of NK<sub>1</sub> tachykinin receptors in thermociception: effect of (±)-CP 96,345, a non-peptide substance P antagonist, on the hot plate test in mice. *Neurosci. Letts.* 129: 299-302.
- Le Douarin N.M. (1980) The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. *Nature* 286: 663-669.
- Legait H. y Legait E. (1957) Les voies extra-hypophysaires des noyaux neurosécrétoires hypothalamiques chez les Batraciens et les Reptiles. *Acta Anat.* 30: 429-443.
- Leibowitz S.F. (1989) Hypothalamic neuropeptide Y and galanin: Functional studies of coexistence with monoamines. In: Nobel Symposium XIV: Neuropeptide Y (Mutt V., Hökfelt T. y Fuxe K., eds.), pp. 267-281 (New York: Raven Press).



- Leibowitz S.F. (1991) Hypothalamic galanin in relation to feeding behavior and endocrine systems. In: Galanin: A new multifunctional peptide in the neuro-endocrine system (Hökfelt T., Bartfai T. eds.) (New York: Macmillan Press).
- Le Mevel J.C., Mabin D. y Vaudry H. (1991) Intracerebroventricular injection of arginin vasotocin induces elevation of blood pressure in anesthetized trout. *Peptides* 12: 477-481.
- Leng G., Mason W.T. y Dyer R.G. (1982) The supraoptic nucleus as an osmoreceptor. *Neuroendocrinology* 34: 75-82.
- Levi-Montalcini R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162.
- Levitt M., Spector S., Sjoerdsma A. y Udenfriend S. (1965) Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 148: 1-8.
- Lieberman A.R. (1971) The axon reaction: a review of the principal feature of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.* 14: 49-124.
- Lillywhite H.B. (1970) Behavioral thermoregulation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 158-168.
- Lind R.W., Swanson L.W., Chin D.A., Bruhn T.O. y Garten D. (1984) Angiotensin II: an immunohistochemical study of its distribution in the paraventriculo-hypophysial system and its co-localization with vasopressin and CRF in parvocellular neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* 10: 88.
- Ljungdahl Å., Hökfelt T. y Nilsson G. (1978) Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat - I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 3: 861-943.

- Llinás R. y Precht W. (1976) *The frog neurobiology. A handbook.* New York: Springer-Verlag.
- Loche S., Cella S.G., Puggioni R., Stabilini L., Pinto C. y Müller E.E. (1989) The effects of galanin on growth hormone secretion in children of normal and short stature. *Pediat. Res.* 26: 316-319.
- López F.G., Meade E.H. y Negro-Vilar A. (1990) Development and characterization of a specific and sensitive radioimmunoassay for rat galanin: Measurement in brain tissue, hypophyseal portal and peripheral serum. *Brain Res. Bull.* 24: 395-399.
- López F.G., Merchenthaler I., Ching M., Wisniewski M.G. y Negro-Vilar A. (1991) Galanin: A hypothalamic-hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4508-4512.
- López F.G. y Negro-Vilar A. (1990) Galanin stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion from arcuate nucleus-median eminence fragments in vitro: involvement of an alpha-adrenergic mechanism. *Endocrinology* 127: 2431-2436.
- Lorén I., Emson P.C., Fahrenkrug J., Björklund A., Alumets J., Håkanson R. y Sundler F. (1979) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 4: 1953-1976.
- Lotz M., Vaughan J.H. y Carson D.A. (1988) Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 241: 1218-1221.
- Lundberg J.M., Fried G., Fahrenkrug J., Holmstedt B., Hökfelt T., Lagercrantz H., Lundgren G. y Änggård A. (1981) Subcellular fractionation of cat submandibular gland: comparative studies on the distribution of acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Neuroscience* 6: 1001-1010.
- Lundberg J.M., Hedlund B., Änggård A., Fahrenkrug J., Hökfelt T., Tatemoto K. y Bartfai T. (1982) Costorage of peptides and classical transmitters in neurons. In: *Systemic role of*

- regulatory peptides (Bloom S.R., Polak J.M. y Lindenlaub E., eds.), pp. 93-119 (Schattauer, Stuttgart).
- Magistretti P.J., Morrison J., Shoemaker W., Sapin V. y Bloom F. (1981) Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in the mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6535-6539.
- Magistretti P.J. y Schorderet M. (1984) VIP and noradrenaline act synergistically to increase cyclic AMP in cerebral cortex. *Nature* 308: 280-282.
- Maiter D.M., Hooi S.C., Koenig J.I. y Martin J.B. (1990) Galanin is a physiological regulator of spontaneous pulsatile secretion of growth hormone in the male rat. *Endocrinology* 126: 1216-1222.
- Manabe T., Yoshimura T., Kii E., Tanaka Y., Ohshio G., Tobe T., Akaji K. y Yajima H. (1986) Galanin-induced hyperglycemia: effect on insulin and glucagon. *Endo. Res.* 12: 93-98.
- Marletta M.A., Yoon P.S., Iyengar R., Leaf C.D. y Wishnok J.S. (1988) Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27: 8706-8711.
- Marlier L., Rajaofetra N., Peretti R.R., Kachidian P., Poulat P., Feuerstein C. y Privat A. (1990) Calcitonin gene-related peptide staining intensity is reduced in rat lumbar motoneurons after spinal cord transection: a quantitative immunocytochemical study. *Exp. Brain Res.* 82: 40-47.
- Marti E., Gibson S.J., Polak J.M., Facer P., Sringall D.R., Van Aswegen G., Aitchison M. y Koltzenburg M. (1987) Ontogeny of peptide- and amine- containing neurons in motor, sensory, and autonomic regions of rat and human spinal cord, dorsal root ganglia and rat skin. *J. Comp. Neurol.* 266: 332-359.

- Masserano J.M. y Weiner N. (1983) Tyrosine hydroxylase regulation in the central nervous system. *Mol. Cell Biochem.* 53/54: 129-152.
- Masu Y., Nakayama K., Takami H., Harada Y., Kuno M. y Nakanishi S. (1987) cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature* 329: 836-838.
- Matteoli M., Haimann C., Torri T.F., Polak J.M., Ceccarelli B. y De Camilli P. (1988) Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7366-7370.
- Mautner W. (1964) Das räumliche Bild des neurosekretorischen Zwischenhirnsystems und der portalen hypophysengefäße von *R. temporaria* und einigen anderen Anuren. Mit lebendbeobachtungen am portalen hypophysenkreislauf. *Z. Zellforsch.* 64: 813-826.
- Mazzi V. (1953) Rapporti anatomici e funzionali fra ipotalamo e ipofisi. *Arch. zool. ital., Suppl.* 38: 53-140.
- Mc Donald T.J., Drupe J., Tatemoto K., Greenberg G.R., Radziuk J. y Mutt V. (1985) Galanin inhibits insulin secretion and induces hiperglycemia in dogs. *Diabetes* 34: 192-196.
- McGillis J.P., Park A., Rubin-Fletter P., Turck C., Dallman M.F. y Payan D.G. (1989) Stimulation of rat B-lymphocyte proliferation by corticotropin-releasing factor. *J. Neurosci. Res.* 23: 346-352.
- McKay D.M., Shaw C., Thim L., Johnston C.F., Halton D.W., Fairweather I. y Buchanan K.D. (1990) The complete primary structure of pancreatic polypeptide from the European common frog, *Rana temporaria*. *Regul. Pept.* 31: 187-198.
- McKinley M.J., Denton D.A. y Weisinger R.S. (1978) Sensors for antidiuresis and thirst-osmoreceptors or CSF sodium detectors? *Brain Res.* 141: 89-103.

- McNicol A.M., Kubba M.A.G. y Mc Teague E. (1988) The mitogenic effects of corticotrophin-releasing factor on the anterior pituitary gland of the rat. *J. Endocrinol.* 118: 237-241.
- Meister B. (1989) Hypothalamic neurosecretory neurons. Histochemical and experimental studies on distribution and regulation with special reference to multiple messenger systems. MD Thesis, Karolinska Institute, (Stockholm, Sweden).
- Meister B., Cortés R., Villar M.J., Schalling M. y Hökfelt T. (1990a) Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tiss. Res.* 260: 279-297.
- Meister B., Cortés R., Villar M.J. y Hökfelt T. (1989a) Increase of galanin mRNA and decrease of galanin-like immunoreactivity in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei after salt-load. *Eur. J. Neurosci. Suppl.* 2: 126.
- Meister B., Hulting A.-L., Uvnäs-Moberg K. y Hökfelt T. (1993) Galanin stimulates the release of cholecystokinin from nerve fibres in the pituitary neurointermediate lobe. *NeuroReport* 4: 631-634.
- Meister B., Villar M.J., Ceccatelli S. y Hökfelt T. (1990b) Localization of chemical messengers in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: An immunohistochemical study using experimental manipulations. *Neuroscience* 37: 603-633.
- Meister B., Villar M.J., Schalling M., Ehrlich M., Greengard P. y Hökfelt T. (1989b) Demonstration of DARP-32 in pituitary cells of the neurohypophysis-decreased expression after administration of hyperosmotic stimuli. *Acta Physiol. Scand.* 137: 461-462.
- Melander T., Fuxe K., Harstrand A., Eneroth P. y Hökfelt T. (1987) Effects of intraventricular injections of galanin on neuroendocrine functions in the male rat.

- Possible involvement of hypothalamic catecholamine neuronal systems. *Acta Physiol. Scand.* 131: 25-32.
- Melander T., Hökfelt T. y Rökaeus A. (1986a) Distribution of galanin-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 248: 475-517.
- Melander T., Hökfelt T., Rökaeus A., Cuello A.C., Oertel W.H., Verhofstad A. y Goldstein M. (1986b) Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS. *J. Neurosci.* 6: 3640-3654.
- Melander T., Staines W., Hökfelt T., Rökaeus A., Eckstein F., Salvaterra P.M. y Wainer B.H. (1985) Galanin-like immunoreactivity in cholinergic neurons of the septum-basal forebrain complex projecting to the hippocampus of the rat. *Brain Res.* 360: 130-138.
- Melander T. y Staines W.A. (1986) A galanin-like peptide coexists in the putative cholinergic somata of the septum-basal forebrain complex and in acetylcholinesterase-containing fibers and varicosities within the hippocampus in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *Neurosci. Lett.* 68: 17-22.
- Menéndez J.A., Atrens D.M. y Leibowitz S.F. (1992) Metabolic effects of galanin injections into the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Peptides* 13: 323-327.
- Menéndez J.A., McGregor I.S., Healey P.A., Atrens D.M. y Leibowitz S.F. (1990) Metabolic effects of neuropeptide Y injections into the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 516: 8-14.
- Merickel M. y Kater S.B. (1974) Neuronal change: compensatory acclimation of the contribution of an electrogenic pump to the resting potential. *J. Comp. Physiol.* 94: 195-206.
- Merrell D.J. (1977) Life history of the leopard frog, *Rana pipiens*, in Minnesota. *Occas. Pap Bell Mus. Nat. Hist.* 15: 1.

- Mezey E., Reisine L., Skirboll L., Beinfeld M. y Kiss J.Z. (1986) Role of cholecystokinin in corticotropin release: coexistence with vasopressin and corticotropin-releasing factor in cells of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3510-3512.
- Micevych P., Akesson T. y Elde R. (1988) Distribution of cholecystokinin-immunoreactive cell bodies in the male and female rat: II. Bed nucleus of the stria terminalis and amygdala. *J. Comp. Neurol.* 269: 381-391.
- Michener S.R., Aimone L.D., Yaksh T.L. y Go V.L.W. (1990) Distribution of galanin-like immunoreactivity in the pig, rat and human central nervous system. *Peptides* 11: 1217-1223.
- Miller L.K. y Dehlinger P.J. (1969) Neuromuscular function at low temperature in frogs from cold and warm climates. *Comp. Biochem. Physiol.* 28: 915-921.
- Miller L.K. y Mizell S. (1972) Seasonal variation in heart rate response to core temperature changes. *Comp. Biochem. Physiol.* 42: 773-779.
- Mintz C.D., Bloom S.R., Polak J.M. y Dixon J.E. (1984) Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4577-4581.
- Miura R. (1933) Über die differenzierung der grundbestandteile im Zwischenhirn des Kaninchens. *Anat. Anz.* 77: 1.
- Miyata A., Arimura A., Dahl R.R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M.D. y Coy D.H. (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 567-574.
- Mohr E., Bahnsen V., Kiessling C. y Richter D. (1988) Expression of the vasopressin and oxytocin genes in rats occurs in mutually exclusive sets of hypothalamic neurons. *FEBS Lett.* 242: 144-148.

- Moncada S., Palmer R.M. y Higgs E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- Moore R.Y. (1989) Cranial motor neurons contain either galanin- or calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 282: 512-522.
- Moreland R.B., Langevin G.L., Singer G.L., Garcea R.L. y Hereford L.M. (1987) Amino acid sequences that determine the nuclear localization of yeast histone 2B. *Mol. Cell Biol.* 7: 4048-4057.
- Morrell J.I., Kelley D.B. y Pfaff D.W. (1975) Autoradiographic localization of hormone-concentrating cells in the brain of an amphibian, *Xenopus laevis*. II. Estradiol. *J. Comp. Neurol.* 164: 63-78.
- Morrison E., Hodge P., Tomasec P., Lowenstein P.R., Linton E.A., Lowry P.J. y Castro M.G. (1993) Nuclear localization of corticotrophin releasing hormone (CRH) in transfected CHO-K1 cells. *Biochem. Soc. Trans.* 21: 318S.
- Mulatero B., Boulay D., Panzanelli P., Andreone C., Vandesande F., Vaudry H. y Fasolo A. (1991) Galanin-like positive neuronal systems in the newt brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82: 264-265.
- Mulatero B. y Fasolo A. (1991) Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the hypothalamo-hypophysial system of the green frog, *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81: 349-356.
- Murakami M., Nakayama Y. y Hashimoto J. (1968) Ultrastrukturelle aspekte des supraoptikhypophysären systems in der hypophysektomierten ratte. *Experientia* 24: 713-715.



- Murakami Y., Kato Y., Koshiyama H., Inoue T., Yanaihara N. y Imura H. (1987) Galanin stimulates growth hormone (GH) secretion via GH-releasing factor (GRF) in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.* 136: 415-418.
- Neary T.J. y Northcutt R.G. (1983) Nuclear Organization of the Bullfrog diencephalon. *J. Comp. Neurol.* 213: 262-278.
- New H.V. y Mudge A.W. (1986) Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. *Nature* 323: 809-811.
- Nicholas A., Cuello A., Goldstein M. y Hökfelt T. (1990) Glutamate-like immunoreactivity in medulla oblongata catecholamine/substance P neurons. *NeuroReport* 1: 235-238.
- Nilaver G., Zimmerman E.A., Wilkins J., Michaels J., Hoffman D. y Silverman A.-J. (1980) Magnocellular hypothalamic projections to the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin-neurophysin system compared to the vasopressin-neurophysin system. *Neuroendocrinology* 30: 150-158.
- Nilsson J., von Euler A. y Dalsgaard C.J. (1985) Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 315: 61-63.
- Noguchi K., Senba E., Morita Y., Sato M. y Tohyama M. (1990) Alpha-CGRP and beta-CGRP mRNAs are differentially regulated in the rat spinal cord and dorsal root ganglion. *Mol. Brain Res.* 7: 299-304.
- Nojiri H., Ishida I., Miyashita E., Sato M., Urano A. y Deguchi T. (1987) Cloning and sequence analysis of cDNAs for neurohypophysial hormones vasotocin and mesotocin for the hypothalamus of toad, *Bufo japonicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3043-3046.
- Norberg A., Sillard R., Carlquist M., Jorvall H. y Mutt V. (1991) Chemical detection of natural peptides by specific structures. Isolation of chicken galanin by monitoring for its

N-terminal dipeptide, and determination of its amino acid sequence. FEBS Lett. 288: 151-153.

Nouwen E.J. y Kühn E.R. (1983) Radioimmunoassay of arginine vasotocin and mesotocin in serum of the frog *Rana ridibunda*. Gen. Comp. Endocrinol. 50: 242-251.

Ogi K., Kimura C., Onda H., Arimura A. y Fujino M. (1990) Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). Biochem. Biophys. Res. Commun. 173: 1271-1279.

Olivereau M. y Olivereau J.M. (1991) Immunocytochemical localization of a galanin-like peptidergic system in the brain and pituitary of some teleost fishes. Histochemistry 96: 343-354.

Olivereau M. y Olivereau J.M. (1992) Immunocytochemical localization of a galanin-like peptidergic system in the brain of two urodele and two anuran species (Amphibia). Histochem. 98: 51-56.

O'Malley B.W. (1989) Did eucaryotic steroid receptors evolve from intracrine gene regulators? Endocrinology 125: 1119-1120.

Oordt P.G.W.J. van, Goos H.J.T., Peute J. y Terlou M. (1972) Hypothalamo-hypophysial relations in amphibian larvae. Gen. comp. Endocr., Suppl. 3: 41-50.

Oordt P.G.W.J. van, Goos H.J.T., Peute J. y Terlou M. (1974) Structural and functional aspects of two types of Gomori-negative neurosecretory centres in the caudal hypothalamus of Amphibia. In: Neurosecretion-The final neuroendocrine pathway (Knowles F. y Vollrath L., eds.), pp. 182-192 (Berlin-Heidelberg-New York: Springer).

Ottlecz A., Snyder G.D. y McCann S.M. (1988) Regulatory role of galanin in control of hypothalamic-anterior pituitary function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 9861-9865.

- Owman C., Håkanson R. y Sundler F. (1973) Occurrence and function of amines in polypeptide hormone producing cells. *Proc. Fedn. Am. Soc. Exp. Biol.* 32: 1785.
- Palacios J.M. y Kuhar M.J. (1981) Neurotensin receptors are located on dopamine-containing neurones in rat midbrain. *Nature* 294: 587-589.
- Palacios J.M., Savasta M. y Mengod G. (1989) Does cholecystinin colocalize with dopamine in the human substantia nigra? *Brain Res.* 488: 369-375.
- Palkovits M. (1995) Neuropeptide messenger plasticity in CNS neurons following axotomy. *Mol. Neurobiol.* 10: 91-103.
- Palkovits M., Rökaeus A., Ferenc A. y Kiss A. (1987) Galanin in hypothalamo-hypophyseal system. *Neuroendocrinology* 46: 417-423.
- Pan F.M. y Chang W.C. (1989) Nucleotide sequence of bullfrog pro-opiomelanocortin cDNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 5843.
- Panula P., Yang H.-Y. y Costa E. (1982) Neuronal localization of the bombesin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Reg. Peptides* 4: 275-283.
- Panzica G.C., Fiori M.G. y Viglietti-Panzica C. (1986) Vasotocin fibers in the mesencephalon and pons of the domestic fowe. An immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 68: 155-159.
- Pasquier D.A., Cannata M.A. y Tramezzani J.H. (1980) Central connections of the toad neural lobe as shown by retrograde neuronal labelling: classical and new connections. *Brain Res.* 195: 37-45.
- Patterson P.H. y Chun L.L.Y. (1974) The influence of non-neuronal cells on catecholamine and acetylcholine synthesis and accumulation in cultures of dissociated sympathetic neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71: 3607-3610.

- Pearse A.G.E. (1969) The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 303.
- Pelto-Huikko M. (1989) Immunocytochemical localization of neuropeptides in the adrenal medulla. *J. Electron Microsc. Tech.* 12: 364-379.
- Penny D.G. (1987) Frogs and turtles: Different ectotherm over wintering strategies. *Comp. Biochem. Physiol. A* 86: 609-615.
- Persson J.K., Lindh B., Elde R., Robertson B., Rivero-Melian C., Eriksson N.P., Hökfelt T. y Alskoguis H. (1995) The expression of different cytochemical markers in normal and axotomised dorsal root ganglion cells projecting to the nucleus gracilis in the adult rat. *Exp. Brain Res.* 105: 331-344.
- Peute J. (1973) Ultrastructural aspects of the nucleus infundibularis dorsalis in the caudal hypothalamus of *X. laevis*. *Z. Zellforsch.* 137: 513-520.
- Peute J. y Goos H.J.T. (1970) Biogenic amines in the tuber cinereum of *X. laevis* tadpoles. Electron and fluorescence microscopical observations. In: *Aspects of neuroendocrinology* (Bargmann W. y Scharrer B., eds.), pp. 112-117 (Berlin-Heidelberg-New York: Springer).
- Piehl F., Arvidsson U., Johnson H., Cullheim S., Villar M., Dagerlind Å., Terenius L., Hökfelt T. y Ulfhake B. (1991) Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity and CGRP mRNA in rat spinal cord motoneurons after different types of lesions. *Eur. J. Neurosci.* 3: 737-757.
- Pincus D.W., DiCicco B.E. y Black I.B. (1990) Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblasts. *Nature* 343: 564-567.

- Planas B., Kolb P.E., Raskind M.A. y Miller M.A. (1994) Activation of galanin pathways across puberty in the male rat: galanin gene expression in the bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdala. *Neuroscience* 63: 851-858.
- Planas B., Kolb P.E., Raskind M.A. y Miller M.A. (1995) Vasopressin and galanin mRNAs coexist in the nucleus of the horizontal diagonal band: a novel site of vasopressin gene expression. *J. Comp. Neurol.* 361: 48-56.
- Platt J.L. y Michael A.F. (1983) Retardation of fading and enhancement of intensity of immunofluorescence of *p*-phenylenediamine. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 840-842.
- Popper P. y Micevych P.E. (1989) Localization of calcitonin gene-related peptide and its receptors in a striated muscle. *Brain Res.* 496: 180-186.
- Pow D.V. (1992) NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase) staining in the rat supraoptic nucleus is activity-dependent: possible functional implications. *J. Neuroendocrinol.* 4: 377-380.
- Preston E., McManus C.D., Jonsson A.C. y Courtice G.P. (1995) Vasoconstrictor effects of galanin and distribution of galanin containing fibres in three species of elasmobranch fish. *Regul. Pept.* 58: 123-134.
- Promanik A. y Ögren S-O. (1992) Galanin-evoked acetylcholine release in the rat striatum is blocked by the putative galanin antagonist MI5. *Brain Res.* 574: 317-319.
- Racke K., Holzbauer M., Cooper T.R. y Sharman D.F. (1986) Dehydration increases the electrically evoked dopamine release from the neural and intermediate lobes of the rat hypophysis. *Neuroendocrinology* 43: 6-11.
- Radulescu R.T. y Wendtner C.M. (1993) Hormone and growth factor subunits: a novel perception of cell growth regulation. *J. Endocrinol.* 139: 1-7.

- Rehfeld J.F. (1978) Immunochemical studies on cholecystokinin. Distribution and molecular heterogeneity in the central nervous system and small intestine of man and frog. *J. Biol. Chem.* 253: 4022-4030.
- Rehfeld J.F., Goltermann N., Larsson L.J., Emson P.M. y Lee C.M. (1979) Gastrin and cholecystokinin in central and peripheral neurons. *Fed. Proc.* 28: 2325-2329.
- Rhodes C.H., Morell J.I. y Pfaff D.W. (1981) Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: distribution and number of cells containing neurophysin, oxytocin and vasopressin. *J. Comp. Neurol.* 223: 556-582.
- Roa M. y Changeux J.P. (1991) Characterization and developmental evolution of a high affinity binding site for calcitonin gene related peptide (CGRP) on chick skeletal muscle membrane. *Neuroscience* 41: 563-570.
- Rodríguez E.M., Vega J.A. y LaMalfa J.A. (1970) The different origins of the neurosecretory hypothalamo-hypophysial tracts of the toad *Bufo arenarum hensel.* *Gen. Comp. Endocrinol.* 14: 248-255.
- Rökæus Å., McDonald T.J., Brooks B.D. y St-Pierre S. (1988a) Galanin: structure-function relations and pancreatic forms. *Diabetes* 37: 183A.
- Rökæus Å., Melander T., Hökfelt T., Lundberg J.M., Tatemoto K., Carlquist M. y Mutt V. (1984) A galanin-like peptide in the central nervous system and intestine of the rat. *Neurosci. Lett.* 47: 161-166.
- Rökæus Å., Young III W.S. y Mezey E. (1988b) Galanin coexists with vasopressin in the normal rat hypothalamus and galanin's synthesis is increased in the Brattleboro (diabetes insipidus) rat. *Neurosci. Lett.* 90: 45-50.
- Rose J.E. (1942) The ontogenetic development of the rabbit's diencephalon. *J. Comp. Neurol.* 77: 61.

- Rose M. (1935) Das zwischenhirn des kaninchens. Mem. Acad. Polon. Sci., sér. B, p. 1.
- Rosenbloom A.A. y Fisher D.A. (1974) Radioimmunoassay of arginine vasotocin. *Endocrinology* 95: 1726-1732.
- Rosenfeld M.G., Mermod J.J., Amara S.G., Swanson L.W., Sawchenko P.E., Rivier J., Vale W.W. y Evans R.M. (1983) Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304: 129-135.
- Rushlow W., Flumerfelt B.A. y Naus C.C.G. (1995) Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH-diaphorase in the caudate-putamen of the rat. *J. Comp. Neurol.* 351: 499-508.
- Saavedra J.M., Palkovits M., Kizer J.S., Brownstein M.J. y Zivin J.A. (1975) Distribution of biogenic amines and related enzymes in the rat pituitary gland. *J. Neurochem.* 25: 257-260.
- Sagar S.M. y Ferreiro D.M. (1987) NADPH-diaphorase activity in the posterior pituitary: relation to neural function. *Brain Res.* 400: 348-352.
- Sahu A., Phelps C.P., White J.D., Crowley W.R., Kalra S.P. y Kalra P.S. (1987) Role of the peptide galanin in regulation of growth hormone secretion. *Acta Endocrinol.* 125: 518.
- Sahu A., Phelps C.P., White J.D., Crowley W.R., Kalra S.P. y Kalra P.S. (1992) Steroidal regulation of hypothalamic neuropeptide Y release and gene expression. *Endocrinology* 130: 3331-3336.
- Said S.I. y Mutt V. (1970) Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169: 1217-1218.
- Sathyanesan A.G. (1966) Hypothalamic neurosecretory system in the normal and partly or completely hypophysectomised goldfish. *Amer. J. Anat.* 118: 1-10.

- Sathyanesan A.G. (1969) An *in situ* study of the preoptic-neurohypophysial complex of the freshwater teleost *Clarias batrachus*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 98: 202-216.
- Sawchenko P.E., Imaki T. y Vale W. (1992) Co-localization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus. In: *Functional Anatomy of the Neuroendocrine Hypothalamus*, pp. 16-42 (Ciba Foundation Symposium No. 168. John Wiley, London).
- Sawyer W.H. y Pang P.K.T. (1975) Endocrine adaptation to osmotic requirements of the environment: Endocrine factors in osmoregulation by lungfishes and amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 25: 224-229.
- Schalling M., Friberg K., Seroogy K., Riederer P., Bird E., Schiffmann S.N., Mailleux P., Vanderhaeghen J.J., Kuga S., Goldstein M. y Hökfelt T. (1990) Analysis of expression of cholecystokinin in dopamine cells in the ventral mesencephalon of several species and in human with schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8427-8431.
- Schally A.V., Arimura A., Coy D.H., Kastin A.J., Meyers C.A., Redding T.W., Chihara K., Huang W.Y., Chang R.C.C., Pedroza E. y Vilchez M.J. (1978) In: *Principles for the central neuronal regulation of the endocrine system.* (Fuxe K., Hökfelt T. y Luft R., eds.) (Plenum Press, New York).
- Schimchowitsch S., Stoeckel M.E., Vigny A. y Porte A. (1981) Oxytocinergic neurons with tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the rabbit hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 43: 55-59.
- Schneider B.S., Monahan T.W. y Hirsch J. (1979) Brain cholecystokinin and nutritional status in rats and mice. *J. Clin. Invest.* 64: 1348-1356.
- Schultzberg M. y Lindh B. (1988) Transmitters and peptides in autonomic ganglia. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy. The peripheral nervous system* (Björklund A., Hökfelt T. y Owman C., eds.), Vol. 6, pp. 297-326 (Elsevier, Amsterdam).



- Segura E.T. y D'Agostino S.A. (1964) Seasonal variations of blood pressure, vasomotor reactivity and plasmatic catecholamines in the toad. *Acta physiol. lat.-amer.* 14: 231-237.
- Selvais P.L., Adam E., Colin I.M., Kasa-Vubu J.Z., Deneff J.-F. y Maiter D.M. (1994) Pituitary-dependent hormonal regulation of galaninergic neurons in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 60: 368-377.
- Selvais P.L., Colin I.M., Adam E., Kasa-Vubu J.Z., Deneff J.-F. y Maiter D.M. (1993) Effects of hypophysectomy on galaninergic neurons in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 58: 539-547.
- Share L. (1968) Control of plasma ADH titer in hemorrhage: role of atrial and arterial receptors. *Amer. J. Physiol.* 215: 1384-1389.
- Shehab S.A. y Atkinson M.E. (1986) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases in the spinal cord after peripheral axotomy of the sciatic nerve originate from primary afferent neurons. *Brain Res.* 372: 37-44.
- Sherman T.G., Civelli O., Douglass J., Herbert E., Burke S. y Watson S.J. (1986a) Hypothalamic dynorphin and vasopressin mRNA expression in normal and Brattleboro rats. *Fed. Proc.* 45: 2323-2327.
- Sherman T.G., Civelli O., Douglass J., Herbert E. y Watson S.J. (1986b) Coordinate expression of hypothalamic pro-dynorphin and pro-vasopressin mRNAs with osmotic stimulation. *Neuroendocrinology* 44: 222-228.
- Sherman T.G., Day R., Civelli O., Douglass J., Herbert E., Akil H. y Watson S.J. (1988) Regulation of hypothalamic magnocellular neuropeptides and their mRNAs in the Brattleboro rat: coordinate response to further osmotic challenge. *J. Neurosci.* 8: 3785-3796.

- Shimatsu A., Tanoh T., Koshiyama H., Murakami Y., Kato Y., Yanaihara N. y Imura H. (1991) Role of galanin in prolactin and growth hormone secretion in rats. In: Galanin: A new multifunctional peptide in the neuro-endocrine system (Hökfelt T., Bartfai T., Jacobowitz D. y Ottoson D., eds.), Vol 58, pp. 321-329 (Macmillan Press, London).
- Shinmi O., Kimura S., Yoshizawa T., Sawamura T., Uchiyama Y., Sugita Y., Kanazawa I., Yanagisawa M., Goto K. y Masaki T. (1989) Presence of endothelin-1 in porcine spinal cord: isolation and sequence determination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 340-346.
- Shu S., Ju G. y Fan L. (1988) The glucose oxidase method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci. Lett.* 85: 169-171.
- Silvestre R.A., Miralles P., Monge L., Moreno P., Villanueva M.L. y Marco J. (1987) Effects of galanin on hormone secretion from the *in situ* perfused rat pancreas and on glucose production in rat hepatocytes in vitro. *Endocrinology* 121: 378-383.
- Simerly R.B. y Swanson L.W. (1987) Castration reversibly alters levels of cholecystokinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2087-2091.
- Siviy S.M., Kritikos A., Atrens D.M. y Shepherd A. (1989) Effects of norepinephrine infused in the paraventricular hypothalamus on energy expenditure in the rat. *Brain Res.* 487: 79-88.
- Sklar A.H. y Schrier R.W. (1983) Central nervous system mediators of vasopressin release. *Physiol. Rev.* 63: 1243-1280.
- Skofitsch G., Sills M.A. y Jacobowitz D.M. (1986) Autoradiographic distribution of <sup>125</sup>I-galanin binding sites in the rat central nervous system. *Peptides* 7: 1029-1042.
- Skofitsch G. y Jacobowitz D.M. (1985) Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 6: 509-546.

- Skofitsch G., Jacobowitz D.M., Amann R. y Lembeck F. (1989) Galanin and vasopressin coexist in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Neuroendocrinology* 49: 419-427.
- Sladek C.D. (1983) Regulation of vasopressin release by neurotransmitters neuropeptides and osmotic stimuli. *Prog. Brain Res.* 60: 71-90.
- Sladek C.D. y Armstrong W.E. (1985) Neural pathways subserving osmotic control of vasopressin release. In: *Vasopressin* (Schrier R.W., ed.), pp. 435-441 (Raven Press, New York).
- Sloper J.C. (1966) Hypothalamic neurosecretion. *Brit. Med. Bull.* 22: 209-215.
- Sloper J.C., Karim M.A. y Richards M.A. (1967) In: "Neurosecretion" (Stutinsky F., ed.), pp. 124-139 (Springer-Verlag, Berlin y New York).
- Sneddon P. y Westfall D.P. (1984) Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in the guinea-pig vas deferens. *J. Physiol.* 347: 561-580.
- Snyder S.H. (1980) Brain peptides as neurotransmitters. *Science* 209: 976-983.
- Sofroniew M.V. (1985) Vasopressin, oxytocin and their related neurophysins. In: *Handbook of chemical neuroanatomy. GABA and neuropeptides in the CNS. Part 1* (Björklund A. y Hökfelt T. eds.), Vol 4, pp. 93-165 (Elsevier, Amsterdam).
- Sofroniew M.V. y Schrell U. (1981) Evidence for a direct projection from oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus to the medulla oblongata: Immunohistochemical visualization of both the horseradish peroxidase transported and the peptide produced by the same neurons. *Neurosci. Lett.* 22: 211-217.

- Sossin W.S., Sweet C.A. y Scheller R.H. (1990) Dale's hypothesis revisited: different neuropeptides derived from a common prohormone are targeted to different processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4845-4848.
- Spence A.M., Sheppard P.C., Davie J.R., Matuo Y., Nichi N., McKeehan W.L., Dodd J.G. y Matusik R.J. (1989) Regulation of a bifunctional mRNA results in synthesis of secreted and nuclear probasin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7843-7847.
- Spencer S., Saper C.B., Joh T., Reis D.J., Goldstein M. y Raese J.D. (1985) Distribution of catecholamine-containing neurons in the normal human hypothalamus. *Brain Res.* 328: 73-80.
- Spray D.C. (1974) Metabolic dependence of frog cold receptor sensitivity. *Brain Res.* 72: 354-359.
- Spray D.C. (1975a) Effect of reduced acclimation temperature on responses of frog cold receptors. *Comp. Biochem. Physiol.* 50: 391-395.
- Spray D.C. (1975b) Sympathetic interaction and transduction mechanism of frog cold receptors. In: *Proc. Golgi Centennial Symp.* (Santini M., ed.) (New York: Raven Press).
- Spray D.C. y Belkin D.B. (1973) Thermal patterns in the heating and cooling *Iguana iguana* and *Ctenosaura hemilopha*. *Comp. Biochem. Physiol.* 44: 881-893.
- Spray D.C. y May M.M. (1972) Physiological thermoregulation in four species of turtles. *Comp. Biochem. Physiol.* 41: 507-522.
- Springall D.R., Suburo A.M., Bishop A.E., Merrett M., Riveros-Moreno V., Moncada S. y Polak J. (1992) Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry* 98: 259-266.

- Sterba G. y Brückner G. (1967) Zur funktion der ependymalen glia in der neurohypophyse. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 81: 457-473.
- Stevens E.D. (1973) The evolution of endothermy. J. Theor. Biol. 38: 597-611.
- Stjernquist M., Ekblad E., Owman C. y Sundler F. (1988) Immunocytochemical localization of galanin in the rat male and female genital tracts and motor effects in vitro. Regul. Pept. 20: 335-343.
- Stoll C.J. y Voorn P. (1985) The distribution of hypothalamic and extrahypothalamic vasotocinergic cells and fibers in the brain of a lizard, *Gekko gecko*: presence of a sex difference. J. Comp. Neurol. 239: 193-204.
- Storey K.B. (1990) Life in a frozen state: Adaptive strategies for natural freeze tolerance in amphibians and reptiles. Am. J. Physiol. 258: R559-R568.
- Streit W.J., Dumoulin F.L., Raivich G. y Kreutzberg G.W. (1989) Calcitonin gene-related peptide increases in rat facial motoneurons after peripheral nerve transection. Neurosci. Lett. 101: 143-148.
- Stutinsky F.S. (1952) Sur l'origine diencephalique des hormones dite "posthypophysaires". C. R. Soc. Biol. 146: 1691.
- Stutinsky F.S. (1953) La neurosécrétion chez l'*Anguille* normale et hypophysectomisée. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 39: 276-297.
- Stutinsky F.S. (1955) Effets de l'hypophysectomie totale ou partielle sur la neurosécrétion hypothalamique du rat. C. R. Ass. Anat. 42: 1256-1266.
- Stutinsky F.S. (1957) Recherches expérimentales sur le complexe hypothalamo-neurohypophysaire. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 46: 93-158.

- Suburo A., González Nicolini M.V., Musto A., Polak J. y Chicchio S. (1996) Nitric oxide synthase in the central nervous system of the toad *Bufo arenarum*. Submitted.
- Sudoh T., Kangawa K., Minamino N. y Matsuo H. (1988) A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332: 78-81.
- Summy-Long J.Y., Salisbury R., Marietta M.P., Hartman R.D. y Weisz J. (1984) Pathways of hydrogen utilization from NADPH generated by glucose-6-phosphate dehydrogenase in circumventricular organs and the hypothalamo-neurohypophysial system: a cytochemical study. *Brain Res.* 294: 23-35.
- Swaab D.F., Poll C.W. y Van Leeuwen F. (1977) Can specificity ever be proved in immunocytochemical staining. *J. Histochem. Cytochem.* 25: 388-391.
- Swanson L.W. (1977) Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 128: 356-363.
- Swanson L.W. (1987) The hypothalamus. In: *Handbook of chemical neuroanatomy.* (Björklund A., Hökfelt T. y Swanson L., eds.), Vol. 5, p. 1 (Amsterdam: Elsevier).
- Swanson L.W. y Hartman B.K. (1980) Biochemical specificity in central pathways related to peripheral and intracerebral homeostatic functions. *Neurosci. Lett.* 16: 55-60.
- Swanson L.W., Sawchenko P.E., Berod A., Hartman B.K., Helle K.B. y Van Orden D.E. (1981) An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 196: 271-285.
- Swanson L.W., Sawchenko P.E. y Lind R.W. (1986) Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response. *Prog. Brain Res.* 68: 169-190.

- Takami K., Hashimoto K., Uchida S., Tohyama M. y Yoshida H. (1986) Effect of calcitonin gene-related peptide on the cyclic AMP level of isolated mouse diaphragm. *Jpn. J. Pharmacol.* 42: 345-350.
- Takami M., Reeve J.R., Hawke D., Shively J.E., Basinger S. y Yamada T. (1985) Purification of somatostatin from frog brain: coisolation with retinal somatostatin-like immunoreactivity. *J. Neurochem.* 45: 1869-1874.
- Tanaka K., Masu M. y Nakanishi S. (1990) Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4: 847-854.
- Tanoh T., Shimatsu A., Murakami Y., Ishikawa Y., Yanaihara N. e Imura H. (1991) Cholinergic modulation of growth hormone secretion induced by galanin in rats. *Neuroendocrinology* 54: 83-88.
- Tatemoto K., Rökaeus A., Jörnvall H., Mc Donald T.J. y Mutt V. (1983) Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett.* 164: 124-128.
- Tatemoto K., Carlquist M. y Mutt V. (1982) Neuropeptide Y- a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296: 659-660.
- Tatemoto K. y Mutt V. (1988) Neuropeptide Y, peptide HI, galanin, cholecystokinin-58, neuropeptide K, and peptide YY. In: *Gastrointestinal hormones* (Mutt V., ed.), pp. 421-437 (Academic Press, San Diego).
- Tempel D.L., Leibowitz K.J. y Leibowitz S.F. (1988) Effects of PVN galanin on macronutrient selection. *Peptides* 9: 309-314.
- Terlou M. y Ploemacher R.E. (1973) The distribution of monoamines in the tel-, di-, and mesencephalon of *X. laevis* tadpoles, with special reference to the hypothalamo-hypophysial system. *Z. Zellforsch.* 137: 521-540.

- Terlou M. y van Straaten H.W.M. (1973) The development of a hypothalamic monoaminergic system for the regulation of the pars intermedia activity in *X. laevis*. *Z. Zellforsch.* 143: 229-238.
- Theodosis D.T. y Poulain D.A. (1993) Neuronal, glial and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neurosci.* 57: 501-535.
- Thoenen H. (1991) The changing scene of neurotrophic factors. *TINS* 14: 165-170.
- Thureson-Klein Å. y Klein R.L. (1990) Exocytosis from neuronal large dense-cored vesicles. *Int. Rev. Cytol.* 121: 67-126.
- Tonon M.C., Bulet A., Lauber M., Cuet P., Jégou S., Gouteux L., Ling N. y Vaudry H. (1985) Immunohistochemical localization and radioimmunoassay of corticotropin-releasing factor in the forebrain and hypophysis of the frog *Rana ridibunda*. *Neuroendocrinology* 40: 109-119.
- Tonon M.C., Cuet P., Lamacz M., Jégou S., Côté J., Gouteux L., Ling N., Pelletier G. y Vaudry H. (1986) Comparative effects of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and related neuropeptides on the secretion of ACTH and alpha-MSH by frog anterior pituitary cells and neurointermediate lobes in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 61: 438-445.
- Tonon M.C., Desrues L., Lazure C., Jenks B.G., Chrétien M. y Vaudry H. (1989) Melanin concentrating hormone. V. Isolation and characterization of alpha-melanocyte-stimulating hormone from frog pituitary glands. *Life Sci.* 45: 1155-1162.
- Tranchand Bunel D., Conlon J.M., Chartrel N., Tonon M.C. y Vaudry H. (1992) Isolation and structural characterization of peptides related to alpha- and gamma-melanocyte-stimulating hormone (MSH) from the frog brain. *Mol. Brain Res.* 15: 1-7.
- Tsujimoto T. y Kuno M. (1988) Calcitonin gene-related peptide prevents disuse-induced sprouting of rat motor nerve terminals. *J. Neurosci.* 8: 3951-3957.



- Twiss J.L. y Shooter E.M. (1995) Nerve growth factor promotes neurite regeneration in PC12 cells by translational control. *J. Neurochem.* 64: 550-557.
- Vallarino M., Feuilloley M., Vandesande F. y Vaudry H. (1991) Immunohistochemical mapping of galanin-like immunoreactivity in the brain of the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Peptides* 12: 351-357.
- Van den Pol A.N., Herbst R.S. y Powell J.F. (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons of the hypothalamus: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 13: 1117-1156.
- Vanderhaeghen J.J., Signeau J.C. y Gepts W. (1975) New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. *Nature* 257: 604-605.
- Van Tol H.H.M., Voorhuis D.T.A.M. y Burdach J.P.H. (1987) Oxytocin gene expression in discrete hypothalamic magnocellular cell groups is stimulated by prolonged salt loading. *Endocrinology* 120: 71-76.
- Venesio T., Mulatero B. y Fasolo A. (1987) Coexistence of substance P and calcitonin gene-related peptide in the frog spinal cord. *Neurosci. Lett.* 80: 246-250.
- Verge V.M.K., Richardson P.M., Wiesenfeld-Hallin Z. y Hökfelt T. (1995) Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression *in vivo*: A novel role in peptide suppression in adult sensory neurons. *J. Neurosci.* 15: 2081-2096.
- Vertes Z., Melegh G., Vertes M. y Kovacs S. (1982) Effect of naloxone and D-met<sup>2</sup>-pro<sup>5</sup>-enkephalinamide treatment on the DNA synthesis in the developing rat brain. *Life Sci.* 31: 119-126.
- Vigh B. (1969) The paraventricular organ, its structure and function. In: *Zirkumventrikuläre Organe und liquor* (Sterba G., ed.), pp. 147-150 (Jena: VEB G. Fischer).

- Vigh B., Teichmann I. y Aros B. (1967) The "nucleus organi paraventricularis" as a neuronal part of the paraventricular ependymal organ of the hypothalamus. Comparative morphological study in various vertebrates. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 18: 271-284.
- Vigh B., Teichmann I. y Aros B. (1969) Das paraventricularorgan und das Liquorkontakt-Neuronensystem. *Erg. H. Anat. Anz.* 125: 683-688.
- Vigh-Teichmann I., Röhlich P. y Vigh B. (1969a) Licht- und elektronenmikroskopische untersuchungen am recessus praeopticus-organ von amphibien. *Z. Zellforsch.* 98: 217-232.
- Vigh-Teichmann I. y Vigh B. (1970) Structure and function of the liquor contacting neurosecretory system. In: *Aspects of neuroendocrinology* (Bargmann W. y Scharrer B., eds.), pp. 329-337 (Berlin-Heidelberg-New York: Springer).
- Vigh-Teichmann I., Vigh B. y Aros B. (1969b) Phylogeny and ontogeny of the paraventricular organ. In: *Zirkumventrikuläre organe und liquor* (Sterba G., ed.), pp. 151-154 (Jena: VEB G. Fischer).
- Villar M.J., Ceccatelli S., Rönnqvist M. y Hökfelt T. (1994a) Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and *in situ* hybridization study. *Brain Res.* 644: 273-281.
- Villar M.J., Cortés R., Theodorsson E., Wiesenfeld-Hallin Z., Schalling M., Fahrenkrug J., Emson P.C. y Hökfelt T. (1989a) Neuropeptide expression in rat dorsal root ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin. *Neuroscience* 33: 587-604.
- Villar M.J., Meister B., Cortés R., Schalling M., Morris M. y Hökfelt T. (1990) Neuropeptide gene expression in hypothalamic magnocellular neurons of normal and hypophysectomized rats: a combined immunohistochemical and *in situ* hybridization study. *Neuroscience* 36: 181-199.

- Villar M.J., Meister B. y Hökfelt T. (1994b) Reorganization of neural peptidergic systems in the median eminence after hypophysectomy. *J. Neurosci.* 14: 5996-6012.
- Villar M.J., Roa M., Huchet M., Hökfelt T., Changeux J.-P., Fahrenkrug J., Brown J.C., Epstein M.C. y Hersh L. (1989b). Immunoreactive calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin in developing chicken spinal cord motoneurons. Distribution and role in regulation of cAMP in cultured muscle cells. *Eur. J. Neurosci.* 1: 269-287.
- Villar M.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X-J., Theodorsson E., Emson P.C. y Hökfelt T. (1991) Further studies on galanin-, substance P- and CGRP-like immunoreactivities in primary sensory neurons and spinal cord: Effects of dorsal rhizotomies and sciatic nerve lesions. *Exp. Neurol.* 112: 29-39.
- Vincent S.R., Hökfelt T., Christensson I. y Terenius L. (1982) Dynorphin immunoreactive neurons in the central nervous system of the rat. *Neurosci. Lett.* 33: 185-190.
- Wada M., Urano A. y Gorbman A. (1980) A stereotaxic atlas for diencephalic nuclei of the frog, *Rana pipiens*. *Arch. histol. jap.* 43: 157-173.
- Wagner E., Zenke M., Cotten M., Beug H. y Birnstiel M.L. (1990) Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3410-3414.
- Walker Farmer S., Licht P. y Papkoff H. (1977) Biological activity of bullfrog growth hormone in the rat and the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Endocrinology* 101: 1145-1150.
- Walker L.C., Koliatsos V.E., Kitt C.A., Richardson R.T., Rökaeus A. y Price D.L. (1989) Peptidergic neurons in the basal forebrain magnocellular complex of the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 280: 272-282.
- Walker L.C., Rance N.E., Price D.L. y Young III W.S. (1991) Galanin mRNA in the nucleus basalis of Meynert complex of baboons and humans. *J. Comp. Neurol.* 303: 113-120.

- Wall P.D. y Gutnik M. (1974) Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from neuroma. *Exp. Neurol.* 43: 580-593.
- Wang R. y Schoenfeld R. (eds.) (1987) Cholecystokinin antagonists (Alan R. Liss, New York).
- Wang Y. y Conlon J.M. (1994a) Purification and characterization of galanin from the phylogenetically ancient fish, the bowfin (*Amia calva*) and the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Peptides* 15: 981-986.
- Wang Y. y Conlon J.M. (1994b) Purification and primary structure of galanin from alligator stomach. *Peptides* 15: 603-606.
- Watts A.G. (1992) Disturbance of fluid homeostasis leads to temporally and anatomically distinct responses in neuropeptide and tyrosine hydroxylase mRNA levels in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Neuroscience* 46: 859-879.
- Watts A.G. y Watts-Sanchez G. (1995) Physiological regulation of peptide messenger RNA colocalization in rat hypothalamic paraventricular medial parvocellular neurons. *J. Comp. Neurol.* 352: 501-514.
- Weber W. (1965) Entwicklung und Funktion des neurosekretorischen systems von *Salamandra salamandra*. *Z. Zellforsch.* 66: 35-65.
- Whim M.D. y Lloyd P.E. (1989) Frequency-dependent release of peptide cotransmitters from identified cholinergic motor neurons in *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9034-9038.
- Whitehouse P.J., Price D.L., Struble R.G., Clark A.W., Coyle J.T. y Delon M.R. (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215: 1237-1239.

- Wiesenfeld-Hallin Z., Hökfelt T., Lundberg J.M., Forssmann W.G., Reinecke M., Tschopp F.A. y Fischer J.A. (1984) Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neurosci. Lett.* 52: 199-204.
- Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X.-J., Langel Ü., Bedecs K., Hökfelt T. y Bartfai T. (1992) Galanin-mediated control of pain: enhanced role after nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3334-3337.
- Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X.-J., Hughes J., Horwell D.C. y Hökfelt T. (1990) PD134308, a selective antagonist of cholecystokinin type B receptor, enhances the analgesic effect of morphine and synergistically interacts with intrathecal galanin to depress spinal nociceptive reflexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7105-7109.
- Wolfbauer C. y Skofitsch G. (1989) Immunohistochemical localization of galanin and calcitonin gene-related peptide in the brain of the frog, *Rana temporaria*. *Gen. Comp. Endocr.* 74 (173): 295.
- Woolf C. y Wiesenfeld-Hallin Z. (1986) Substance P and calcitonin gene-related peptide synergistically modulate the gain of the nociceptive flexor withdrawal reflex in the rat. *Neurosci. Lett.* 66: 226-230.
- Wu C.H., Wilson J.M. y Wu G.Y. (1989) Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo. *J. Biol. Chem.* 264: 16985-16987.
- Wurzinger A. y Skofitsch G. (1989) Immunohistochemical localization of galanin and calcitonin gene-related peptide in the brain of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocr.* 74 (174): 295.
- Xu X.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Hughes J., Horwell D.C. y Hökfelt T. (1992) CI988, a selective antagonist of cholecystokinin B receptors, prevents morphine tolerance in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 105: 591-596.

- Xu X.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Villar M.J., Fahrenkrug J. y Hökfelt T. (1990) On the role of galanin, substance P and other neuropeptides in primary sensory neurons of the rat: Studies with spinal reflex excitability and peripheral axotomy. *Eur. J. Neurosci.* 2: 733-743.
- Xu X.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Villar M.J. y Hökfelt T. (1989) Intrathecal galanin antagonizes the facilitatory effect of substance P on the nociceptive flexor reflex in the rat. *Acta Physiol. Scand.* 137: 463-464.
- Yamamoto T., Maler L., Nagy J.I. (1992) Organization of galanin-like immunoreactive neuronal systems in weakly electric fish (*Apteronotus leptorhynchus*). *J. Chem. Neuroanat.* 5: 19-38.
- Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K. y Masaki T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415.
- Yeh H.-J., Pierce G. F. y Deuel T.F. (1987) Ultrastructural localization of a platelet-derived growth factor/v-sis-related protein(s) in cytoplasm and nucleus of simian sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2317-2321.
- Yokota Y., Sasai Y., Tanaka K., Fujiwara T., Tsuchida K., Shigemoto R., Kakizuka A., Ohkubo H. y Nakanishi S. (1989) Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 17649-17652.
- Young W.S. (1986) Corticotropin-releasing factor mRNA in the hypothalamus is affected differentially by drinking saline and by dehydration. *Fedn. Eur. Biochem. Socs. Lett.* 208: 158-162.
- Young W.S., Horvath S. y Palkovits M. (1990) The influences of hyperosmolality and synaptic inputs on galanin and vasopressin expression in the hypothalamus. *Neuroscience* 39: 115-125.

- Young W.S., Shepard E.A. y Burch R.M. (1987a) Plasma hyperosmolality increases G-protein and cAMP synthesis in the paraventricular and supraoptic nuclei. *Mol. Endocrinol.* 1: 884-888.
- Young W.S., Warden M. y Mezey E. (1987b) Tyrosine hydroxylase mRNA is increased by hyperosmotic stimuli in the paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology* 46: 439-444.
- Zagon I.S. y McLaughlin P.J. (1983) Increased brain size and cellular content in infant rats treated with an opiate antagonist. *Science* 221: 1179-1180.
- Zamboni L. y De Martino C. (1967) Buffered picric acid formaldehyde: a new rapid fixation for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 35: 148A.
- Zambrano D. y De Robertis E. (1968) Ultrastructure of the peptidergic and monoaminergic neurons in the hypothalamic neurosecretory system of anuran batracians. *Z. Zellforsch.* 90: 230-244.
- Zerbe R.L. y Palkovits M. (1984) Changes in the vasopressin content of discrete brain regions in response to stimuli for vasopressin secretion. *Neuroendocrinology* 38: 285-289.
- Zhang X. (1994) Messenger plasticity in primary sensory neurons following peripheral nerve injury. (Thesis, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden).
- Zhang X., Aman K. y Hökfelt T. (1995a) Secretory pathways of neuropeptides in rat lumbar dorsal root ganglion neurons and effects of peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol.* 352: 481-500.
- Zhang X., Bean A.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X.-J. y Hökfelt T. (1995b) Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord -III. Effects of peripheral axotomy with special reference to galanin. *Neuroscience* 64: 893-915.

Zhang X., Ju G., Elde R.P. y Hökfelt T. (1994) Effect of peripheral nerve cut on neuropeptides in dorsal root ganglia and the spinal cord of the monkey with special reference to galanin. *J Neurocytol.* 22: 342-381.

Zigmond R.E., Schwarzschild M.A. y Rittenhouse A.R. (1989) Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu. Rev. Neurosci.* 12: 415-461.

Zoeller R.T. y Moore F.L. (1986) Arginine vasotocin immunoreactivity in hypothalamic and extrahypothalamic areas of an amphibian brain. *Neuroendocrinology* 42: 120-123.

Zoeller R.T. y Moore F.L. (1988) Brain arginine vasotocin concentrations related to sexual behaviors and hydromineral balance in an amphibian. *Horm. Behav.* 22: 66-75.



**10. INDICE GENERAL**

- RESUMEN

1- INTRODUCCION

1.1. El Sistema Hipotalámico

1.1.1. Generalidades

1.1.2. El hipotálamo de los anfibios

1.2. Función de los Neuropeptidos

1.2.1. Generalidades

1.2.2. Galanina

1.2.3. Colecistoquinina

1.2.4. Vasopresina

1.2.5. Sintetasa de óxido nítrico

1.2.6. Tirosina hidroxilasa

1.2.7. Péptido ligado al gen de calcitonina

1.3. La Plasticidad Neural

2- OBJETIVOS

3- MATERIALES Y METODOS

### 3.1. Experimentos Fisiológicos

3.1.1. Procedimiento quirúrgico de hipofisectomía, uso de trasplantes y sustitución hormonal

3.1.2. Situaciones de desequilibrio en el balance hidromineral

3.1.3. Hibernación simulada en los sapos

### 3.2. Técnicas de Inmunohistoquímica

3.2.1. Método de Avidina/Biotina

3.2.2. Método de Avidina/Biotina con amplificación con níquel

3.2.3. Método de fluorescencia

### 3.3. Técnica de Hematoxilina-Eosina

### 3.4. Análisis Estadístico

3.4.1. Cuantificación de neuronas ir-GAL en el NPO en el estudio de hipofisectomía y de hibernación inducida, y cuantificación de neuronas ir-NOS en el área magnocelular en este último estudio

3.4.2. Cuantificación de inmunorreactividad de los diferentes péptidos y enzimas utilizados en el experimento de cambio en la osmolaridad

### 3.5. Controles

3.6. Radioinmunoensayo

3.7. Transporte Axonal Retrógrado

#### 4- RESULTADOS OBTENIDOS

4.1. Distribución de GAL en el Cerebro del Sapo

4.1.1. Telencéfalo

4.1.2. Area preóptica-hipotalámica

4.1.3. Tálamo

4.1.4. Epitálamo

4.1.5. Tectum óptico

4.1.6. Tronco encefálico

4.1.7. Médula espinal

4.2. Efectos de la Hipofisectomía Total y Parcial sobre la Distribución de GAL en el Hipotálamo del Sapo

4.2.1. Efecto de la HPX en la expresión de GAL en la región magnocelular

4.2.2. Efecto de la PDX en la expresión de GAL en la región magnocelular

4.2.3. Efecto de la HPX en la expresión de GAL en el NPO

4.2.4. Efecto de la PDX en la expresión de GAL en el NPO

4.2.5. Funcionalidad de los trasplantes

4.2.6. Efecto de la PDX y de la terapia sustitutiva con GH en la expresión de GAL en el NPO

4.2.7. Radioinmunoensayo

4.3. Efectos de la Deshidratación y la Sobrecarga Salina sobre Diferentes Péptidos Hipotalámicos

4.3.1. Efectos provocados por la sobrecarga salina en la expresión de sustancias neuroactivas en la región magnocelular hipotalámica

4.3.2. Efectos de la deshidratación en la expresión de sustancias neuroactivas en la región magnocelular hipotalámica

4.3.1. Efectos de la sobrecarga de volumen en la expresión de sustancias neuroactivas en la región magnocelular hipotalámica

4.4. Efectos de la Hibernación Inducida sobre la Expresión de GAL y NOS en el Hipotálamo del Sapo

4.5. Experimentos de Transporte Axonal Retrógrado

## 5- DISCUSION

5.1. Consideraciones Técnicas

5.2. Sistema Galaninérgico en el Sapo

### 5.3. Comparación con el Sistema Galaninérgico de la Rata

### 5.4. Galanina e Hipofisectomía

#### 5.4.1. Neuronas magnocelulares

#### 5.4.2. Células del NPO

### 5.5. Disturbios en el Balance Hidromineral

#### 5.5.1. Vasopresina

#### 5.5.2. Tirosina hidroxilasa

#### 5.5.3. Colecistoquinina

#### 5.5.4. Sintetasa de óxido nítrico

#### 5.5.5. Galanina

### 5.6. Efecto de la Hibernación Inducida sobre Sustancias Neuroactivas Hipotalámicas

#### 5.6.1. Efecto de la hibernación inducida sobre la expresión de GAL en el NPO

#### 5.6.2. Efecto de la hibernación inducida sobre la expresión de NOS en la región magnocelular

### 5.7. Transporte Axonal Retrógrado

5.8. Perspectivas

6- CONCLUSIONES

7- ILUSTRACIONES

7.1. Distribución de GAL en el Cerebro del Sapo

7.2. Efectos de la Hipofisectomía Total y Parcial sobre la Distribución de GAL en el Hipotálamo del Sapo

7.3. Efectos de la Deshidratación y la Sobrecarga Salina sobre la Expresión de Diferentes Péptidos Hipotalámicos

7.4. Efectos de la Hibernación Inducida sobre la Expresión de GAL y NOS en el Hipotálamo del Sapo

7.5. Experimentos de Transporte Axonal Retrógrado

8- LISTA DE ABREVIATURAS

9- REFERENCIAS

10- INDICE GENERAL

